

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

DESEMPENHO PRODUTIVO E RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS DA
TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DIFERENTES NÍVEIS DE
PROTEÍNA E CONDIÇÕES DE ESTRESSE

JAKELINE MARCELA AZAMBUJA DE FREITAS

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

BOTUCATU-SP

Junho de 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

DESEMPENHO PRODUTIVO E RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS DA
TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DIFERENTES NÍVEIS DE
PROTEÍNA E CONDIÇÕES DE ESTRESSE

JAKELINE MARCELA AZAMBUJA DE FREITAS

Engenheira de Pesca

ORIENTADORA: Profa. Dra. Margarida Maria Barros

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Helena Peres

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

BOTUCATU-SP

Junho de 2015

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

F866d Freitas, Jakeline Marcela Azambuja de, 1987-
Desempenho produtivo e respostas hematológicas da Tilápia-do-Nilo submetida a diferentes níveis de proteína e condições de estresse / Jakeline Marcela Azambuja de Freitas. - Botucatu : [s.n.], 2015
x, 112 f. : grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015
Orientador: Margarida Maria Barros
Coorientador: Helena Peres
Inclui bibliografia

1. Tilápia-do-Nilo - Nutrição. 2. Tilápia-do-Nilo - Alimentação e rações. 3. Peixe - Criação. 4. Stress (Fisiologia) - Aspectos nutricionais. I. Barros, Margarida Maria. II. Peres, Helena. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esta minha conquista,

À meu pai,

Silvio Constantino de Freitas,

Meu exemplo de fé e perseverança;

À minha irmã e ao meu cunhado,

Josyane Azambuja de Freitas e Edimar Zacarias dos Santos

Por todo apoio e incentivo que vocês me proporcionaram ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da paciência, persistência, coragem e sobretudo pelo dom da vida. Sou muito grata por tudo de maravilhoso que Deus tem proporcionado em minha vida. Obrigada DEUS!

À minha família e namorado, que sempre estiveram torcendo por mim, por todo apoio, conselhos e, principalmente, pelo conforto nos momentos mais difíceis, pela alegria e descontração proporcionada nos momentos em que estivemos juntos, cada encontro me fortalecia e me renovava. Muito obrigada por tudo, amo vocês!!!!

À minha orientadora, Profa. Dra. Margarida Maria Barros, pela incontestável orientação, pela confiança, companheirismo, amizade e constante preocupação com minha formação. Muito obrigada Profa. Dra. Margarida por tudo, foi uma honra trabalharmos juntas!

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Helena Peres, por toda contribuição, paciência e dedicação a este trabalho, que com certeza fez toda diferença. Suas contribuições foram muito valiosas, muito obrigada Profa. Dra. Helena por tudo!

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela amizade, companheirismo e por todas as contribuições para este trabalho, me sinto também muito honrada em poder trabalharmos juntos. Muito obrigada Prof. Dr. Pezzato!

À Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal – FCA/UNESP/ Botucatu, pela imensa contribuição e ajuda nas análises estatísticas;

Aos meus amigos Lara Genovez, Mariucha Rocha, Flávia Mota Damasceno, Eric Portilho de Araújo, Rafael Lopes da Silva, Alis Bittarello, Igor Simões Tiagua Vicente e Hinglidj de Carvalho Müller, pela amizade, conselhos, companheirismo, momentos de descontração e pela imensa ajuda proporcionada durante todo tempo que estive em

Botucatu, foi maravilhoso encontrá-los em meu caminho! MUITO OBRIGADA POR TUDO!

Aos amigos do Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes - AquaNutri: Vivian Gomes dos Santos, Renan de M. Botelho, Lara Genovez, Mariucha Rocha, Flávia Mota Damasceno, Eric Portilho de Araújo, Rafael Lopes da Silva, Igor Simões Tiagua Vicente, Hinglidj de Carvalho Müller, Caroline Pelegrina Teixeira, Ademir Calvo Fernandes Júnior, João Fernando A. Koch, Pedro Luiz P. F. de Carvalho, Juliana Mara Costa, Felipe Tenório Cintra, Rodney Carmo, Paula Lima, Guilherme Eduardo Sassi, Rafael Fogaça, Rafael (Portuga), Matheus Trento, Paula Novelli, agradeço à todos pela imensa ajuda e amizade.

Aos professores da pós-graduação em Zootecnia, pelos ensinamentos compartilhados e por estarem sempre dispostos a ajudar seus alunos;

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FMVZ, Seila C. C. Vieira e Ellen Cassemiro Guillhen;

À Gisele Setznagl, Laboratório de Bromatologia – FMVZ/UNESP Botucatu, por toda dedicação e ajuda nas análises bromatológicas;

À D. Eliza, por me acolher em sua casa durante o tempo que estive em Botucatu e por sempre estar disposta a me ajudar sempre em tudo que precisei;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (141761/2012-1) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (2012/15849-9), pela concessão dos recursos financeiros e pela bolsa de estudos;

À todos de que alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. Formulation (%) and analyzed composition of experimental diets.	56
Table 2. Composition (g 100 g ⁻¹) and digestibility coefficients of amino acids (%) of experimental diets.	57
Table 3. Growth performance, feed utilization and fillet yield of Nile tilapia fed experimental diets for 110 days.	58
Table 4. Nutrient and energy utilization, visceral fat and hepatosomatic index of Nile tilapia fed the experimental diets for 110 days.	59
Table 5. Whole-body composition (wet weight basis) of Nile tilapia fed experimental diets for 110 days.	60
Table 6. Muscle and liver composition (wet weight basis); fat visceral and hepatosomatic index of Nile tilapia fed with experimental diets.	61
Table 7. Specific activity (mIU mg protein ⁻¹) amino acid catabolic, glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzyme in liver of Nile tilapia fed the experimental diets.	62
Table 8. Apparent digestibility of nutrients and energy in the experimental diets for Nile tilapia.	63

CAPÍTULO III

Table 1. Formulation (%) and analyzed composition of experimental diets.	90
Table 2. Composition (g 100 g ⁻¹) and digestibility coefficients (%) of amino acids of experimental diets.	91
Table 3. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days.	92
Table 4. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte number leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days.	93
Table 5. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to cold-induced stress.	94
Table 6. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to cold-induced stress.	95

Table 7. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after cold-induced stress.	96
Table 8. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to cold-induced stress.....	97
Table 9. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to heat-induced stress.	98
Table 10. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to heat-induced stress.	99
Table 11. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after heat-induced stress.....	100
Table 12. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to heat-induced stress.....	101
Table 13. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to transport-induced stress.....	102
Table 14. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to transport-induced stress.....	103
Table 15. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after transport-induced stress.	104
Table 16. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to transport-induced stress.	105
Table 17. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed experimental diets after transport-induced stress.....	106
Table 18. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to grading-induced stress.....	107
Table 19. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to grading-induced stress.....	108
Table 20. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after grading-induced stress.	109

Table 21. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to grading-induced stress.	110
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Fig 1. Exponential model fitting weight gain ($\text{g kg ABW}^{-1} \text{ day}^{-1}$) (A) and specific growth rate (%) (B) to dietary digestible protein level (%) in fish fed the experimental diets. Dietary digestible protein value is indicated by the abscissa value corresponding to 95% of the maximum response. Each graphic point represents the average value of each tank..... 64

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Exigência Proteica	13
2.2 Estresse em Sistema de Criação de Peixes	16
2.3 Fisiologia da Resposta ao Estresse	18
2.4 Estresse em Sistema de Criação: A Importância da Nutrição	19
2.5 Ferramentas para Estudo do Estresse em Peixes	21
3 REFERÊNCIAS	24

CAPÍTULO II

Desempenho e eficiência de utilização de dietas com níveis de proteína digestível pela tilápia-do-Nilo	33
Resumo	33
Abstract	34
1. Introdução	35
2. Material e Métodos	36
2.1 Dietas experimentais	36
2.2 Ensaio de crescimento	37
2.3 Ensaio de digestibilidade	38
2.4 Análises químicas	39
2.5 Parâmetros de crescimento e de utilização do alimento	39
2.6 Composição centesimal do fígado e músculo	41
2.7 Atividade enzimática	41
2.8 Análises estatísticas	43
3. Resultados	43
3.1 Ensaio de crescimento	43
3.2 Ensaio de digestibilidade	46
4. Discussão	46
5. Referências	50

CAPÍTULO III

Perfil hematológico e bioquímico da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo níveis de proteína digestível e submetida à diferentes fatores de estresse

.....	66
Resumo	66
Abstract	67
1. Introdução	68
2. Material e Métodos	69
2.1 Dietas experimentais.....	69
2.2 Animais e condições experimentais	70
2.3 Estresse por baixa temperatura.....	71
2.4 Estresse térmico.....	71
2.5 Estresse por transporte.....	72
2.6 Estresse por classificação.....	72
2.8 Análises hematológicas e bioquímicas	73
2.9 Análise estatística	74
3. Resultados	74
3.1 Perfil hematológico e bioquímico	74
3.2 Estresse por baixa temperatura.....	75
3.3 Estresse térmico.....	76
3.4 Estresse por transporte.....	77
3.5 Estresse por classificação.....	77
4. Discussão	78
4.1 Perfil hematológico e bioquímico anterior ao estresse	78
4.2 Desafios	79
5. Referências	85
CAPÍTULO IV	
IMPLICAÇÕES	112

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

A criação de peixes vem se consolidando como atividade agroindustrial de importância para a aquicultura nacional. Impulsionada pela estagnação da pesca extrativa, o setor aliado a técnicas de produção mais intensivas, tem alcançado elevados índices produtivos contribuindo significativamente para atender a demanda por pescados.

A tilápia-do-Nilo tem posição de destaque dentre as espécies de peixes cultivados, sendo sua criação praticada em quase todo território brasileiro. Dessa forma, diante de suas potencialidades, estudos relativos à qualidade e eficácia da ração na conversão em peso são primordiais para que a tilapicultura se configure como oportunidade de negócio (NOGUEIRA, 2007).

Em dietas para peixes, as proteínas correspondem ao nutriente de grande importância para seu desenvolvimento e, portanto, devem ser suplementadas em atendimento às necessidades da espécie para se obter adequado crescimento (ABDEL-TAWWAB, 2012; NUNES, 2011). Para tilápia-do-Nilo, a exigência em proteína tem sido investigada, o que tem possibilitado a formulação de dietas eficientes com base em nutrientes digestíveis melhorando, assim, o desempenho dos animais.

Contudo, embora seja importante formular rações a partir do conteúdo de nutrientes digestíveis, pelo fato de possibilitarem o correto balanceamento e assim melhores respostas zootécnicas, no atual contexto em que a piscicultura se insere configurada pela intensificação dos sistemas de produção e maximização de lucros, questões relativas à saúde e bem-estar animal têm demonstrado que apenas a otimização do desempenho não é suficiente para sustentar elevados índices produtivos (FALCON, 2007).

Isso porque, em condições intensivas de criação, a situação de estresse está constantemente presente e, sendo esta indutora de manifestações fisiológicas e comportamentais que podem resultar em danos ao crescimento, é importante que sejam desenvolvidas estratégias que possibilitem aumentar a resistência orgânica dos peixes, amenizando assim os efeitos prejudiciais das diferentes e inevitáveis situações de desafio a que são expostos (KIRON, 2012; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; TEIXEIRA, 2009).

Esta pesquisa objetivou avaliar as respostas de desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo frente ao fornecimento de dietas formuladas com base em nutrientes digestíveis e verificar, por intermédio da avaliação da condição fisiológica dos animais, se as exigências para ótimo crescimento são equivalentes àquelas em situações de estresse.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Exigência Proteica

Na piscicultura intensiva, para se obterem as respostas zootécnicas almejadas por intermédio do uso de rações processadas, a baixo custo, é necessário se ter conhecimento das exigências nutricionais das espécies criadas visando a formulação de dietas adequadas. Diante disso, várias pesquisas, nas mais diversas condições experimentais, foram desenvolvidas com o intuito de se determinar as exigências nutricionais para as principais espécies de interesse comercial visando o crescimento. Aspectos relativos às exigências em proteína, energia e à digestibilidade dos nutrientes têm sido reportadas.

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes e importantes às células animais, exibindo variedade de funções biológicas (NELSON; COX, 2011). Atuam como catalisadores, no transporte de moléculas, manutenção e formação dos tecidos, proteção imune, entre outras funções específicas (BICUDO, 2008; DEVLIN, 2003). Assim, devido à sua essencialidade em diversos processos metabólicos, a determinação do nível ideal em dietas para peixes é fundamental. Além disso, a proteína é exigida em elevadas quantidades pelos peixes se comparado aos animais terrestres, em torno de 24 a 50% de proteína bruta, dependendo da fase de desenvolvimento, do ambiente e da espécie (PEZZATO et al., 2004).

A constituição básica das proteínas são os aminoácidos, que estão covalentemente ligados por meio de ligações peptídicas (GUYTON; HALL, 2011; NELSON; COX, 2011). Portanto, peixes consomem proteína para obter aminoácidos e, assim, não possuem exigência verdadeira em proteína, mas sim em suprimento equilibrado de aminoácidos essenciais e não essenciais (BICUDO; CYRINO, 2009; PEZZATO et al., 2004). A proteína consumida pelos peixes é, então, digerida ou hidrolisada liberando

dipeptídeos, tripeptídeos e aminoácidos livres, que são absorvidos pelo epitélio intestinal e distribuídos por meio da corrente sanguínea para órgãos e tecidos (BICUDO, 2008; WU, 2013). Desta forma, segundo Bicudo (2008), há necessidade de consumo regular de proteína e aminoácidos, pois estes são continuamente utilizados pelos peixes, tanto para síntese de novas proteínas quanto para substituição de proteínas existentes (manutenção).

O fornecimento de dietas deficientes em proteína pode resultar em diminuição no crescimento (NOGUEIRA et al., 2005), enquanto que acima do exigido, o excedente é utilizado como fonte energética aumentando a excreção de resíduos nitrogenados, que são prejudiciais ao peixe e ambiente de criação (HAYASHI et al., 2002; NRC, 2011). Assim, além da máxima importância ao crescimento, questões relativas ao impacto ambiental são aspectos importantes que tornam indispensável os estudos relativos às exigências em proteína pelos peixes (RIBEIRO; RODRIGUES; FERNANDES, 2007).

As informações relacionadas às exigências em proteína são derivadas de experimentos dose-resposta, utilizando como critério de avaliação o desempenho proporcionado pelas dietas (COUTINHO, 2012; NRC, 2011; WILSON, 2002). Entretanto, a influência dos nutrientes sobre a fisiologia e metabolismo dos peixes também vem sendo investigada (AZAZA et al., 2015; SÁ et al., 2014), pois constituem importante ferramenta ao conhecimento da dinâmica de utilização da proteína (BICUDO, 2008).

Em peixes, a proteína pode ser utilizada eficientemente como fonte de energia, o que é devido à escassez de carboidratos no ambiente aquático, sugerindo serem os sistemas digestório e metabólico dos peixes adaptados à utilização de proteínas como fonte energética (LOVELL, 1989; MOYES; WEST, 1995). Além disso, a facilidade dos peixes em promover o catabolismo da proteína para produção de energia é, também, devido ao menor consumo energético atribuído ao modo de vida aquático (pecilotérmico e amoniotélico) (HALVER; HARDY, 2002; KAUSHIK; SEILIEZ, 2010; PEZZATO et al., 2004). Entretanto, a utilização da proteína como fonte de energia não é desejável e, por isso, é preferível do ponto de vista econômico, maior taxa de síntese (anabolismo) em favor do crescimento do que degradação (catabolismo) (HEPHER et al., 1989).

A utilização de fontes de energia não proteica tem demonstrado ser eficiente em melhorar a retenção de proteína e reduzir as perdas nitrogenadas em diferentes espécies de peixes, desde que, suplementado em quantidades adequadas. Em geral, aumentos no conteúdo de lipídeos podem diminuir o catabolismo da proteína e aminoácidos, entretanto, a utilização metabólica dos carboidratos é limitada e espécie-dependente (KAUSHIK; SEILEZ, 2010; NRC, 2011). Portanto, a fonte e nível de energia não proteica, que determina o balanço energia:proteína, é relevante e deve ser considerado nos estudos de nutrição com peixes. Esse aspecto implica em alterações no metabolismo intermediário que podem afetar, direta e/ou indiretamente, o aproveitamento dos nutrientes.

Para peixes herbívoros e onívoros, a utilização da proteína como fonte energética pode ser poupada pelo aumento do carboidrato da dieta, uma vez que tem demonstrado reduzir a atividade de enzimas do catabolismo de aminoácidos e a via gliconeogênica estimulando a atividade de enzimas glicolíticas (AZAZA et al., 2015; FERNÁNDEZ et al., 2007; FIGUEIREDO-SILVA et al., 2013; SÁ et al., 2014). Por outro lado, os efeitos sobre a lipogênese são contraditórios, demonstrando aumentos na atividade de enzimas geradoras de NADPH, requerido para síntese de ácidos graxos, como também diminuição e até mesmo ausência de regulação sobre esta via (PÉREZ-JIMENEZ et al., 2009, 2015; SÁ; POUSÃO-FERREIRA; OLIVA-TELES, 2007, 2008; SÁ et al., 2014). Nesse sentido, diferenças nas respostas metabólicas são esperadas e, portanto, devem ser investigadas para melhor definição das exigências em proteína pelos peixes, principalmente em relação às espécies de maior importância para a aquicultura.

A tilápia-do-Nilo, devido ao rápido crescimento e excelente desempenho em sistemas intensivos de criação, encontra-se entre as espécies de peixes mais cultivada no mundo (DIÓGENES et al., 2015; MICHELATO et al., 2015; SANTOS et al., 2009) e, por isso, suas exigências em proteína tem sido investigada. As estimativas variam de 26,8 a 45% para proteína bruta (ABDEL-TAWWAB et al., 2010; EL-SAYED; MANSOUR; EZZART, 2003; EL-SAYED; KAWANNA, 2008; FURUYA et al., 2000, 2010; LARUMBE-MORÁN et al., 2010; MABROKE et al., 2012), e de 24,3 a 38,6% em valores digestíveis (FERNANDES JUNIOR, 2012; FURUYA et al., 2005, 2010; HAYASHI et al., 2002; KOCH, 2013; RIGHETTI et al., 2011; SOUSA et al., 2013) dependendo da fase de desenvolvimento, ambiente de criação e relação

energia:proteína. Assim, apesar dos valores de exigência previamente estabelecido, é oportuno que o atendimento das necessidades nutricionais, com ênfase na capacidade do animal em aproveitar os nutrientes presentes na dieta seja avaliado nos estudos de nutrição com tilápias.

2.2 Estresse em Sistema de Criação de Peixes

A definição de estresse é bastante ampla, no entanto em essência, é definido como conjunto de respostas fisiológicas adaptativas e comportamentais do organismo, mediadas por ação de estímulos desagradáveis, agressivos e ameaçadores (CHROUSOS, 1998; URBINATI; CARNEIRO, 2004; WENDELAAR BONGA, 1997). As respostas adaptativas visam o restabelecimento homeostático e promovem melhores chances de sobrevivência frente às adversidades. Contudo, a contínua exposição à estímulos severos e de longa duração podem tornar disfuncionais os mecanismos de resposta compensatória e efeitos deletérios podem tornar-se aparentes (BARTON; IWAMA, 1991; BARTON, 2002; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; WENDELAAR BONGA, 1997).

De acordo com Tort (2011), a reorganização metabólica em resposta a estímulos perturbadores pode afetar a eficiência de outras funções, entre elas, a do sistema imune. O autor enfatiza que alguns mecanismos de defesa podem ser prejudicados comprometendo transitoriamente a defesa imune e resistência a patógenos. Silva et al. (2012) constataram experimentalmente que a severidade do estresse (aumento do intervalo de exposição dos peixes ao ar) pode reduzir o número total de células circulantes relacionadas à defesa orgânica, o que implica em queda na resistência imunológica predispondo os animais a quadros de infecção patogênica (FALCON et al., 2008).

Os sistemas hormonais envolvidos na regulação do crescimento bem como em eventos reprodutivos também podem ser afetados pelo estresse, ocasionando redução da taxa de crescimento e inibição do desempenho reprodutivo de peixes (SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009; SMALL, 2004; URBINATI; CARNEIRO, 2004). Diante desse aspecto, maior atenção deve ser atribuída aos prejuízos decorrentes da ação de agentes estressores.

O ambiente aquático, por ser dinâmico, predispõe os peixes a ampla variedade de estímulos adversos, que estimulam os animais a ajustarem seus mecanismos fisiológicos adaptativos, possibilitando as reações de luta e fuga (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; SUMPTER, 1997; WEDEMEYER, 1996). No entanto, sob condições de criação intensiva esses desafios se somam às intervenções inerentes ao processo produtivo (LIMA et al., 2006), conduzindo ao estresse cumulativo. Os efeitos do estresse cumulativo, comumente associados aos manejos da produção piscícola, pode prejudicar a produtividade (FERREIRA; GIL BARCELLOS, 2008). Devido à isso, para que o empreendimento se torne lucrativo é necessário que sejam reconhecidas as operações que, individualmente ou em conjunto, podem impor estresse no sistema fisiológico dos peixes assegurando assim maior sobrevivência dos animais.

Entre as várias práticas de manejo às quais os peixes estão submetidos, e que são consideradas estressantes, estão a captura, classificação, confinamento e transporte (URBINATI; CARNEIRO, 2004). O transporte é etapa muito importante na piscicultura e, ao mesmo tempo, é considerada potente fonte de estresse para os peixes. Isso porque expõe os peixes a uma sucessão de estímulos adversos, incluindo a captura, manuseio, adensamento, transporte propriamente dito, descarregamento e a estocagem dos peixes no local de destino (ACERETE et al., 2004; BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006; URBINATI; CARNEIRO, 2004). Semelhantemente, a classificação é fundamental para obtenção de lotes homogêneos, sendo intervenção realizada rotineiramente nos sistemas de criação intensivos (tanques-rede) que submetem os peixes a procedimentos traumáticos, como o adensamento, a captura e exposição ao ar.

As alterações do ambiente aquático em sistema de criação, tais como as variações de temperatura, também atuam como fatores de estresse para os animais. Os peixes por serem animais ectotérmicos, apresentam variação na velocidade dos processos metabólicos em função da temperatura da água, exibindo limites de tolerância térmica (URBINATI; CARNEIRO, 2004). A exposição a temperaturas acima ou abaixo da faixa de conforto expõe os peixes a situação de estresse determinando alterações que podem prejudicar suas funções fisiológicas (COSSINS; SCHWARZBAUM; WIESER, 1995; PORTZ; WOODLEY; CECI, 2006; WENDELAAR BONGA, 1997).

2.3 Fisiologia da Resposta ao Estresse

As respostas geradas pelo organismo animal frente às situações de estresse são classificadas em primárias, secundárias e terciárias (WENDELAAR BONGA, 1997). Primeiramente, as respostas fisiológicas compreendem o reconhecimento do agente estressor pelo sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal, resultando na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteróides (cortisol) no plasma (FALCON, 2007; MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; OLIVEIRA, 2008; URBINATI; CARNEIRO, 2004; WENDELAAR BONGA, 1997). Com isso, os efeitos primários do estresse estão correlacionados às variações na concentração plasmática de cortisol e catecolaminas, as quais induzem mudanças fisiológicas e bioquímicas que caracterizam a resposta secundária.

A secreção de cortisol é controlada principalmente pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é liberado pela glândula pituitária anterior. Uma vez atingida a corrente sanguínea, este último, chegando às células interrenais do rim cefálico, estimula a produção e liberação do hormônio corticosteróide (cortisol), o qual age por meio de seu receptor em muitos tipos de células-alvo, alterando o metabolismo celular (HORI, 2005; NELSON; COX, 2011).

O cortisol, em sua função glicocorticoide, estimula a glicogenólise no fígado, ocasionando hiperglicemia, além de estimular a gliconeogênese neste mesmo órgão (VIJAYAN et al., 1994). O efeito dessas alterações metabólicas é a restauração dos níveis normais de glicose sanguínea e aumento dos estoques de glicogênio, para dar suporte à resposta de luta e fuga comumente associada ao estresse (NELSON; COX, 2011). Este hormônio age também sobre o tecido adiposo e muscular disponibilizando ao organismo, por meio do catabolismo de lipídeos e proteínas, maior aporte de substratos energéticos para manejar a situação estressante (URBINATI; CARNEIRO, 2004; VIJAYAN et al., 1994).

A ação catecolaminérgica exerce influência sobre o sistema cardiovascular, promovendo a dilatação dos vasos sanguíneos branquiais, por aumento da pressão sanguínea, para aumentar a perfusão nas lamelas e facilitar a captação de oxigênio, favorecendo assim maior distribuição e utilização deste pelos tecidos corporais

(BARCELLOS et al., 2004; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; URBINATI; CARNEIRO, 2004).

No entanto, esse efeito determina aumento da permeabilidade branquial resultando em influxo de água e saída de íons do sangue para o meio externo, no caso de peixes de água doce, afetando a regulação osmótica e iônica. Contudo, o cortisol frente à sua função mineralocorticóide, é capaz de estimular os mecanismos de transporte iônico presente nas brânquias, promovendo a diferenciação das células-cloreto que aumentam a atividade de enzimas envolvidas no transporte de íons (WENDELAAR BONGA, 1997). Segundo Oba, Mariano e Santos (2009), esses efeitos são importantes durante o período de recuperação do estresse, quando o peixe busca manter o suprimento de oxigênio para os tecidos e restaurar o equilíbrio osmorregulatório.

Entretanto, a importante função desses hormônios, em suprir a demanda energética dos peixes em situações de estresse, pode perder seu valor adaptativo mediante à contínua exposição a estímulos adversos. Tal condição resulta em efeitos terciários, tais como retardo no crescimento, diminuição da resposta imune e resistência a patógenos. Este nível de resposta, caracterizado pela impossibilidade de adaptação do organismo, pode conduzir à morte (BARTON, 1997).

2.4 Estresse em Sistema de Criação: A Importância da Nutrição

A definição de protocolos para a redução do estresse em peixes visando identificar ferramentas para diminuir as consequências negativas da criação, vem sendo objeto de diversas pesquisas (INOUE et al., 2005; TAKAHASHI et al., 2006; URBINATI et al., 2004). Contudo tais procedimentos, embora tenham se mostrado eficientes diminuindo perdas substanciais durante a criação, por vezes não consideram aspectos relativos à condição nutricional do organismo. Sabe-se, no entanto, que a dieta é fator essencial para o crescimento e manutenção das funções vitais, como respostas a estressores e defesas imunológicas (SANTOS; OBA, 2009).

Com isso é necessário que os peixes sejam nutridos a partir do desenvolvimento de estratégias que favoreçam a saúde e resistência orgânica dos animais tornando-os aptos a responder aos desafios impostos (TEIXEIRA, 2009). No que se refere aos mecanismos de preparo dos peixes para transpor situações adversas, via nutrição, sabe-

se que tanto os macronutrientes (proteína, lipídeos e carboidratos) como os micronutrientes (vitaminas e minerais) desempenham, direta ou indiretamente, papel preponderante na defesa do organismo frente às perturbações.

Em estudo conduzido por Li et al. (2014), a administração de dietas suplementadas com óleo de linhaça (2 ou 4%) mostrou ser benéfica na prevenção dos efeitos adversos do estresse em *Pelteobagrus vachelli*. Esses autores não observaram influência ($P > 0,05$) da exposição prévia à amônia ($0,01$ ou $5,70 \text{ mg L}^{-1}$) sobre o hemograma dos peixes alimentados com as diferentes dietas, indicando que o óleo de linhaça, rico em ácido linolênico, é capaz de ajustar os distúrbios fisiológicos causados pela elevada concentração de amônia.

A oferta de dietas com $0,1\%$ de β -glucano obtido da parede celular da levedura *Saccharomices cerevisae* e 600 mg de vitamina C kg^{-1} , por pelo menos 15 dias, também determinou aumento da resistência orgânica da tilápia-do-Nilo frente ao estresse e desafio bacteriano (BARROS et al., 2014). De acordo com os autores, esses componentes podem ser utilizados pela indústria de rações como uma estratégia nutricional para reduzir as perdas econômicas devido às situações adversas inerentes ao sistema intensivo de produção.

Quanto à proteína, alguns estudos evidenciam que este nutriente pode atuar de forma benéfica nos mecanismos de resposta ao estresse em peixes quando suplementada adequadamente. Isso porque disponibilizam, a esses animais, maior aporte de substratos gliconeogênicos para lidar com situações em que a homeostase é perturbada (KUMAR et al., 2011).

Entretanto, em níveis abaixo do exigido, o direcionamento de aminoácidos para a produção de energia exigida para manejar a situação estressora, comprometerá a deposição proteica reduzindo a eficiência de utilização dos aminoácidos para a síntese de proteínas relacionadas ao crescimento (CONCEIÇÃO et al., 2012; HOULIHAN, 1991). Isto torna claro que o conhecimento das exigências nutricionais não está condicionado unicamente às exigências para máximo crescimento, mas também ao provimento de substratos que conferem maior resistência ao estresse e a doenças.

Ciji et al. (2013) reafirmaram a hipótese ao verificar em seu estudo que dietas formuladas em atendimento as exigências de triptofano ($0,35\%$ da dieta), para juvenis de *Labeo rohita*, foram menos efetivas em combater o estresse (exposição ao nitrito) do

que dietas formuladas em níveis superiores ao necessário (no mínimo 0,75% da dieta). Isto pode ser devido ao fato do triptofano ser precursor de serotonina que tem demonstrado regular a produção de glicocorticoides (BASIC et al., 2013; CIIJ et al., 2013; HOSSEINI; HOSEINI, 2013; TEJPAL et al., 2014) e, portanto, para estes animais o ganho em peso foi significativamente superior em relação aos grupos alimentados com dietas que atenderam as exigências e submetidos ao estímulo.

Dessa forma, embora a importância da incorporação em quantidades adequadas para a manutenção da higidez não se aplicar somente às proteínas, estudos que envolvam as implicações dos teores de proteína da dieta sobre aspectos de saúde se constituem em importante ferramenta, tendo em vista ser este nutriente de máxima importância para o crescimento. Adicionalmente, o entendimento da nutrição para o provimento de estratégias mitigadoras do efeito do estresse é necessário para possibilitar ao peixe a manutenção da sua homeostase nas diferentes e inevitáveis situações as quais são impostos nos atuais sistemas intensivos de produção (BARROS et al., 2014).

2.5 Ferramentas para Estudo do Estresse em Peixes

A hematologia é considerada importante instrumento no conhecimento das alterações fisiológicas dos peixes, permitindo avaliar as condições de defesa orgânica e identificar as respostas dos animais frente aos desafios de criação de forma eficaz (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; RANZANI-PAIVA et al., 2013). Assim, o estudo dos componentes do sangue pode servir como ferramenta para se estabelecer diagnósticos em peixes, visto refletir de forma rápida e eficiente as alterações (AZEVEDO et al., 2006; RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

O aumento da captação de oxigênio percebida pela ação catecolaminérgica em resposta ao estresse pode contribuir para que ocorram mudanças nos valores de hemoglobina, de eritrócitos e hematócrito (BENDHAK, 2008). Chagas et al. (2012) observaram elevação na taxa de hemoglobina após o transporte de juvenis de tambaquis, o que é decorrência do aumento da necessidade de transporte de oxigênio no sangue para suprir a demanda extra de energia do organismo frente ao estímulo.

De modo similar, os valores de hemoglobina se elevaram quando juvenis de *Carassius auratus* foram mantidos em um ambiente com baixas concentrações de

oxigênio dissolvido (SUN et al., 2012). Provavelmente, segundo esses autores, a estimulação da eritropoiese e a consequente liberação de células vermelhas no sangue induzido pelo estresse contribuíram para a elevação desses níveis.

Por outro lado Kpundeh et al. (2013) observaram que sob condições de elevada densidade de estocagem (33 peixes/m³), há redução no número de células vermelhas e brancas, bem como no valor do hematócrito e hemoglobina em juvenis de tilápia GIFT. Contudo, embora associado à redução da ingestão do alimento, neste estudo avaliou-se o efeito do número de animais alocados por m³ conjuntamente com a taxa de renovação de água inadequada (zero) que, mesmo mantendo-se suprimento constante de oxigênio, a exposição dos animais à amônia e ao nitrito durante o período avaliado (30 dias) pode ter afetado o consumo de oxigênio pelos peixes, interferindo nos resultados obtidos. De acordo com Ciji et al. (2013) a ação do nitrito sobre as células vermelhas resulta na formação de metahemoglobina que, sendo incapaz de transportar o oxigênio pode causar distúrbios como a redução nas taxas de hemoglobina e percentual de hematócrito, bem como na contagem de células vermelhas.

Assim, apesar da importância da hematologia como ferramenta para avaliação do quadro homeostático em peixes, o estudo do sangue como medida estratégica será bem aceito desde que consideradas as peculiaridades relacionadas ao estímulo que os peixes são submetidos, à espécie criada, à biologia e ao hábito ecológico (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Além do hemograma, a composição bioquímica do plasma e soro sanguíneo é considerada importante ferramenta no diagnóstico da higidez dos peixes. Por meio desta análise é possível detectar alterações no funcionamento dos órgãos e a adaptação do animal diante dos desafios fisiológicos e desequilíbrios metabólicos, específicos ou de origem nutricional (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2003).

Vários parâmetros bioquímicos têm sido utilizados como indicadores da resposta ao estresse em peixes. Falahatkar et al. (2014), avaliando os efeitos de diferentes níveis de ácido ascórbico (0, 100, 200, 400, 800 e 1600 mg kg⁻¹) na dieta sobre o perfil hematológico e bioquímico do esturjão branco, antes e após ao estresse por hipóxia (exposição ao ar por dois minutos), puderam sugerir a partir dos teores de glicose e cortisol que a suplementação da vitamina pode atuar de forma benéfica no restabelecimento da homeostase em níveis superiores a 200 mg kg⁻¹.

De modo similar, entretanto, comparando-se os parâmetros sanguíneos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo submetida à exposição ao ar e alimentada com dieta comercial, Silva et al. (2012) puderam diagnosticar a partir dos níveis séricos de colesterol, glicose, cálcio e sódio, ocorrência de estresse fisiológico.

Com base nas informações apresentadas, a proposta deste estudo foi avaliar as respostas de desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo níveis de proteína digestível e verificar, por intermédio da avaliação da condição fisiológica dos animais, se as exigências para ótimo crescimento são equivalentes àquelas em situações de estresse.

Diante deste propósito, o projeto constituiu-se na realização de um experimento composto por três fases distintas. Na fase I foram avaliados os coeficientes de digestibilidade aparente e o desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-Nilo frente ao fornecimento de dietas contendo níveis de proteína digestível de 20, 23, 26, 29 e 32%, enquanto que na fase II foi avaliada a condição nutricional e metabólica dos animais alimentados com as diferentes dietas. Na fase III do experimento foi analisado o perfil hematológico e bioquímico dos peixes nas diferentes condições nutricionais, antes e após a exposição a fatores de estresse.

Os resultados obtidos são apresentados em dois capítulos – Capítulo II, intitulado “Desempenho e eficiência de utilização de dietas com níveis de proteína digestível pela tilápia-do-Nilo” e Capítulo III, intitulado “Perfil hematológico e bioquímico da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo níveis de proteína digestível e submetida à diferentes fatores de estresse” – redigidos de acordo com as normas de publicação da revista **Aquaculture**.

3 REFERÊNCIAS

ABDEL-TAWWAB, M. Interactive effects of dietary protein and live bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry and their challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture International**, v. 20, p.317-331, 2012.

ABDEL-TAWWAB, M. et al. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). **Aquaculture**, v. 298, p.267-274, 2010.

ACERETE, L. et al. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v. 237, n. 1-4, p.167-178, 2004.

AZAZA, M.S. et al. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. **Aquaculture Research**, v. 46, p.14-27, 2015.

AZEVEDO, T.M.P. et al. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no Vale do Rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, p. 229-236, 2004.

BARROS, M.M. et al. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 39, p.188-195, 2014.

BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: IWAMA, G.K. et al. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University Press. 1997. p.1-33.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p.517-525, 2002.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Reviews of Fish Diseases**, v. 10, p.3-26, 1991.

BASIC, D. et al. Short- and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo solar*). **Aquaculture**, v. 388-391, p.8-13, 2013.

BENDHACK, F. **Respostas fisiológicas do matrinxã *Brycon amazonicus* após mudança de ambientes com diferentes concentrações de sais de cálcio e de sódio**. 2008. 97 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2008.

BICUDO, A.J.A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos**. 2008. 122p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E.P. Estimating amino acid requirement of brazilian freshwater fish from muscle amino acid profile. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 40, n. 6, p.818-823, 2009.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p.349-356, 2006.

CHAGAS, E.C. et al. Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com β -glucano. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p.221-227, 2012.

CHROUSOS, G.P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p.311-335, 1998.

CIJI, A. et al. Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite. **Aquaculture Research**, p.1-12, 2013.

CONCEIÇÃO, L.E.C. et al. Dietary nitrogen and fish welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p.119-141, 2012.

COSSINS, A.R.; SCHWARZBAUM, P.J.; WIESER, W. Effects of temperature on cellular ion regulation and membrane transport systems. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. (eds). **Biochemistry and molecular biology of fishes**, vol 5. Amsterdam: Elsevier, 1995. p.101–126.

COUTINHO, F.F. **Dietary protein requirement and intermediary metabolism response to protein/carbohydrate ratio in zebra seabream (*Diplodus cervinus*, Lowe 1838) juveniles**. 2012. 48 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos) – Universidade do Porto, Portugal, 2012.

DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 5 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2003. 1084p.

DIÓGENES, A.F. et al. Establishing the optimal essential amino acids ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method. **Aquaculture Nutrition**, 1-9, 2015.

EL-SAYED, A.M.; MANSOUR, C.R.; EZZAT, A.A. Effects of dietary protein level on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. **Aquaculture**, v. 220, p.619-632, 2003.

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

FALAHATKAR, B. et al. The role of dietary L-ascorbyl-2-polyphosphate on the growth and physiological functions of beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research**, 2014, p.1-14.

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

FALCON, D.R. et al. Leucograma da tilápia-do-Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetida a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p.543-551, 2008.

FERNANDES JUNIOR, A.C. **Proteína energia digestíveis e colina para tilápia-do-Nilo: desempenho e respostas fisiológicas em condições de estresse**. 2012. 138p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

FERNÁNDEZ, F. et al. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 343, n. 1, p.1-10, 2007.

FERREIRA, D.; GIL BARCELLOS, L.J. Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p.601-611, 2008.

FIGUEIREDO-SILVA, A.C. et al. A comparative study of the metabolic response in rainbow trout and Nile tilapia to changes in dietary macronutrient composition. **British Journal Nutrition**, v. 109, n. 5, p.816-826, 2013.

FURUYA, W.M. et al. Exigência de proteína para alevino revertido de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p.1912-1917, 2000.

FURUYA, W.M. et al. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p.1433-1441, 2005.

FURUYA, W.M. et al. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010, 100p.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. In: Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, 1, 2003, Porto Alegre: **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 73-89.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151p.

HALVER, J.E.; HARDY, R.W. Nutrient flow and retention. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Eds.), **Fish Nutrition**. New York: Academic Press, 2002. p. 755-770.

HAYASHI, C. et al. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p.823-828, 2002.

HEPHER, B. et al. Principles of fish nutrition. In: SHILO, M.; SARIG, S. **Fish culture in warm water systems: problems and trends**. Boca Raton: CRC, 1989. p.121-141.

HORI, T.S.F. **Impacto da exposição crônica ao fenol no metabolismo, fisiologia e resposta ao estresse de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*: Teleostei; Characidae)**. 2005. 119p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2005.

HOSSEINI, S.A.; HOSEINI, S.M. Effect of dietary tryptophan on stress response of wild common carp *Cyprinus carpio* L. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 5, p.49-55, 2013.

HOULIHAN, D.F. Protein turnover in ectotherms and implications for energetics. In: GILLES, R. (Ed.) **Advances in Comparative and Environmental Biology**. Berlin: Springer-Verlag, v.7. p.1-43, 1991.

INOUE, L.A.K.A. et al. Effects of clove oil the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v. 35, n. 2, p.289-295, 2005.

KAUSHIK, S.J.; SEILIEZ, I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. **Aquaculture Research**, v. 41, p.322-332, 2010.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p.111-133, 2012.

KUMAR, S. et al. High dietary protein combats the stress of *Labeo rohita* fingerlings exposed to heat shock. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p.1005-1019, 2011.

KOCH, J.F.A. **Níveis de proteína e energia digestíveis para tilápia-do-Nilo criada em tanques-rede na fase de terminação**. 2013. 106p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2013.

KPUNDEH, M.D. et al. Stocking densities and chronic zero culture water exchange stress' effects on biological performances, hematological and serum biochemical indices of GIFT tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). **Journal Aquaculture Research Development**, v. 4, n. 5, p.1-6, 2013.

LARUMBE-MORÁN, E. et al. Protein requirements of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry cultured at different salinities. **Aquaculture Nutrition**, v. 41, p.1150-1157, 2010.

LI, M. et al. Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and *Edwardsiella ictaluri* challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 38, p.158-165, 2014.

LIMA, L.C. et al. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3/4, p. 113-117, 2006.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 260p.

MABROKE, R.S. et al. Influence of dietary protein on growth, reproduction, seed chemical composition and larval survival rate of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstocks of different size groups under hapa-in-pond hatchery system. **Journal of the Arabian Aquaculture Society**, 7, 203-220, 2012.

MICHELATO, M. et al. Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast-growing Nile tilapia. **Aquaculture Nutrition**, 1-8, 2015.

MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M.; MOON, T. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p.211-268, 1999.

MOYES, C.D.; WEST, T.G. Exercise metabolism in fish. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. **Biochemistry and molecular biology of fishes**, vol. 4. Amsterdam: Elsevier Press, 1995. p.367-392.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp** Washington: DC. National Academies Press, 2011. 376p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

NOGUEIRA, G.C.C.B. et al. Desempenho produtivo de juvenis de trairão (*Hoplias lacerdae*) alimentados com rações comerciais. **Revista Ceres**, v. 52, n. 302, p. 491-497, 2005.

NOGUEIRA, A. **Criação de tilápias em tanques-rede**. Salvador: Sebrae Bahia, 2007. 23p.

NUNES, C.S. **Crescimento, hematologia e metabolismo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido ao exercício aeróbico e alimentado com níveis crescentes de proteína**. 2011. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009.

OLIVEIRA, S.R. **Efeito do levamisol sobre o desempenho produtivo e como mitigador do estresse ao transporte em matrinxã (*Brycon amazonicus*)**. 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A. et al. Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*) Effects on intermediary metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 152, p.314-321, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A. et al. Nutritional and metabolic responses in common dentex (*Dentex dentex*) fed on different types and levels of carbohydrates. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 184, p.56-64, 2015.

PEZZATO, L.E. et al. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart, 2004. p. 75-169.

PORTZ, D.E.; WOODLEY, C.M.; CECH, J.J. Stress-associated impacts of short-term holding of fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 16, n. 2, p.125-170, 2006.

RANZINI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 89-120.

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

RIBEIRO, F.A.A.; RODRIGUES, L.A.; FERNANDES, J.B.K. Desempenho de juvenis de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) com diferentes níveis de proteína bruta na dieta. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 2, p.195-203, 2007.

RIGHETTI, J.S. et al. Redução da proteína em dietas para tilápias-do-Nilo por meio da suplementação de aminoácidos com base no conceito de proteína ideal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 469-476, 2011.

SÁ, R.; POUSÃO-FERREIRA, P.; OLIVA-TELES, A. Growth performance and metabolic utilization of diets with different protein: carbohydrate ratios by white sea bream (*Diplodus sargus*, L.) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 1, p.100-105, 2007.

SÁ, R.; POUSÃO-FERREIRA, P.; OLIVA-TELES, A. Effect of dietary starch source (normal versus waxy) and protein levels on the performance of white sea bream *Diplodus sargus* (Linnaeus) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 10, p.1069-1076, 2008.

SÁ, R. et al. Dietary protein requirement of Patagonian blennie (*Eleginops maclovinus*, Cuvier 1830) juveniles. **Aquaculture**, v. 428-429, p.125-134, 2014.

SANTOS, L.R.B.; OBA, E.T. Dieta: ferramenta importante para manejo dos peixes no cultivo. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009.

SANTOS, E.L. et al. Digestibilidade aparente do farelo de coco e resíduos de goiaba pela tilápia do Nilo. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p.175-180, 2009.

SILVA, R.D. et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, supl. 1, p.99-107, 2012.

SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; PONTES, E.C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 4, p.1001-1017, 2009.

SMALL, B.C. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.589-596, 2004.

SOUSA, S.M.N. et al. Growth of Nile tilapia post-larvae from broodstock fed diet with different levels of digestible protein and digestible energy. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 8, p.535-540, 2013.

SUMPTER, J.P. The endocrinology of stress. In: IWAMA, G.K. et al. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge, UK: Cambridge University, 1997. p.95-118.

SUN, H. Responses of crucian carp *Carassius auratus* to long-term exposure to nitrite and low dissolved oxygen levels. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p.224-232, 2012.

TAKAHASHI, L.S. et al. Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 28, n. 4, p. 469-475, 2006.

TEIXEIRA, C.P. **Suplementação de vitamina B6 em dietas práticas e purificadas no desempenho produtivo e resposta hemática da tilápia do Nilo submetida a estímulo térmico**. 2009. 45 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

TEJPAL, C.S. et al. Effect of dietary supplementation of L-tryptophan on thermal tolerance and oxygen consumption rate in *Cirrhinus mrigala* fingerlings under varied stocking density. **Journal of Thermal Biology**, v. 41, p.59-64, 2014.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p.1366-1375, 2011.

URBINATI, E.C. et al. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture**, v. 229, p.389-400, 2004.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P. et al. **Tópicos especiais de piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart, 2004. p.171-194.

VIJAYAN, M.M. et al. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout. A study using the steroid analog RU486. **General Comparative Endocrinology**, v. 96, p.75-84, 1994.

WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. Chapman & Hall, Nova York. 1996. 232p.

WENDERLAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p.591-625, 1997.

WILSON, R.P. Amino acids and proteins. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Eds.), **Fish Nutrition**. New York: Academic Press, 2002. p. 143–179.

WU, G. **Amino acids: biochemistry and nutrition**. Boca Raton: CRC Press. 2013. 481p.

CAPÍTULO II

**Desempenho e eficiência de utilização de dietas com níveis de proteína digestível
pela tilápia-do-Nilo**

Desempenho e eficiência de utilização de dietas com níveis de proteína digestível pela tilápia-do-Nilo

Resumo: A pesquisa objetivou determinar os coeficientes de digestibilidade e avaliar as respostas de desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo níveis de proteína digestível (PD) de 22,1; 25,6; 28,6; 31,9 e 33,9%, bem como avaliar a condição nutricional e metabólica dos animais mediante a determinação da atividade de enzimas do metabolismo intermediário. 440 alevinos ($9,27 \pm 0,22$ g) foram aleatoriamente distribuídos em 40 aquários (250 L), perfazendo cinco tratamentos e oito repetições. As dietas foram ofertadas à vontade em quatro porções diárias. Ao final de 110 dias foram avaliados parâmetros de desempenho zootécnico e de eficiência de utilização do alimento, como também coletadas amostras de fígado e músculo para avaliação da atividade enzimática e composição centesimal dos tecidos. O peso final, ganho em peso e eficiência alimentar foram inferiores ($P < 0,05$) para peixes que receberam a dieta contendo 22,1% PD. Efeito inverso foi verificado para consumo de ração, lipídeos e energia. A energia bruta e o teor de lipídeos da carcaça foram superiores ($P < 0,05$) para peixes que receberam as dietas contendo 22,1 e 28,6% PD, enquanto que a proteína bruta foi mais elevada ($P < 0,05$) para peixes alimentados com as dietas contendo 31,9 e 33,9% PD. Os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e energia bruta foram mais elevados ($P < 0,05$) para dietas com 22,1 e 25,6% PD. Com relação à proteína bruta observou-se menores coeficientes para o nível de 28,6% PD. A dieta de maior conteúdo proteico (33,9%) determinou concentrações de proteína hepática mais elevadas ($P < 0,05$), enquanto que, lipídeos e glicogênio foram maiores ($P < 0,05$) para dieta de menor proteína (22,1%). A atividade das enzimas do metabolismo intermediário dos aminoácidos (ALT e GDH) e gliconeogênese (FBPase) foram maiores ($P < 0,05$) para dietas de elevada proteína (31,9 e 33,9%). A lipogênese (ME), via glicolítica (HK-IV e HK) e das pentoses-fosfato (G6PD) foram estimuladas ($P < 0,05$) com a redução do conteúdo de PD. A exigência em PD para tilápia-do-Nilo foi estimada em 29,2%, concordando com os valores estabelecidos para esta espécie. Contudo, a redução do nível de proteína e, concomitante, aumento do amido da dieta diminuiu a gliconeogênese e aumentou a lipogênese.

Palavras-chave: exigência proteica, nutrição, *Oreochromis niloticus*, piscicultura

Growth performance and efficiency of diets with levels of digestible protein by Nile tilapia

Abstract: This research aimed to evaluate the digestibility coefficients and growth performance of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein (DP) of 22.1, 25.6, 28.6, 31.9 and 33.9%, as well as evaluate the metabolic and nutritional condition of fish by determining the activity of key enzymes of intermediary metabolism. We used 440 fingerlings (9.27 ± 0.22 g), randomly distributed in 40-250 L aquaria, and fed for 110 days with experimental diets. The experimental design was entirely randomized with five treatments and eight replicates. At the end of feed trial we evaluate growth parameters and feed efficiency, as also collected samples of liver and muscle to evaluation of enzyme activity and proximate composition of tissues. Final weight, weight gain and feed efficiency were lower ($P < 0.05$) for fish fed diet containing 22.1% DP. Contrary effect was observed for feed intake, lipids and energy. Whole-body crude energy and lipid content were higher ($P < 0.05$) for fish fed diets containing 22.1 and 28.6% DP while whole-body protein content was higher ($P < 0.05$) for fish fed diets containing 31.9 and 33.9% DP. Digestibility coefficients of dry matter and crude protein were higher ($P < 0.05$) for diets containing 22.1 and 25.6% DP. Regarding to crude protein was observed lower coefficients for level of 28.6% DP. Fish fed diets containing 33.9% DP showed higher ($P < 0.05$) concentration of hepatic protein while lipids and glycogen were higher ($P < 0.05$) for fish fed diets containing lower protein (22.1%). Activity of key enzymes of amino acid catabolism (ALT and GDH) and gluconeogenesis (FBPase) was higher ($P < 0.05$) for diets of high protein (33.9 and 33.9%). Lipogenesis (ME), glycolysis (HK-IV and HK) and pentose phosphate pathway (G6PD) were stimulated ($P < 0.05$) with the reduction of DP. Digestible protein requirement for Nile tilapia was estimated to be 29.2%, agreeing with the values established for this species. However, the reduction of protein level and concomitant increase of the diet starch decreased the gluconeogenesis and increased the lipogenesis.

Key words: protein requirement, nutrition, *Oreochromis niloticus*, fish farming

1. Introdução

Na piscicultura intensiva, a nutrição é considerada fator crítico, pois influencia o crescimento e saúde dos peixes, além de inferir significativamente no custo total de produção (Gatlin III, 2002; Teoh et al., 2011; Azaza et al., 2015). Dessa forma, a busca por dietas eficientes é condição fundamental para se alcançar adequada produtividade e efetivo ganho financeiro. Nesse sentido, é necessário que as exigências nutricionais dos animais sejam conhecidas, principalmente em relação à proteína, nutriente de máxima importância e, geralmente um dos mais onerosos (Coutinho et al., 2014; Deng et al., 2014; González-Rodríguez et al., 2014).

Devido ao rápido crescimento, tolerância a diferentes condições ambientais e elevada qualidade da carne, a tilápia-do-Nilo encontra-se entre as espécies de peixes mais cultivada no mundo, sendo particularmente importante para economia de muitos países em desenvolvimento (Berto et al., 2015; Diógenes et al., 2015; Michelato et al., 2015). A exigência em proteína para esta espécie tem sido investigada e variam de 26,8 a 45% para proteína bruta (Furuya et al., 2000, 2010; El-Sayed et al., 2003; El-Sayed e Kawanna, 2008; Abdel-Tawwab et al., 2010; Larumbe-Morán et al., 2010; Mabroke et al., 2012), e de 24,3 a 38,6% em valores digestíveis (Hayashi et al., 2002; Furuya et al., 2005, 2010; Sousa et al., 2013) dependendo da fase de desenvolvimento, ambiente de criação e relação energia:proteína.

O fornecimento de dietas com adequado teor de proteína digestível, além de possibilitar o aproveitamento eficiente da fração proteica, reduz a produção de resíduos nitrogenados excretados na água, que são prejudiciais ao peixe e ambiente de criação (Hayashi et al., 2002; NRC, 2011). Entretanto, a eficiência de utilização da proteína pelos peixes está atrelada não somente à qualidade e nível ótimo de suplementação, mas também à presença de outros nutrientes que influenciam sua utilização metabólica (Azaza et al., 2009; Sá et al., 2014; Azaza et al., 2015). Portanto, em estudos de nutrição é importante considerar também os efeitos da composição da dieta sobre as respostas fisiológicas e metabólicas dos peixes. A compreensão de como esses animais utilizam a proteína e o que acontece *in vivo* durante o crescimento é fator importante ao manejo de criação pois, possibilita maximizar a eficiência de conversão do alimento e reduzir custos (Jin et al., 2015), aspectos estes relevantes à competitividade da tilapicultura.

Para tilápia-do-Nilo, somente as exigências quantitativas em proteína digestível tem sido estudada. Poucas pesquisas foram conduzidas em relação aos seus efeitos sobre a regulação enzimática e digestibilidade dos nutrientes. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas de desempenho produtivo e eficiência de utilização do alimento, juntamente com a estimativa da resposta metabólica de enzimas do metabolismo intermediário da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo diferentes níveis de proteína digestível.

2. Material e Métodos

O estudo foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Câmpus de Botucatu em parceria com o Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto, Portugal. Os procedimentos adotados na condução deste experimento foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (protocolo nº 163/2012 CEUA).

2.1 Dietas experimentais

Cinco dietas foram formuladas de modo a conter níveis de proteína digestível (PD) de 22,1; 25,6; 28,6; 31,9 e 33,9%, (Tabela 1), tendo como base os dados apresentados no NRC (2011) e por Furuya et al. (2010). Para confecção das rações, os ingredientes foram pesados, homogeneizados e moídos em partículas menores que 0,7 mm (peneira Tyler-24). Posteriormente, adicionou-se 23% de água (70°C), e procedeu-se a extrusão em equipamento de rosca simples (Extec[®], Ribeirão Preto, Brasil). Após secagem (55°C por 24 h), incorporou-se o óleo, na forma de banho com auxílio de pulverizador manual. As dietas foram armazenadas em câmara fria (4°C) até sua utilização. A composição proximal e perfil de aminoácidos das rações estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

2.2 Ensaio de crescimento

Alevinos de tilápia-do-Nilo, provenientes da Piscicultura Fernandes (Palmital, São Paulo), foram inicialmente alojados em um tanque circular (1000 L) para adaptação e posterior distribuição nos aquários experimentais. Os animais permaneceram nestas condições durante 20 dias, recebendo a dieta controle (26,8% PD/12,7 kJ ED g⁻¹) quatro vezes ao dia.

Após período adaptativo, 440 alevinos com peso médio de $9,27 \pm 0,22$ g foram distribuídos aleatoriamente em 40 aquários de formato circular (250 L), em sistema de recirculação de água, dotado por filtro mecânico e biológico, aquecimento controlado por termostato digital e aeração. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e oito repetições.

As rações, com diâmetro de pélete aproximado de 1,70; 2,00; 2,36; 2,80; 3,36 e 4,00 mm, foram sequencialmente ofertadas durante o experimento em função do tamanho dos peixes. O arraçoamento foi realizado *ad libitum* quatro vezes ao dia, em intervalos de tempo de 3 h, com início às 8 h:30 min.

Semanalmente foi realizada a limpeza dos aquários, por sifonagem, para retirada de eventuais sobras de alimentos e acúmulo de excretas, como também o monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água utilizando-se sonda multi probe YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA). Foram aferidos o pH ($6,54 \pm 0,08$), oxigênio dissolvido ($6,11 \pm 0,26$ mg L⁻¹), condutividade elétrica ($0,29 \pm 0,03$ mS cm⁻¹), sólidos totais dissolvidos ($0,19 \pm 0,02$ g L⁻¹) e amônia tóxica ($0,002 \pm 0,000$ ppm – kit Labcon[®]). A temperatura (°C) foi mensurada diariamente pela manhã ($25,88 \pm 1,13^{\circ}\text{C}$) e à tarde ($26,43 \pm 1,27^{\circ}\text{C}$). As variáveis indicadoras da qualidade de água mantiveram-se dentro das condições de conforto para a espécie estudada (Boyd, 1996).

Ao final de 110 dias experimentais, os peixes foram mantidos em jejum por 12 h, sendo em seguida anestesiados com benzocaína (67 mg L⁻¹) para a determinação do peso final e posterior cálculo dos índices zootécnicos. Após pesagem, 20 peixes por tratamento foram sacrificados para retirada e pesagem do fígado e gordura visceral. Foi realizada amostragem de cinco peixes por tratamento para análise da composição centesimal da carcaça. Para determinação do rendimento de filé, foram utilizados cinco

lotes de três peixes para cada tratamento (15 peixes/tratamento). O procedimento de filetagem foi efetuado por uma única pessoa. Posteriormente, os animais restantes foram alimentados, conforme anteriormente descrito, com as mesmas dietas experimentais por três dias subsequentes e, no quarto dia, seis horas após a última alimentação, foram capturados aleatoriamente seis peixes por tratamento. Os animais foram sacrificados sem recorrer a anestesia para retirada imediata do fígado e do músculo da região dorsal. Em seguida o material coletado foi congelado individualmente em nitrogênio líquido e conservado a -80°C para posterior análise da atividade das enzimas do metabolismo intermediário, no fígado, e composição centesimal dos tecidos.

2.3 Ensaio de digestibilidade

Para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína, energia e aminoácidos das dietas experimentais empregou-se o método indireto utilizando-se como marcador inerte 0,1% de óxido de cromo (Bremer Neto et al., 2003).

Para a condução do ensaio de digestibilidade foram utilizados cinco aquários de alimentação (formato circular), com capacidade para 250 L, e cinco aquários de coleta de fezes (formato cônico) com capacidade para 300 L, confeccionados em fibra de vidro. Nos aquários de alimentação, que possuíam em seu interior uma gaiola confeccionada em tela plástica, foram alojados 50 juvenis de tilápia-do-Nilo com peso médio de 80 g (10 peixes por aquário). Durante o dia os peixes recebiam as rações à vontade, com maior frequência no período vespertino. Ao final do dia as gaiolas foram transferidas para os aquários de coleta de fezes permanecendo nestas instalações até a manhã do dia seguinte, momento em que foi realizada a coleta das fezes. Posteriormente, as gaiolas retornavam aos aquários de alimentação iniciando-se novo ciclo de coleta.

Os peixes foram previamente adaptados com as diferentes dietas durante sete dias antes do início das coletas, sendo posteriormente ofertadas *ad libitum* quatro vezes ao dia, em intervalos de tempo de 3 h, com início às 8 h:30 min. Após aclimação iniciou-se a coleta de material fecal por três dias para cada ração. As fezes coletadas foram congeladas e armazenadas a -20°C e, posteriormente, foram desidratadas em estufa de

ventilação forçada a 55°C por 72 h. Em seguida as fezes foram moídas e acondicionadas em freezer até realização das análises químicas.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das rações foram calculados com base no teor de óxido crômio III (Cr_2O_3), do nutriente da ração e das fezes, de acordo com a equação proposta por Nose (1960):

$$\text{CDA} = 100 - [100 \times (\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na dieta} / \% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes}) \times (\% \text{nutriente ou energia nas fezes} / \% \text{nutriente ou energia na dieta})]$$

2.4 Análises químicas

Foi realizada análise da composição centesimal do peixe inteiro dos diferentes tratamentos, quanto os teores de matéria seca, matéria mineral, proteína, lipídios e energia, bem como das dietas incluindo-se a determinação dos teores de fibra bruta e o perfil de aminoácidos. A composição corporal inicial dos peixes foi efetuada por intermédio de amostragem realizada no início do experimento. As análises químicas das fezes compreenderam a determinação da matéria seca, proteína, aminoácidos, energia bruta e o teor de óxido crômio III (Cr_2O_3).

As análises foram conduzidas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ-UNESP/Botucatu segundo as metodologias descritas na AOAC (2000) e por Bremer Neto et al. (2005). A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica (C200, IKA, Staufen, Alemanha). A determinação do perfil de aminoácidos das rações e fezes foi realizada no laboratório de análises bromatológicas LABTEC seguindo-se os protocolos determinados pela AOAC (2000).

2.5 Parâmetros de crescimento e de utilização do alimento

Ao final do ensaio de desempenho foram determinados os seguintes parâmetros de crescimento e de utilização do alimento:

Ganho em peso ($\text{g kg peso médio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$):

$$[(\text{ganho em peso (g)} \times 1000) / (\text{peso médio (g)})] / \text{dias de experimento};$$

Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹):

$$[(\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}))/\text{dias de experimento}]*100;$$

Sobrevivência (%):

$$[(\text{número de peixes final}/\text{número de peixes inicial})*100;$$

Rendimento de filé (%):

$$(\text{peso dos filés}/\text{peso do peixe})*100;$$

Peso médio (g):

$$(\text{peso inicial} + \text{peso final})/2;$$

Consumo de ração (g kg peso médio⁻¹ dia⁻¹):

$$[(\text{alimento ingerido na matéria seca (g peixe}^{-1})*1000)/(\text{peso médio (g)})]/\text{dias de experimento};$$

Eficiência alimentar:

$$[\text{ganho em peso (g)}/\text{alimento ingerido na matéria seca (g peixe}^{-1})];$$

Taxa de eficiência proteica:

$$[\text{ganho em peso (g)}/\text{consumo de proteína bruta na matéria seca (g)}];$$

Consumo de nitrogênio (g kg peso médio⁻¹ dia⁻¹):

$$(\text{consumo de proteína na matéria seca (g peixe}^{-1})/6,25*1000)/(\text{peso médio (g)}*\text{dias de experimento});$$

Retenção de nitrogênio (g kg peso médio⁻¹ dia⁻¹):

$$[((\text{peso final (g)}*\text{proteína na carcaça final (\%)}) - (\text{peso inicial (g)}*\text{proteína na carcaça inicial (\%)}))/6,25*1000]/(\text{peso médio (g)}*\text{dias de experimento});$$

Retenção de nitrogênio (% do ingerido):

$$(\text{retenção de nitrogênio}/\text{consumo de nitrogênio})*100;$$

Consumo de lipídeos (g kg peso médio⁻¹ dia⁻¹):

$$(\text{consumo de lipídeos (g peixe}^{-1})*1000)/(\text{peso médio (g)}*\text{dias de experimento});$$

Retenção de lipídeos (g kg peso médio⁻¹ dia⁻¹):

$$[(\text{peso final (g)}*\text{lipídeo na carcaça final (\%)}) - (\text{peso inicial (g)}*\text{lipídeo na carcaça inicial (\%)})*1000]/(\text{peso médio (g)}*\text{dias de experimento});$$

Retenção de lipídeos (% do ingerido):

$$(\text{Retenção de lipídeos}/\text{consumo de lipídeos})*100;$$

Consumo de energia (kJ kg peso médio⁻¹ dia⁻¹):

$$(\text{consumo de energia (kJ g}^{-1})*1000)/(\text{peso médio (g)}*\text{dias de experimento});$$

Retenção de energia (kJ kg peso médio⁻¹ dia⁻¹):

$$[((\text{peso final (g)} \times \text{energia na carcaça final (kJ)}) - (\text{peso inicial (g)} \times \text{energia na carcaça inicial (kJ)})) \times 1000] / (\text{peso médio (g)} \times \text{dias de experimento});$$

Retenção de energia (% do ingerido):

$$(\text{Retenção de energia} / \text{consumo de energia}) \times 100$$

Índice hepatossomático (%):

$$[\text{peso do fígado (g)} \times 100 / \text{peso final (g)}];$$

Gordura visceral (%):

$$[\text{peso da gordura visceral (g)} \times 100 / \text{peso final (g)}];$$

2.6 Composição centesimal do fígado e músculo

Os lipídeo hepáticos e muscular foram determinados gravimetricamente conforme Folch et al. (1957). A proteína solúvel foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976) utilizando-se kit comercial (Sigma Protein kit, cod. B6916). Para determinar o glicogênio hepático e muscular, fígado e músculo foram homogeneizados em dois e seis volumes de água destilada fria, respectivamente, seguido por hidrólise com amiloglucosidade como descrito por Roehring e Allred (1974).

2.7 Atividade enzimática

Amostras de fígado foram homogeneizadas em nove volumes de tampão Tris HCl (100 mM) contendo 0,1 mM de EDTA e 0,1% (v/v) Triton X-100 a pH 7,8. Todos os procedimentos foram conduzidos sob gelo. Os homogeneizados foram centrifugados a 30000 x g por 30 min a 4°C e os sobrenadantes resultantes foram divididos em alíquotas e armazenados a -80°C, para posterior análise. A atividade de todas as enzimas (exceto ácido graxo sintetase) foram determinadas a 25°C e mudanças na absorbância de NADH ou NADP à 340 nm foram monitorados para determinar a atividade enzimática. O substrato ideal e a concentração para mensuração da atividade enzimática máxima, para cada enzima, foram estabelecidos em ensaios preliminares.

As reações enzimáticas foram iniciadas pela adição do extrato hepático. A atividade da hexocinase (HK; EC 2.7.1.1) e glicocinase (HK-IV; EC 2.7.1.2) foram

determinadas como descrito por Vijayan et al. (1990). A mistura de reação continha 50 mM de tampão de imidazol-HCl (pH 7,4); 2,5 mM de ATP, 5mM de MgCl_2 , duas unidades mL^{-1} de G6PD e 0,5 mM (HK) ou 50 mM (HK-IV) glicose. A atividade da frutose-1,6-bifosfatase (FBPase; EC 3.1.3.11) foi determinada com mistura de reação consistindo de 50 mM de tampão de imidazol-HCl (pH 7,4); 5mM de MgCl_2 , 2-mercaptoetanol 12 mM, NADP 0,5 mM, duas unidades mL^{-1} de G6PD, duas unidades mL^{-1} PGI e 0,5 mM de frutose-1,6-bifosfato (Morales et al., 1990). A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD; EC 1.1.1.49) foi mensurada conforme descrito por Morales et al. (2004), utilizando mistura de reação contendo 50 mM de tampão de imidazol-HCl (pH 7,4); 5mM de MgCl_2 , 2 mM NADP e 1 mM de glicose-6-fosfato. A atividade da glutamato desidrogenase (GDH; EC 1.4.1.2) foi determinada conforme descrito por Morales et al. (1990), utilizando mistura de reação contendo 50 mM de tampão de imidazol-HCl (pH 7,4); 0,2 mM NADH, 1 mM ADP, 100 mM de acetato de amônio, duas unidades mL^{-1} lactato desidrogenase (LDH) e 10 mM de α -cetoglutarato. A aspartato aminotransferase (AST/GOT; EC 2.6.1.1) e alanina aminotransferase (ALT/GPT; EC 2.6.1.2) foram avaliadas utilizando-se kits específicos (Spinreact, S.A.; Gerona, Espanha; GOT kit cod. 41265 e GPT kit cod. 1001171).

A atividade da piruvato-cinase (PK; EC 2.7.1.40) foi conduzida com mistura de reação consistindo de 50 mM de tampão de imidazol-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 0,15 mM NADH, 1 mM ADP, duas unidades mL^{-1} LDH e 2 mM fosfoenolpiruvato (PEP) (Morales et al., 1990). A enzima málica (ME; EC 1.1.1.40) foi quantificada utilizando mistura de reação contendo 50 mM de tampão de imidazol-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 0,4 mM NADP e 2 mM L-malato (Singer et al., 1990). A atividade da ácido graxo sintetase (FAS; EC 2.3.1.38) foi quantificada conforme descrito por Chang et al. (1967). As amostras foram incubadas com solução A (100 mM tampão fosfato de potássio pH 6,5; 0,1 mM NADPH e 25 μM acetil-CoA) a 37°C por 10 min. Posteriormente, solução B (100 mM tampão fosfato de potássio pH 6,5 e 600 mM de malonil-CoA) foi adicionado a essa mistura e mudanças na absorbância foram mensuradas a 340 nm a 37°C.

As atividades enzimáticas foram expressas como miliunidades por miligrama de proteína solúvel hepática (atividade específica). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para transformar 1 μmol de

substrato por minuto sob as condições de ensaio acima referidas. A concentração de proteína solúvel foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando a albumina de soro bovino como padrão.

2.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e, quando constatada distribuição normal, procedeu-se à ANOVA e ao teste de comparação de médias de Tukey. Para os dados que não seguiram distribuição normal, possíveis transformações foram aplicadas, entretanto, a premissa da normalidade não pode ser atendida em todos os casos e, por isso, a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparações de Mann-Whitney tornou-se mais apropriada. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão para variáveis com distribuição normal e média $\pm$ desvio padrão (mediana) para variáveis com distribuição não normal. O nível de significância foi $P < 0,05$ para todos os testes estatísticos. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Minitab® 16.1.1.0 (Minitab Inc. 2010). A exigência em proteína digestível foi estimada a partir dos dados de ganho em peso ($\text{g kg PM}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e taxa de crescimento específico (%) utilizando-se modelo exponencial (Rodehutscord et al., 1995), por meio do software Origin 8.0.

3. Resultados

3.1 Ensaio de crescimento

O desempenho produtivo e eficiência de utilização do alimento apresentado pela tilápia-do-Nilo foram influenciados pelos níveis de proteína digestível das dietas (Tabelas 3 e 4). O peso final e ganho em peso foram inferiores ($P < 0,05$) para peixes que receberam a dieta contendo 22,1% PD. O consumo de ração foi mais elevado ($P < 0,05$) para peixes alimentados com a dieta de menor conteúdo proteico (22,1%), porém, similar ($P > 0,05$) ao apresentado pelos animais que receberam as dietas com 25,6 e 28,6% PD (Tabela 3).

A dieta com 22,1% PD determinou menor ($P<0,05$) eficiência alimentar, enquanto que esta não foi diferente ($P>0,05$) em comparação à dieta com 25,6% PD. Efeito similar foi verificado com relação à taxa de eficiência proteica, porém, os menores níveis de proteína digestível (22,1 e 25,6%) determinaram melhores ($P<0,05$) resultados. A taxa de crescimento específico foi mais elevada ($P<0,05$) para peixes que receberam a dieta com 33,9% PD, entretanto, semelhante ($P>0,05$) ao verificado para animais do tratamento com 28,6% PD. A dieta com 33,9% PD determinou maior ($P<0,05$) rendimento de filé, porém, foi similar ($P>0,05$) ao apresentado pelos peixes que receberam as dietas com 28,6 e 31,9% PD (Tabela 3).

O consumo de nitrogênio foi inferior ($P<0,05$) para peixes alimentados com as dietas contendo 22,1 e 25,6% PD, entretanto, observou-se para estes tratamentos maior ($P<0,05$) retenção de nitrogênio (% do ingerido). O consumo de lipídeos foi mais elevado ($P<0,05$) para peixes alimentados com a dieta contendo 22,1% PD. Consequentemente, a retenção de lipídeos ($\text{g}^{-1} \text{ kg de peso médio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foi maior ($P<0,05$), porém, semelhante ($P>0,05$) ao verificado para peixes que receberam as dietas com 25,6 e 28,6% PD. Com relação à retenção de lipídeos (% do ingerido), a dieta contendo 31,9% PD determinou os menores ($P<0,05$) resultados (Tabela 4).

O consumo de energia foi mais elevado ($P<0,05$) para peixes que receberam as dietas de menor conteúdo proteico (22,1 e 25,6%), porém, esses resultados não foram diferentes ($P>0,05$) dos obtidos para peixes alimentados com as dietas contendo 25,6 e 31,9% PD. A retenção diária de energia ($\text{kJ}^{-1} \text{ kg peso médio}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foi menor ($P<0,05$) para peixes que receberam a dieta com 31,9% e 33,9% PD. A retenção de energia (% do ingerido) também foi inferior ($P<0,05$) para as dietas de maior conteúdo proteico (31,9 e 33,9%), entretanto, o nível de 33,9% PD determinou resultados semelhantes ($P>0,05$) ao verificado para as dietas com 22,1 e 25,6% PD. O índice hepatossomático foi maior ($P<0,05$) para peixes que receberam a dieta com 22,1% PD, enquanto que a gordura visceral mostrou-se mais elevada ($P<0,05$) para peixes alimentados com as dietas de menor conteúdo proteico (22,1 e 25,6%; Tabela 4).

Com relação à composição centesimal da carcaça observou-se que a energia bruta e o teor de lipídeos foram superiores ($P<0,05$) para peixes alimentados com as dietas contendo 22,1 e 28,6% PD. Consequentemente, para estes tratamentos, o conteúdo de umidade foi menor ($P<0,05$). A proteína bruta foi mais elevada ($P<0,05$) para peixes

que receberam as dietas com 31,9 e 33,9% PD, porém, foi semelhante ($P>0,05$) ao verificado para peixes alimentados com a dieta com 28,6% PD. Para o conteúdo de cinzas verificou-se maiores percentuais ($P<0,05$) para peixes que receberam a dieta contendo 22,1% PD (Tabela 5).

Com base no ganho em peso e taxa de crescimento específico foram estimadas as exigências em proteína digestível para tilápia-do-Nilo. A partir do ajuste dos dados ao modelo exponencial, o nível de proteína digestível para alcançar 95% do máximo ganho em peso e taxa de crescimento específico foi estimado em 29,2% PD (Figura 1).

A concentração de proteína hepática solúvel mostrou-se inferior ($P<0,05$) para peixes que receberam a dieta contendo 22,1% PD, entretanto, este resultado foi semelhante ($P<0,05$) ao observado para peixes alimentados com as dietas contendo 25,6; 28,6 e 31,9% PD. A dieta de maior conteúdo proteico (33,9%) determinou concentrações de proteína hepática mais elevadas ($P<0,05$) em comparação às dietas com 22,1 e 28,6% PD. Com relação aos lipídeos, observou-se valores superiores ($P<0,05$) para dieta de baixa proteína (22,1%), enquanto que, para os demais tratamentos os valores foram inferiores ($P<0,05$). O glicogênio hepático foi semelhante ($P>0,05$) para peixes que receberam as dietas com 22,1 e 25,6% PD e, a partir deste último nível, o conteúdo de glicogênio diminuiu ($P<0,05$) com o aumento da proteína da dieta. Não se verificou influência ($P>0,05$) dos níveis de proteína digestível sobre a composição centesimal do músculo (Tabela 6).

Quanto à atividade das enzimas envolvidas no metabolismo intermediário dos aminoácidos observou-se efeito ($P<0,05$) do nível de PD sobre ALT e GDH. A atividade da transaminase ALT foi mais elevada para peixes que receberam a dieta contendo 31,9% PD, porém este resultado foi diferente ($P<0,05$) somente da dieta com 25,6% PD. Para GDH, aumentos ($P<0,05$) na atividade enzimática foram observados para níveis mais elevados de proteína (31,9 e 33,9%), enquanto que, níveis intermediários e mais baixos de PD não determinaram efeitos ($P>0,05$) sobre a atividade desta enzima (Tabela 7).

Com relação à enzima gliconeogênica FBPase, a dieta contendo 31,9% PD determinou maior atividade ($P<0,05$), porém não sendo diferente ($P>0,05$) do observado para peixes que receberam as dietas com 28,6 e 33,9% PD. Considerando-se a via glicolítica observou-se que a atividade da HK-IV não foi influenciada ($P>0,05$) pelas

dietas, para os níveis intermediários de proteína (25,6 a 31,9%). Contudo, para níveis mais baixos e elevados de PD (22,1 e 33,9%) verificou-se a maior e menor atividade ($P<0,05$), respectivamente. Ainda considerando os efeitos da PD sobre a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos observou-se que a dieta contendo 22,1% PD determinou maior atividade ($P<0,05$) para HK, entretanto, os resultados obtidos para este tratamento foram semelhantes ($P>0,05$) ao verificado para peixes que receberam a dieta com 25,6% PD. Não se observou efeito ($P>0,05$) dos níveis de proteína digestível sobre a atividade da PK.

Para G6PD, enzima envolvida na via das pentoses-fosfato, observou-se efeito similar à HK-IV, sendo constatada baixa e elevada atividade ($P<0,05$) para dietas de menor e maior conteúdo proteico, respectivamente. Quanto às enzimas envolvidas na lipogênese, apenas ME foi influenciada pelos níveis de PD da dieta. Neste caso, a atividade enzimática foi maior ($P<0,05$) para níveis de proteína mais baixos (22,1 e 25,6%), enquanto que, níveis mais altos (31,9 e 33,9%) determinaram as menores ($P<0,05$) atividades (Tabela 7).

3.2 Ensaio de digestibilidade

Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e energia bruta foram mais elevados ($P<0,05$) para dietas com 22,1 e 25,6% PD. Com relação à proteína bruta observou-se que as dietas contendo 28,6% PD determinaram menores ($P<0,05$) coeficientes, porém, diferentes ($P<0,05$) apenas da dieta com 25,6% PD (Tabela 8).

4. Discussão

A menor taxa de crescimento e eficiência alimentar observada para peixes que receberam a dieta com 22,1% PD pode ter sido decorrente da quantidade insuficiente de proteína ou composição inadequada de aminoácidos. Comparando-se o perfil de aminoácidos essenciais da dieta com as recomendações de Furuya et al. (2010), as exigências em histidina, isoleucina e fenilalanina não foram atendidas para as dietas de menor conteúdo proteico (22,1 e 25,6%; Tabela 2), o que pode ter reduzido a utilização

dos outros aminoácidos refletindo em menores taxas de crescimento e rendimento de filé (Tabela 3).

As dietas para peixes, além de fornecerem as quantidades mínimas de cada aminoácido devem assegurar adequada relação entre suas concentrações (Furuya et al., 2010; Furuya et al., 2013). Desse modo o baixo desempenho exibido pelos peixes que receberam as dietas com menores níveis de proteína digestível poderia ter sido resultante, ainda, de possíveis antagonismos e/ou sinergismo, pois, a relação entre as concentrações dos aminoácidos não foi constante (Tabela 2). Esses efeitos foram constatados em estudos com diferentes espécies de peixes por Alam et al. (2002), Zhou et al. (2011), Nguyen et al. (2014) e Yue et al. (2014).

Menor crescimento e eficiência alimentar tem sido relacionado não somente ao desbalanceamento da dieta mas, também ao baixo consumo (Sá et al., 2008; Ozório et al., 2009; Coutinho et al., 2014). Entretanto, neste estudo o consumo de ração foi maior ($P < 0,05$) para peixes em que o crescimento foi inferior. É possível que o baixo nível de proteína digestível ($< 28,6\%$) tenha induzido maior consumo para atender e satisfazer as exigências. Resposta compensatória similar foi verificado por Fortes-Silva e Sánchez-Vázquez (2012) para tilápia-do-Nilo e por Sá et al. (2014) para *Eleginops maclovinus*, quando a proteína da dieta foi reduzida. Contudo, os níveis de ingestão foram insuficientes para atender adequado crescimento, pois, a exigência em proteína digestível, com base na matéria natural, da tilápia-do-Nilo até 100 g é de 26,8% (Furuya et al., 2010). Neste estudo os valores digestíveis, com base na matéria natural, para os mais baixos níveis de proteína avaliados ($< 28,6\%$) foram de 21,0 e 24,3% PD, respectivamente e, portanto, justificam o menor desempenho.

No presente estudo, a partir do nível de 28,6% PD observou-se aumento nas taxas de crescimento que, provavelmente, esteve associado ao atendimento das exigências em relação aos aminoácidos essenciais. Entretanto, observou-se que a taxa de eficiência proteica e retenção de nitrogênio foi similar ($P > 0,05$). Isso sugere que as exigências foram atendidas e o excesso de proteína foi convertido em componentes energéticos, para uso e estocagem, como demonstrado pelo aumento na atividade das enzimas GDH e FBPase a elevados níveis de PD (31,9 e 33,9%; Tabela 7). A utilização da proteína como substrato para produção de energia concorda também com a maior atividade da ALT, para estas mesmas dietas, apesar dos resultados não apresentarem diferenças

estatísticas em relação às dietas de baixa proteína (22,1 e 25,6%; Tabela 7). Além disso observou-se, ainda, que a atividade da HK-IV e HK foram menores o que indica que quando as necessidades para máximo crescimento são excedidas a proteína é mais eficientemente utilizada para propósitos energéticos do que carboidratos (Sá et al., 2014).

Evidentemente, as reações da via glicolítica podem se tornar lenta como resultado efetivo de elevado ATP, fornecido por outras fontes que não carboidrato, o qual é inibidor metabólico da enzima regulatória fosfofrutocinase-1 (Guyton e Hall, 2011; Nelson e Cox, 2011). Portanto, apesar de neste estudo não se ter quantificado a atividade da fosfofrutocinase-1, é possível que o suprimento de ATP fornecido pela oxidação dos aminoácidos tenha exercido controle sobre a via glicolítica. Assim, o carboidrato absorvido possivelmente foi estocado como lipídeo ou glicogênio (Sá et al., 2014).

Ao contrário do verificado nos elevados níveis de proteína, a via glicolítica foi estimulada (aumento da HK-IV e HK) nos peixes que receberam as dietas de baixa proteína (22,1 e 25,6%), enquanto que, a gliconeogênese foi parcialmente inibida (menor FBPase; Tabela 7). Essas diferenças no metabolismo podem ter sido resultantes não somente da variação no conteúdo de proteína, mas também de carboidratos.

Em peixes como em mamíferos, a insulina, que é produzida em resposta à ingestão de dietas ricas em glicídios, promove a captação de glicose pelos tecidos periféricos, além de estimular a transcrição gênica das enzimas regulatórias da via glicolítica (Enes et al., 2010; Nelson e Cox, 2011). Desse modo, os aumentos na atividade da HK-IV e HK a baixos níveis de proteína (22,1 e 25,6%) sugere efeito regulatório da insulina sobre o metabolismo de carboidratos, uma vez que para estas dietas o conteúdo de amido foi maior (39,24 e 35,99%, respectivamente). Esses resultados são consistentes aos obtidos em outros estudos com peixes (Enes et al., 2010; Azaza et al., 2015; Ren et al., 2015; Zhou et al., 2015) e sugerem uso eficiente dos carboidratos como fonte de energia pela tilápia-do-Nilo (Azaza et al., 2009; Azaza et al., 2015) pois, para as dietas em que o conteúdo de amido foi maior (22,1 e 25,6% PD) não se verificou redução nos coeficientes de digestibilidade da energia e proteína (Tabela 8), como verificado para outras espécies de peixes (Fernandez et al., 2007; Sá et al., 2014).

Além da glicólise, a lipogênese (aumento da ME) e via das pentoses-fosfato (aumento da G6PD) também foi estimulada em peixes alimentados com dietas contendo os mais baixos níveis de PD e, concomitante, aumento do amido (Tabela 7). G6PD e ME são as principais enzimas envolvidas na produção de NADPH requerido para síntese de ácidos graxos (Pérez-Jiménez et al., 2009; Guerreiro et al., 2014) e, portanto, os resultados obtidos demonstram que o carboidrato foi utilizado como fonte de energia e, o excedente convertido em gordura para estocagem. O maior acúmulo de lipídeos no fígado e vísceras e, consequente, aumento do HSI e VF para dietas de menor proteína (22,1 e 25,6%; Tabela 6), confirmam esta hipótese. Isso sugere que a tilápia-do-Nilo acumula, preferencialmente, as reservas de gordura no fígado ou vísceras, sendo este fato consistente com a ausência de efeito significativo e menor conteúdo lipídico no músculo. A contribuição do excesso de carboidratos sobre o estoque energético esteve de acordo com a maior retenção e conteúdo de lipídeos e energia na carcaça (Tabelas 4 e 5) e, concordam com o observado em estudos com peixes (Coutinho et al., 2012; Li et al., 2013; Wu et al., 2015).

Assim como os lipídeos, o conteúdo de glicogênio hepático e muscular pode também ser afetado pelo conteúdo de carboidrato da dieta, uma vez que a captação de glicose estimulada pela insulina promove sua síntese, além do estímulo à lipogênese (Hemre et al., 2002; Enes et al., 2010; Azaza et al., 2015). Este efeito está relacionado à atividade da HK-IV, enzima chave em ambas as vias glicolítica e da glicogênese (Enes et al., 2010). Desse modo, em função da maior atividade desta enzima e conteúdo de glicogênio hepático observado para dietas de baixa proteína e elevado amido, este estudo mostrou que as alterações no HSI estiveram relacionadas a conversão e estocagem do excesso de carboidratos não só como gordura, mas também, glicogênio. Entretanto, conforme observado para lipídeos, a contribuição do carboidrato aos estoques de glicogênio muscular não foi significativa, sugerindo que a captação de glicose mediada pela insulina foi mais importante no fígado do que no músculo (Enes et al., 2010).

A menor atividade da FBPase observada para tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo baixos níveis de PD (22,1 e 25,6%) sugere inibição da gliconeogênese pelo carboidrato da dieta, devido ao maior conteúdo de amido (39,24 e 35,99%, respectivamente). Resposta similar foi observada em alguns estudos com peixes (Enes

et al., 2006; Pérez-Jiménez et al., 2009; Sá et al., 2014; Guerreiro et al., 2014), embora tenha sido sugerido falta de regulação da gliconeogênese pelo carboidrato em peixes. Há evidências que a proteína é o principal fator envolvido nesta regulação (Andoh, 2007; Enes et al., 2009). Consequentemente, neste estudo, a atividade da FBPase poderia estar relacionada também ao conteúdo de proteína, uma vez que para dietas de maior conteúdo proteico a atividade da FBPase foi maior (Guerreiro et al., 2014).

Neste estudo as exigências em proteína digestível para tilápia-do-Nilo foram estimadas em 29,2%, correspondendo a 27,8% com base na matéria natural. Valores de exigência próximos aos obtidos neste estudo foram encontrados por Furuya et al. (2005, 2010). Esses autores demonstraram ser possível obter adequado crescimento com teor de 27,5% e 26,8% PD (base na matéria natural), respectivamente. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a tilápia-do-Nilo exige 29,2% PD para ótimo crescimento. Entretanto, observou-se que variações no conteúdo de amido das dietas induziram mudanças no metabolismo intermediário, sendo estas refletidas nas taxas de eficiência de utilização da proteína/aminoácidos pelos peixes. Portanto, o carboidrato é importante aspecto a ser considerado na formulação de dietas para tilápia-do-Nilo, uma vez que esta espécie pode utilizar eficientemente este nutriente como fonte de energia e, assim, poupar proteína. Isso possibilita que fontes alternativas sejam empregadas na formulação, tornando a criação de tilápia-do-Nilo custo-efetiva.

5. Referências

- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E., 2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). Aquaculture, 298, 267-274.
- Alam, MD. S., Teshima, S., Ishikawa, M., Koshio, S., 2002. Effects of dietary arginine and lysine levels on growth performance and biochemical parameter of juveniles Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Sci., 68, 509-516.
- Andoh, T., 2007. Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish, barfin flounder (*Verasper moseri*). Gen. Comp. Endocr., 151, 308-317.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. 17. ed. Arlington: Inc, 2000.

- Azaza, M.S., Mensi, F., Wassim, K., Abdelmouleh, A., Brini, B; Kraïem, M.M., 2009. Nutritional evaluation of waste date fruit as partial substitute for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquacult. Nutr., 15, 262-272.
- Azaza, M.S., Khiari, N., Dhraief, N., Aloui, M.M.K., Elfeki, A., 2015. Growth performance, oxidative stress indices and hepatic carbohydrate metabolic enzymes activities of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., in response to dietary starch to protein ratios. Aquac. Res., 46, 14-27.
- Berto, R.S., Pereira, G.V., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., Fracalossi, D.M., 2015. Yeast extract on growth, nutrient utilization and haemato-immunological responses of Nile tilapia. Aquac. Res., 1-11.
- Boyd C.E., 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Shrimp Mart, Songkhla, Thailand.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem., 72, 248–254.
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., Cantelmo, O.A., 2003. Reduction in chromium (III) oxide level as an external marker. R. Bras. Zootec., 32, 249-255.
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., 2005. The spectrophotometric method on the routine of 1,5-diphenylcarbazine was adjusted on chromium determination in feces, after its utilization as a biological marker as chromium (III) oxide. Cienc. Rural, 35, 691-697.
- Chang H.C., Seidman, I, Teebor, G, Lane, M.D., 1967. Liver acetyl CoA carboxylase and fatty acid synthetase: relative activities in the normal state and in hereditary obesity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 682–686.
- Coutinho, F., Peres, H., Guerreiro, I., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2012. Dietary protein requirement of sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) juveniles. Aquaculture, 356-357, 391-397.
- Coutinho, F., Peres, H., Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Magalhães, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2014. Dietary protein requirement of zebra sea bream (*Diplodus cervinus*, Low 1838) juveniles. Aquacult. Nutr., 1-7.
- Deng, J., Zhang, X., Han, X., Tao, L., Bi, B., 2014. Dietary protein requirement of juvenile dianchi golden-line barbell, *Sinocyclocheilus graham*. J. World Aquacul. So., 45, 421-429.
- Diógenes, A.F., Fernandes, J.B.K., Dorigam, J.C.P., Sakomura, N.K., Rodrigues, F.H.F., Lima, B.T.M., Gonçalves, F.H., 2015. Establishing the optimal essential

- amino acids ratios in juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by the deletion method. *Aquacult. Nutr.*, 1-9.
- El-Sayed, A.M., Mansour, C.R., Ezzat, A.A., 2003. Effects of dietary protein level on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture*, 220, 619-632.
- El-Sayed, A.M., Kawanna, M., 2008. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. *Aquaculture*, 280, 179-184.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2006. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 143, 89-96.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 35, 519-539.
- Enes, P., Sanchez-Gurmaches, J., Navarro, I., Gutiérrez, J., Oliva-Teles, A., 2010. Role of insulin and IGF-I on the regulation of glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed with different dietary carbohydrate levels. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 157, 346-353.
- Fernandez, F., Miquel, A.G., Cordoba, M., Varas, M., Meton, I., Caseras, A., Baanante, I.V., 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 343, 1-10.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Fortes-Silva R., Sánchez-Vázquez, F.J., 2012. Use of self-feeders to evaluate macronutrient self-selection and energy intake regulation in Nile tilapia. *Aquaculture* 326, 168-172.
- Furuya, W.M., Hayashi, C., Furuya, V.R.B., Soares, C.M., 2000. Protein requirements for reversed fingerlings Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, 29, 1912-1917.
- Furuya, W.M., Botaro, D., Macedo, R.M.G., Santos, V.G., Silva, L.C.R., Silva, T.C., Furuya, V.R.B., Sales, P.J.P., 2005. Ideal protein concept for dietary protein reduction of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, 34, 1433-1441.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Boscolo, W.R., Cyrino, J.E.P., Furuya, V.R.B., Feiden, A., 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 2010, 100p.

- Furuya, W.M., Michelato, M., Graciano, T.S., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Furuya, V.R.B., Moura, L.B., 2013. Digestible lysine requirement of Nile tilapia from 86 to 227 g fed arginine to lysine balanced diets. *Semina*, 34, 1945-1954.
- Gatlin III, D.M., 2002. Nutrition and fish health, in: Halver, J.E., Hardy, R.W., (Eds), *Fish nutrition*. Academic Press, London, UK, pp. 671-702.
- González-Rodríguez, Á., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royela, M., Fuertes, J.B., 2014. Effects of varying protein level in practical diets on survival, growth, feed utilization and body composition of juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Aquacult. Int.*, 22, 1723-1735.
- Guerreiro, I., Peres, H., Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A., 2014. Water temperature does not affect protein sparing by dietary carbohydrate in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquac. Res.*, 45, 289-298.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2011. *Tratado de fisiologia médica*. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1151p.
- Hayashi, C., Boscolo, W.R., Soares, C.M., Meurer, F., 2002. Digestible protein requirement of Nile tilapia larvae (*Oreochromis niloticus*) during the sexual reversion. *R. Bras. Zootec.*, 31, 823-828.
- Hemre, G-I., Mommsen, T.P., Krogdahl, Å., 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult. Nutr.*, 8, 175-194.
- Jin, Y., Tian, Li-xia, Xie, Shi-wei, Guo, Ding-qian, Yang, Hui-jun, Liang, Gui-ying, Liu, Yong-jian, 2015. Interactions between dietary protein levels, growth performance, feed utilization, gene expression and metabolic products in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, 437, 75-83.
- Larumbe-Morán, E., Hernández-Vergara, M.P., Olvera-Novoa, M.A., Rostro, C.I.P., 2010. Protein requirements of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry cultured at different salinities. *Aquacult. Nutr.*, 41, 1150-1157.
- Li, Y., Bordinhon, A.M., Davis, D.A., Zhang, W., Zhu, X., 2013. Protein: energy ratio in practical diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquacult. Int.*, 21, 1109-1119.
- Mabroke, R.S., Tahoun, A.M., El-Haroun, E.R., Suloma, A., 2012. Influence of dietary protein on growth, reproduction, seed chemical composition and larval survival rate of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstocks of different size groups under hapa-in-pond hatchery system. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 7, 203-220.

- Michelato, M., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Graciano, T.S., Moura, L.B., Furuya, V.R.B., Furuya, W.M., 2015. Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast-growing Nile tilapia. *Aquacult. Nutr.*, 1-8.
- Minitab, Inc: Minitab: Data Analysis Software, release 16.1.1.0. State College, Pa, Minitab Inc, 2010.
- Morales, A.E., García Rejón, L., de la Higuera, M., 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 95, 87–93.
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 139, 153–161.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2011. *Principios de bioquímica de Lehninger*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 1274p.
- Nguyen, M.V., Rønnestad, I., Buttle, L., Van Lai, H., Espe, M., 2014. Imbalanced lysine to arginine ratios reduced performance in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed high plant protein diets. *Aquacult. Nutr.*, 20, 25-35.
- Nose, T., 1960. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus*) L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). *Bull. Freshw. Fish Res. Lab.*, 10, 11-22.
- NRC, 2011. *Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp* Washington: DC. National Academies Press. 376p.
- Ozório, R.O.A., Valente, L.M.P., Correia, S., Pousão-Ferreira, P., Damasceno-Oliveira, A., Escórcio, C., Oliva-Teles, A., 2009. Protein requirement for maintenance and maximum growth of two-banded sea bream (*Diplodus vulgaris*) juveniles. *Aquacult. Nutr.*, 15, 85-93.
- Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Arizcun, M., Abellán, E., Cardenete, G., 2009. Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*) Effects on intermediary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 152, 314-321.
- Ren, M., Habte-Tsion, Habte-Michael, Xie, J., Liu, B., Zhou, Q., Ge, X., Pan, L., Chen, R., 2015. Effects of dietary carbohydrate source on growth performance, diet digestibility and liver glucose enzyme activity in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*, 438, 75-81.
- Rodehutscord, M., Jacobs, S., Pack, M., Pfeffer, E., 1995. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 150 g to supplements of DL-methionine in a semipurified diet containing low or high levels of cystine. *J. Nutr.*, 125, 964–969.

- Roehrig, K.L., Allred, J.B., 1974. Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal. Biochem.*, 58, 414–421.
- Sá, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2008. Dietary protein requirement of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquacult. Nutr.*, 14, 309–317.
- Sá, R., Gavilán, M., Rioseco, M.J., Llancabure, A., Vargas-Chacoff, L., Augsburger, A., Bas, F., 2014. Dietary protein requirement of Patagonian blennie (*Eleginops maclovinus*, Cuvier 1830) juveniles. *Aquaculture*, 428–429, 125–134.
- Singer, T.D., Mahadevappa, V.G., Ballantyne, J.S., 1990. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47, 873–881.
- Sousa, S.M.N., Freccia, A., Santos, L.D., Meurer, F., Tessaro, L., Bombardelli, R.A., 2013. Growth of Nile tilapia post-larvae from broodstock fed diet with different levels of digestible protein and digestible energy. *R. Bras. Zootec.*, 42, 535–540.
- Teoh, Chaiw-Yee, Turchini, G.M., Ng, Wing-Keong, 2011. Genetically improved farmed Nile tilapia and red hybrid tilapia showed differences in fatty acid metabolism when fed diets with added fish oil or a vegetable oil blend. *Aquaculture*, 312, 126–136.
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S., Leatherland, J.F., 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 88, 371–381.
- Wu, X., Castillo, S., Rosales, M., Burns, A., Mendoza, M., Gatlin III, D.M., 2015. Relative use of dietary carbohydrate, non-essential amino acids, and lipids for energy by hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Aquaculture*, 435, 116–119.
- Yue, Y., Zou, Z., Zhu, J., Li, D., Xiao, W., Han, J., Yang, H., 2014. Dietary threonine requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 22, 1557–1467.
- Zhou, F., Shao, Q., Xiao, J., Peng, X., Ngandzali, B., Sun, Z., Ng, W., 2011. Effect of dietary arginine and lysine levels on growth performance, nutrient utilization and tissue biochemical profile of black sea bream, *Acanthopagrus chlegelli*, fingerlings. *Aquaculture*, 319, 72–80.
- Zhou, C., Ge, X., Liu, B., Xie, J., Chen, R., Ren, M., 2015. Effect of high dietary carbohydrate on the growth performance, blood chemistry, hepatic enzymes activity and growth hormone gene expression of Wuchang Bream (*Megalobrama amblycephala*) at two temperatures. *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 28, 207–214.

Table 1. Formulation (%) and analyzed composition of experimental diets.

Ingredients	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Soybean meal	20.26	28.57	31.75	45.25	53.73
Wheat middling	7.00	7.00	7.00	8.00	8.00
Meat and bone meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Poultry viscera meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Corn	52.64	45.79	37.50	30.09	22.28
Soybean oil	2.80	2.00	1.80	1.00	0.50
L-lysine	1.00	0.54	0.68	-	-
DL-methionine	0.38	0.32	0.25	0.18	0.13
L-threonine	0.57	0.46	0.35	0.24	0.14
L-tryptophan	0.13	0.09	0.05	0.01	-
Antioxidant (BHT) ¹	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Vitamin and mineral premix ²	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin C ³	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>Analyzed composition (% dry matter)</i>					
Dry matter	94.79	94.71	94.86	93.58	92.47
Digestible energy (kJ g ⁻¹)	16.76	16.52	15.57	15.94	15.05
Crude fat	10.00	9.03	8.59	8.94	7.15
Crude fiber	1.39	1.99	2.33	2.64	3.27
Ash	7.39	7.86	8.18	9.04	9.19
Digestible protein	22.11	25.64	28.59	31.92	33.98
DE:DP (kJ g ⁻¹) ⁴	75.80	64.41	54.46	49.94	44.29

¹Butylated hydroxytoluene; ²Vitamin and mineral supplement (levels per kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid = 24,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg; ³Vitamin C Rovimix@ Stay-35, DMS Nutritional Products, Switzerland; ⁴DE:DP = digestible energy:digestible protein ratio.

Table 2. Composition (g 100 g⁻¹) and digestibility coefficients of amino acids (%) of experimental diets¹.

Composition	Digestible protein level (%)					Requirement Nile tilapia ²
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9	
<i>Essential amino acids</i>						
Arginine	1.27 (95.92)	1.50 (96.70)	1.80 (96.20)	2.02 (97.06)	2.28 (97.19)	1.26
Histidine	0.48 (96.05)	0.56 (96.36)	0.66 (94.82)	0.74 (95.85)	0.84 (95.90)	0.52
Isoleucine	0.77 (93.61)	0.89 (92.96)	1.15 (91.78)	1.30 (93.22)	1.46 (93.09)	0.93
Leucine	1.66 (94.75)	1.84 (94.38)	2.14 (92.39)	2.34 (93.43)	2.64 (93.20)	1.01
Lysine	1.84 (97.19)	1.61 (96.83)	2.02 (96.42)	1.78 (96.32)	2.03 (96.24)	1.53
Methionine	0.55 (98.39)	0.52 (98.32)	0.50 (96.78)	0.39 (97.37)	0.42 (97.07)	0.52
Phenylalanine	0.87 (94.78)	1.01 (94.66)	1.21 (92.85)	1.36 (94.13)	1.54 (93.93)	1.10³
Threonine	1.21 (95.62)	1.23 (95.62)	1.23 (92.48)	1.26 (93.01)	1.31 (92.30)	1.18
Valine	0.90 (92.85)	1.00 (92.14)	1.25 (90.51)	1.39 (92.34)	1.54 (91.85)	0.83
<i>Non-essential amino acids</i>						
Alanine	1.24 (91.35)	1.35 (91.05)	1.53 (86.99)	1.63 (90.45)	1.80 (89.34)	-
Aspartic acid	1.52 (98.17)	1.82 (98.48)	2.08 (97.39)	2.62 (98.51)	3.18 (97.52)	-
Cystine	0.18 (99.30)	0.23 (100.00)	0.24 (100.00)	0.28 (100.00)	0.34 (100.00)	-
Glutamic acid	4.00 (97.79)	4.61 (98.14)	5.36 (96.96)	6.13 (98.10)	6.94 (97.41)	-
Glycine	1.54 (91.23)	1.69 (91.55)	1.90 (86.98)	2.02 (90.77)	2.22 (89.58)	-
Proline	1.54 (93.61)	1.67 (93.81)	1.87 (89.89)	1.98 (92.45)	2.19 (92.47)	-
Serine	0.90 (95.37)	1.07 (96.05)	1.17 (93.98)	1.32 (94.41)	1.55 (94.60)	-
Tyrosine	0.46 (95.06)	0.55 (95.50)	0.64 (94.03)	0.69 (94.66)	0.83 (94.96)	-

¹Values expressed on wet weight basis. Number in parentheses represent the apparent digestibility coefficients of amino acids. ²Values expressed according to Furuya et al. (2010). ³Values expressed according to NRC (2011).

Table 3. Growth performance, feed utilization and fillet yield of Nile tilapia fed experimental diets for 110 days¹.

Diets	22.1%DP	25.6%DP	28.6%DP	31.9%DP	33.9%DP
Initial body weight (g)	9.29 ± 0.22	9.27 ± 0.27	9.34 ± 0.22	9.26 ± 0.29	9.20 ± 0.08
Final body weight (g)	190.13 ± 32.24 (189.72c)	249.27 ± 18.40 (245.23b)	272.60 ± 25.81 (271.32ab)	260.48 ± 26.24 (266.81ab)	276.91 ± 9.68 (279.86a)
Weight gain (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^a	16.45 ± 0.30 (16.49c)	16.87 ± 0.10 (16.87b)	16.97 ± 0.11 (16.99ab)	16.93 ± 0.10 (16.96b)	17.01 ± 0.04 (17.02a)
Feed intake (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^b	19.33 ± 1.80a	17.89 ± 0.97ab	17.49 ± 0.86ab	17.12 ± 1.60b	16.27 ± 1.16b
Feed efficiency ^c	0.86 ± 0.08b	0.95 ± 0.05ab	0.97 ± 0.05a	1.00 ± 0.09a	1.05 ± 0.08a
Protein efficiency ratio ^d	3.58 ± 0.35a	3.43 ± 0.20a	3.07 ± 0.16b	2.88 ± 0.26b	2.83 ± 0.20b
Specific growth rate (% day ⁻¹) ^e	2.73 ± 0.16 (2.75c)	2.99 ± 0.07 (2.98b)	3.06 ± 0.08 (3.08ab)	3.03 ± 0.07 (3.05b)	3.09 ± 0.03 (3.10a)
Survival (%) ^f	87.50 ± 10.80 (90.91)	95.45 ± 6.87 (100.00)	89.77 ± 12.33 (90.91)	93.18 ± 10.59 (100.00)	86.36 ± 18.18 (95.45)
Fillet yield (%) ^g	30.12 ± 1.26 (30.30c)	33.56 ± 1.19 (33.30b)	35.07 ± 0.72 (34.74ab)	34.11 ± 2.37 (34.37abc)	36.13 ± 0.81 (36.15a)

¹Values presented as means ± standard deviation for data normally distributed and means ± standard deviation (median) for data not normally distributed. Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by Tukey test. Medians in the same row with different letters differ (P<0.05) by Mann Whitney test. n= 8. ^aWeight gain: [(weight gain (g)*1000)/(average body weight (g))/number of days]; ^bFeed intake: [(dry matter ingested feed (g)*1000)/(average individual weight (g)/1000)]/number of days; ^cFeed efficiency: [weight gain (g)/dry matter feed intake (g fish⁻¹)]; ^dProtein efficiency ratio: [weigh gain (g)/(dry matter crude protein intake (g))]; ^eSpecific growth rate: [(ln(final weight) – ln(initial weight))/(number of days)]*100; ^fSurvival: [(number of final fish/number of initial fish)]*100; ^gFillet yield: (fillet weight/fish weight)*100; *ABW: average body weight: (initial body weight + final body weight)/2.

Table 4. Nutrient and energy utilization, visceral fat and hepatosomatic index of Nile tilapia fed the experimental diets for 110 days¹.

Diets	22.1%DP	25.6%DP	28.6%DP	31.9%DP	33.9%DP
<i>Nitrogen</i>					
Intake (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^a	0.74 ± 0.07b	0.79 ± 0.04b	0.89 ± 0.04a	0.95 ± 0.09a	0.97 ± 0.07a
Retention (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^b	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.39 ± 0.05	0.39 ± 0.04
Retention (% Nitrogen intake) ^c	49.87 ± 5.54a	49.45 ± 4.63a	46.27 ± 2.64ab	40.96 ± 5.52b	40.74 ± 5.29b
<i>Lipid</i>					
Intake (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^d	1.93 ± 0.18a	1.62 ± 0.09b	1.50 ± 0.07b	1.53 ± 0.14b	1.16 ± 0.08c
Retention (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^e	2.26 ± 0.27a	1.91 ± 0.36ab	2.14 ± 0.32a	1.35 ± 0.19c	1.60 ± 0.19bc
Retention (% Lipid intake) ^f	117.37 ± 13.59ab	119.20 ± 25.86a	142.97 ± 25.32a	88.88 ± 13.44b	137.61 ± 16.97a
<i>Energy</i>					
Intake (kJ kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^g	360.91 ± 33.59a	334.21 ± 18.07ab	324.69 ± 15.97b	325.54 ± 30.50ab	306.08 ± 21.90b
Retention (kJ kg ABW ⁻¹ day ⁻¹) ^h	143.04 ± 3.46 (143.30ab)	135.99 ± 16.23 (132.50b)	147.14 ± 15.84 (139.50a)	110.26 ± 8.86 (113.30c)	113.29 ± 0.70 (113.60c)
Retention (% Energy intake) ⁱ	39.94 ± 3.82 (39.88ab)	40.90 ± 6.28 (39.03ab)	45.50 ± 6.23 (43.57a)	33.98 ± 2.66 (33.95c)	37.18 ± 2.65 (37.14bc)
Visceral fat (%) ^j	3.44 ± 0.79c	2.61 ± 1.10b	2.04 ± 0.97b	1.86 ± 0.83b	1.07 ± 0.35a
Hepatosomatic index (%) ^k	2.99 ± 0.79b	2.96 ± 0.91b	2.15 ± 0.60a	2.07 ± 0.51a	1.91 ± 0.51a

¹Values presented as means ± standard deviation for data normally distributed and means ± standard deviation (median) for data not normally distributed. Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by Tukey test. Medians in the same row with different letters differ (P<0.05) by Mann Whitney test. n= 8. ^aNitrogen intake: [dry matter protein intake (g)/(6.25*1000)]/ (average body weight*number of days); ^bNitrogen retention: [(final body weight*final body protein (%))-(initial body weight*initial body protein (%))]/6.25*1000/average body weight*number of days; ^cNitrogen retention (% Nitrogen intake): (Nitrogen retention/Nitrogen intake)*100; ^dLipid intake: [dry matter lipid intake (g)*1000]/(average body weight*number of days); ^eLipid retention: [(final body weight*final body lipid (%))-(initial body weight*initial body lipid (%))]/1000/average body weight*number of days; ^fLipid retention (% Lipid intake): (Lipid retention/Lipid intake)*100; ^gEnergy intake: (energy ingested (kJ)*1000)/(average body weight*number of days); ^hEnergy retention: [(final weight*final energy)-(initial weight*initial energy)*1000]/(average body weight*number of days); ⁱEnergy retention (% Energy intake): (Energy retention/Energy intake)*100; ^jABW: average body weight: (initial body weight + final body weight)/2; ^kVisceral fat (VF) = (visceral fat weight/body weight) x 100; ^kHepatosomatic index (HSI): (liver weight/body weight) x 100.

Table 5. Whole-body composition (wet weight basis) of Nile tilapia fed experimental diets for 110 days¹.

Diets	Initial	22.1%DP	25.6%DP	28.6%DP	31.9%DP	33.9%DP
Moisture (%)	75.98 ± 0.10	68.30 ± 0.27 (68.16b)	69.89 ± 2.61 (70.74b)	68.84 ± 1.82 (69.49b)	73.24 ± 0.47 (73.30a)	71.93 ± 1.76 (72.00ab)
Protein (%)	13.16 ± 0.18	13.92 ± 0.51 (13.88c)	14.06 ± 0.98 (14.42bc)	14.99 ± 0.75 (15.15ab)	14.96 ± 1.11 (15.28a)	15.35 ± 0.20 (15.40a)
Lipid (%)	8.09 ± 0.13	13.47 ± 1.65a	11.22 ± 2.05ab	12.45 ± 1.80a	8.00 ± 1.10c	9.35 ± 1.10bc
Gross energy (kJ g ⁻¹)	5.96 ± 0.00	8.56 ± 0.16a	7.98 ± 0.92ab	8.58 ± 0.88a	6.70 ± 0.31c	7.16 ± 0.54bc
Ash (%)	3.00 ± 0.02	3.59 ± 0.41a	2.90 ± 0.37b	2.68 ± 0.56b	3.01 ± 0.20b	3.04 ± 0.25b

¹Values presented as means ± standard deviation for data normally distributed and means ± standard deviation (median) for data not normally distributed.

Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by Tukey test. Medians in the same row with different letters differ (P<0.05) by Mann-Whitney test.

Table 6. Muscle and liver composition (wet weight basis); fat visceral and hepatosomatic index of Nile tilapia fed with experimental diets¹.

Diets	22.1%DP	25.6%DP	28.6%DP	31.9%DP	33.9%DP
<i>Muscle</i>					
Moisture (%)	76.20 ± 1.00	76.20 ± 0.60	76.70 ± 1.00	76.70 ± 0.10	77.20 ± 0.80
Protein (%)	18.10 ± 1.12	18.69 ± 0.58	18.46 ± 0.42	18.27 ± 2.09	17.92 ± 2.03
Lipids (%)	1.29 ± 0.38	1.17 ± 0.34	1.16 ± 0.11	1.04 ± 0.11	0.86 ± 0.20
Glycogen (%)	0.85 ± 0.32	1.09 ± 0.26	0.80 ± 0.29	0.81 ± 0.25	1.01 ± 0.37
<i>Liver</i>					
Soluble protein (mg 100 g ⁻¹)	79.32 ± 0.84a	84.90 ± 1.12ab	81.90 ± 0.88a	89.42 ± 1.79ab	94.75 ± 1.17b
Lipids (%)	13.90 ± 0.86b	11.41 ± 0.87a	10.24 ± 1.75a	10.50 ± 1.02a	10.42 ± 0.72a
Glycogen (%)	10.24 ± 0.36d	10.16 ± 0.46d	8.80 ± 0.17c	8.00 ± 0.18b	6.61 ± 0.48a

¹Values are means ± standard deviation. Means in the same row with different letters differ significantly (P<0.05).

Table 7. Specific activity (mIU mg protein⁻¹) amino acid catabolic, glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzyme in liver of Nile tilapia fed the experimental diets¹.

Diets	22.1%DP	25.6%DP	28.6%DP	31.9%DP	33.9%DP
<i>Amino acids catabolism</i>					
Alanine aminotransferase (ALT)	99.07 ± 14.07ab	79.66 ± 17.13a	100.50 ± 5.13ab	117.32 ± 7.67b	110.18 ± 9.96ab
Aspartate aminotransferase (AST)	401.65 ± 55.09	354.23 ± 77.96	390.06 ± 41.22	453.31 ± 52.06	449.74 ± 43.59
Glutamate dehydrogenase (GDH)	114.14 ± 6.34a	98.36 ± 11.08a	115.23 ± 12.16a	145.74 ± 10.45b	143.99 ± 7.29b
<i>Gluconeogenesis</i>					
Fructose-1,6-biphosphatase (FBPase)	19.58 ± 1.35a	18.63 ± 2.78a	24.60 ± 4.91ab	31.01 ± 4.20b	30.69 ± 0.91b
<i>Glycolysis</i>					
Glucokinase (HK-IV)	22.36 ± 1.97c	13.20 ± 3.66b	9.76 ± 2.60ab	7.50 ± 2.54ab	5.54 ± 0.57a
Hexokinase (HK)	15.20 ± 0.78b	10.72 ± 5.00ab	7.51 ± 0.94a	6.27 ± 0.54a	4.28 ± 2.44a
Pyruvate kinase (PK)	9.60 ± 1.07	8.93 ± 0.16	8.78 ± 1.51	15.45 ± 5.55	12.76 ± 2.50
<i>Pentose phosphate pathway</i>					
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	271.99 ± 19.53b	251.44 ± 17.37ab	235.50 ± 19.68ab	226.36 ± 32.01ab	193.85 ± 24.85a
<i>Lipogenesis</i>					
Malic enzyme (ME)	280.02 ± 22.51c	224.97 ± 36.82bc	184.12 ± 52.74ab	131.09 ± 12.16a	117.24 ± 23.46a
Fatty acid synthetase (FAS)	1.57 ± 0.14	1.56 ± 0.19	1.20 ± 0.09	1.42 ± 0.25	1.25 ± 0.19

¹Values are means ± standard deviation. Means in the sane row with different letters differ significantly (P<0.05).

Table 8. Apparent digestibility of nutrients and energy in the experimental diets for Nile tilapia¹.

Diets	22.1%DP	25.6%DP	28.6%DP	31.9%DP	33.9%DP
<i>Apparent digestibility coefficients (%)</i>					
Dry matter	87.71 ± 0.30a	85.83 ± 0.14a	80.64 ± 0.14b	79.73 ± 1.75b	74.98 ± 2.95c
Crude protein	92.18 ± 0.68ab	93.05 ± 0.51a	90.42 ± 0.41b	92.38 ± 0.67ab	91.43 ± 1.32ab
Gross energy	89.80 ± 0.34a	88.47 ± 0.18a	83.88 ± 0.35b	83.78 ± 1.53b	80.02 ± 2.43c

¹Values presented as means ± standard deviation. n= 3.

Means in the same row with different letters differ (P<0.05) by Tukey test.

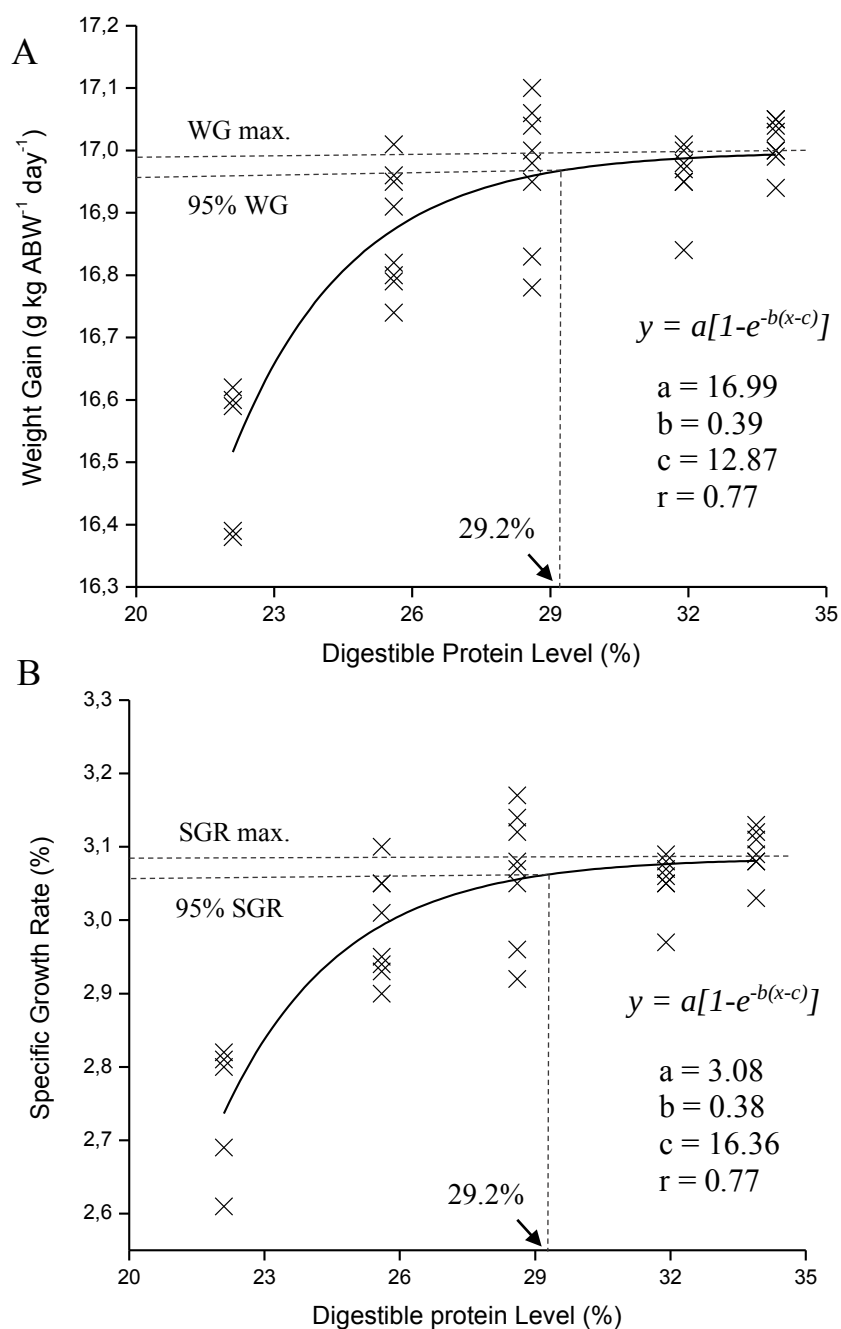


Fig 1. Exponential model fitting weight gain (g kg ABW⁻¹ day⁻¹) (A) and specific growth rate (%) (B) to dietary digestible protein level (%) in fish fed the experimental diets. Dietary digestible protein value is indicated by the abscissa value corresponding to 95% of the maximum response. Each graph point represents the average value of each tank.

CAPÍTULO III

Perfil hematológico e bioquímico da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo níveis de proteína digestível e submetida à diferentes fatores de estresse

Perfil hematológico e bioquímico da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas contendo níveis de proteína digestível e submetida à diferentes fatores de estresse

Resumo: A pesquisa objetivou avaliar os efeitos de cinco níveis (22,1; 25,6; 28,6; 31,9; e 33,9%) de proteína digestível (PD) sobre o perfil hematológico e bioquímico da tilápia-do-Nilo, antes e após estresse. Para tal, 440 alevinos ($9,27 \pm 0,22$ g) distribuídos ao acaso em 40 aquários (250 L cada) em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e oito repetições, receberam as dietas experimentais durante 110 dias. Após período de alimentação, os peixes, em diferentes grupos, foram submetidos somente à um dos seguintes agentes estressores: estresse por baixa temperatura, estresse térmico, transporte ou classificação. Peixes alimentados com a dieta contendo 22,1% PD apresentaram valores superiores ($P < 0,05$) para proteína plasmática total, triglicerídeos e colesterol. Efeito significativo se verificou para o número de neutrófilos, sendo este mais elevado para peixes que receberam as dietas com 28,6 e 31,9% PD. O estresse por baixa temperatura determinou aumentos na hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média para peixes que receberam as dietas com 25,6 e 31,9% PD. A concentração de glicose e triglicerídeos aumentou ($P < 0,05$) para peixes alimentados com as dietas contendo 22,1 e 31,9% PD, respectivamente. Após estresse térmico observou-se aumentos na concentração de hemoglobina corpuscular média e triglicerídeos, independente do nível de PD. O estresse por transporte determinou aumentos na concentração de hemoglobina corpuscular média e glicose, independente da condição nutricional dos peixes. Após estresse por classificação, nenhuma das dietas influenciou as concentrações de glicose e triglicerídeos, que aumentaram após estresse ($P < 0,05$). Observou-se leucopenia, linfopenia e neutrofilia para todos os estresses avaliados. As dietas contendo níveis de proteína digestível determinaram, em diferentes proporções, alterações metabólicas adaptativas que podem ter possibilitado o enfrentamento do estresse pelos peixes sem prejuízos à saúde. Portanto, o nível ótimo de 29,2% de PD que atende as necessidades para crescimento da tilápia-do-Nilo é equivalente ao exigido em situações de estresse.

Palavras-chave: agentes estressores, digestibilidade, nutrição e saúde, *Oreochromis niloticus*

Hematological and biochemical profile of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein and subjected to stress

Abstract: This study aimed to evaluate the effects of five levels (22.1, 25.6, 28.6, 31.9 and 33.9%) of digestible protein (DP) on hematological and biochemical profile of Nile tilapia, before and after stress. We used 440 fingerlings (9.27 ± 0.22 g), randomly distributed in 40-250 L aquaria. The fish were fed for 110 days with experimental diets. The experimental design was entirely randomized with five treatments and eight repetitions. At the end of the feeding period fish were randomly divided into different groups and each group was submitted only one of these four types of stress: cold-induced stress, heat-induced stress, transport-induced stress or grading-induced stress. Plasma protein levels, serum triglycerides and cholesterol levels were affected by DP level, being higher ($P < 0.05$) for fish fed diets containing 22.1% DP. Significant effect was also observed for neutrophil, being higher ($P < 0.05$) for fish fed diets containing 28.6 and 31.9% DP. Cold-induced stress increased hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration for fish fed diets containing 25.6 and 31.9% DP. Serum glucose and triglycerides concentration increased ($P < 0.05$) for fish fed diets containing 22.1 and 31.9% DP, respectively. After heat-induced stress, increase on mean corpuscular hemoglobin concentration and triglycerides were observed, independently of DP level. Transport-induced stress increase mean corpuscular hemoglobin concentration and glucose, irrespective of fish status nutrition. After grading-induced stress, increase on glucose and triglycerides concentration were observed, independently of DP level. Leukopenia, lymphopenia and neutrophilia were observed for all types of stress. Diets containing digestible protein levels determined, in different proportions, adaptive metabolic changes that may have enabled the coping stress by fish, without no damage to health. Therefore, the optimum protein level of 29.2% DP that meet requirement to growth it is equivalent to required in stressful conditions.

Key-words: stressors, digestibility, nutrition and health, *Oreochromis niloticus*

1. Introdução

Na criação intensiva, diversos fatores podem agir como potencial fonte de estresse aos peixes, exigindo mecanismos de respostas para restabelecimento da homeostase, garantindo assim a sobrevivência dos animais. As respostas ao estresse são caracterizadas por alterações hormonais e metabólicas que conferem ao organismo maior aporte de substrato energético para enfrentamento da situação adversa (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Entretanto, efeitos prejudiciais que atingem o organismo podem ocorrer quando os mecanismos de resposta são frequentemente exigidos. Menores crescimento e resistência à doenças são exemplos de tais efeitos (Okamura et al., 2007; Costas et al., 2008; Veras et al., 2013). Desse modo, a adoção de estratégias que permitam manter os animais saudáveis durante a criação é condição essencial para otimização da produção.

A proteína é considerada nutriente de importância para adequado crescimento e, portanto, para se alcançar eficiência na produção, é necessário que as dietas sejam formuladas em atendimento às exigências da espécie (Abdel-Tawwab, 2012). Contudo, evidências científicas tem apontado que sob estresse as exigências em proteína e aminoácidos podem ser alteradas em virtude do maior aporte exigido em vias metabólicas consideradas importantes para enfrentamento dos estímulos adversos (Aragão et al., 2008; Costas et al., 2008, 2011, 2012). Assim, as implicações dos teores de proteína sobre as respostas ao estresse necessitam ser investigadas para melhor definição das exigências nutricionais em condições em que a situação de estresse é inevitável.

A tilápia-do-Nilo está entre as espécies de peixes mais cultivadas no mundo e, portanto, diversas pesquisas buscam continuamente novas tecnologias e/ou alternativas com o intuito de melhorar o sistema de produção dessa espécie (Veras et al., 2013). Do ponto de vista prático, a identificação de dietas adequadas que conferem às tilápias maior resistência ao estresse se apresenta como estratégia viável para incremento da produtividade e competitividade da cadeia produtiva. Entretanto, os efeitos da proteína sobre as respostas de estresse da tilápia-do-Nilo ainda tem sido pouco investigado e, embora em alguns casos benefícios sobre a saúde e imunidade tenham sido relatados, os estudos restringe-se à avaliação de valores brutos (Abdel-Tawwab et al., 2005; Abdel-

Tawwab, 2012; Luz et al., 2012; Qiang et al., 2013; Hooley et al., 2014). Os efeitos da proteína digestível sobre as respostas de estresse da tilápia-do-Nilo ainda não foram investigados.

Dessa forma, esta pesquisa objetivou avaliar os efeitos de diferentes níveis de proteína digestível sobre o perfil hematológico e bioquímico da tilápia-do-Nilo, antes e após a exposição ao estresse por baixa temperatura, térmico, transporte e classificação.

2. Material e Métodos

O estudo foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Câmpus de Botucatu. Os procedimentos adotados na condução deste experimento foram aprovados pelo comitê de ética da instituição (protocolo nº 163/2012 CEUA).

2.1 Dietas experimentais

Cinco dietas foram formuladas de modo a conter níveis de proteína digestível (PD) de 22,1; 25,6; 28,6; 31,9 e 33,9% (Tabela 1), tendo como base os dados apresentados no NRC (2011) e por Furuya et al. (2010). As análises químicas foram conduzidas de acordo com os métodos descritos na AOAC (2000).

Para confecção das rações, os ingredientes foram pesados, homogeneizados e moídos em partículas menores que 0,7 mm (peneira Tyler-24). Posteriormente, as rações foram umedecidas com a adição de 23% de água (70°C) e submetidas ao processo de extrusão, em equipamento de rosca simples (Exteec®, Ribeirão Preto, Brasil). Após secagem em estufa (55°C por 24 h) e incorporação do óleo na forma de banho, os grânulos foram moídos e peneirados para obtenção de péletes com diâmetro aproximado de 1,70; 2,00; 2,36; 2,80; 3,36 e 4,00 mm, que foram sequencialmente ofertados durante o experimento em função do tamanho dos peixes. As dietas foram armazenadas em câmara fria (4°C) até sua utilização. A composição proximal e perfil de aminoácidos das rações estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

2.2 Animais e condições experimentais

Alevinos de tilápia-do-Nilo, provenientes da Piscicultura Fernandes (Palmital, São Paulo), foram inicialmente alojados em um tanque circular (1000 L) para adaptação e posterior distribuição nos aquários experimentais. Os animais permaneceram nestas condições durante 20 dias, recebendo a dieta controle (26,8% PD/12,7 kJ ED g⁻¹) quatro vezes ao dia.

Após período adaptativo, 440 alevinos com peso médio de $9,27 \pm 0,22$ g foram aleatoriamente distribuídos em 40 aquários de formato circular (250 L; n = 11), dotados por sistema de recirculação de água, filtro mecânico e biológico, aquecimento controlado por termostato digital e aeração. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e oito repetições.

As tilápias foram alimentadas com as dietas contendo níveis de proteína digestível, *ad libitum*, durante 110 dias. As rações foram ofertadas em quatro porções diárias, em intervalos de tempo de 3 h, com início às 8 h:30 min. As variáveis indicadoras da qualidade de água, tais como pH ($6,54 \pm 0,08$), oxigênio dissolvido ($6,11 \pm 0,26$ mg L⁻¹), condutividade elétrica ($0,29 \pm 0,03$ mS cm⁻¹), sólidos totais dissolvidos ($0,19 \pm 0,02$ g L⁻¹) e temperatura (manhã: $25,88 \pm 1,13$ °C; tarde: $26,43 \pm 1,27$ °C) foram monitorados utilizando-se sonda multi probe YSI 556® (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA) e a amônia tóxica ($0,002 \pm 0,000$) medida utilizando-se kit (Labcon®) mantiveram-se dentro das condições de conforto para a espécie estudada (Boyd, 1996).

Ao final do período de alimentação, após 12 h de jejum, foram retirados aleatoriamente, oito peixes por tratamento (um peixe por aquário) para determinação do perfil hematológico e bioquímico anterior ao estresse. Posteriormente, os peixes, provenientes de novas amostragens e em diferentes grupos, foram submetidos somente a um dos seguintes estresses: estímulo pelo frio, térmico, transporte e classificação. Ao término de cada desafio, foram coletadas alíquotas de sangue dos animais para análise hematológica e bioquímica posterior ao estresse.

2.3 Estresse por baixa temperatura

Após 110 dias de alimentação com as dietas experimentais, 40 juvenis ($204,53 \pm 54,39$ g; oito peixes por tratamento) capturados aleatoriamente foram transferidos para a sala experimental de desafio por temperatura do AquaNutri – UNESP/Botucatu, composta por 20 aquários de 40 L (dois peixes por aquário), dotados por sistema de recirculação de água, aeração constante e controle de temperatura. A transferência dos peixes foi realizada quando a temperatura da água de ambas as estruturas experimentais estava próxima de 23°C. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e oito repetições, sendo cada peixe considerado uma repetição.

Posteriormente, com o auxílio de trocadores de calor, a temperatura ambiente foi reduzida, gradativamente (1°C h^{-1}), até se atingir 17°C, o que ocorreu em aproximadamente 8 h, sendo mantida por 30 h. Durante o período de desafio, os animais foram alimentados com as mesmas dietas experimentais fornecidas no ensaio de alimentação. Os parâmetros físicos e químicos da água, como pH, teor de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), saturação de oxigênio dissolvido (%) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foram monitorados durante a permanência dos animais na sala experimental de desafio utilizando-se sonda multi probe YSI 556® (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA).

2.4 Estresse térmico

O estresse térmico foi conduzido na mesma estrutura e delineamento experimental utilizado no estresse por baixa temperatura. Os aquários foram limpos, a água renovada, retirada a aeração e colocado, em cada aquário, aquecedores de 80 watts.

Posteriormente ao estresse pelo frio, 40 peixes ($207,92 \pm 56,23$ g; oito peixes por tratamento) capturados aleatoriamente, foram transferidos para sala de desafio (dois peixes por aquário) e a temperatura da água foi elevada gradativamente (1°C h^{-1}) até atingir 32°C, o que ocorreu em aproximadamente 8 h. Os animais permaneceram nesta condição por 30 h. A transferência dos peixes foi realizada quando a temperatura da água de ambas as estruturas experimentais estava próxima de 26°C. Os peixes foram

arraçoados conforme descrito no estresse por baixa temperatura. Foram monitorados a concentração de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), saturação de oxigênio dissolvido (%), o pH e a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da água dos aquários utilizando-se sonda multi probe YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA).

2.5 Estresse por transporte

Após 110 dias de alimentação com as dietas experimentais, os animais ($258,47 \pm 71,59$ g; oito peixes por tratamento) foram transferidos para gaiolas com capacidade para 11 L, confeccionadas em tela plástica, e acondicionadas em caixa de transporte (capacidade para 600 L) com suprimento constante de oxigênio puro difundido por mangueiras micro-perfuradas, permanecendo nestas condições por quatro horas. Foram monitorados, antes e durante o transporte (a cada hora), a concentração de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), saturação de oxigênio dissolvido (%), o pH, condutividade elétrica (mS cm^{-1}), sólidos totais dissolvidos (g L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) da água da caixa de transporte utilizando-se sonda multi probe YSI 556[®] (YSI Environmental, Yellow Spring, OH, USA) e amônia tóxica (ppm – Kit Labcon[®]).

2.6 Estresse por classificação

No estresse por classificação de tamanho, os animais ($250,09 \pm 111,34$ g; 28 peixes por tratamento) foram capturados e adensados em cinco aquários (250 L) possuindo em seu interior uma gaiola confeccionada em tela plástica, para posterior simulação do estímulo estressor, realizado em laboratório. Após período de 24 h, as gaiolas foram suspensas durante 15 minutos, porém possibilitando a permanência dos animais na água simulando-se a condição de adensamento que ocorre durante a execução da prática em campo. Em seguida, as gaiolas foram retiradas dos aquários e os peixes foram mantidos sob uma mesa, separados por tamanho e após um minuto retornavam aos aquários. Logo após foram retirados, aleatoriamente, oito peixes de cada tratamento para coleta das amostras de sangue.

2.8 Análises hematológicas e bioquímicas

Os peixes foram anestesiados com benzocaína (67 mg L^{-1}) e, por punção da veia caudal, o sangue foi coletado utilizando seringas de 1 mL banhada com anticoagulante (EDTA 3,0%, Vtec, Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ).

O número de eritrócitos foi determinado pelo método do hemocítômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Toluidina Merck® a 0,01% em pipeta automática, na proporção de 1:200. A porcentagem de hematócrito (HTC) foi obtida utilizando-se o método do microhematócrito, de acordo com Goldenfarb et al. (1971). A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG) para determinação colorimétrica, segundo Collier (1944).

Com base nos resultados obtidos nessas análises foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio [$\text{VCM} = (\text{Hematócrito} \times 10) / \text{eritrócitos}$] e concentração de hemoglobina corpuscular média [$\text{CHCM} = (\text{Taxa de hemoglobina} \times \text{Hematócrito}) \times 100$], conforme Wintrobe (1934).

A diferenciação dos leucócitos foi realizada por meio de extensões em lâminas, coradas com May-Grünwald Giemsa (duas lâminas por peixe). A contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100 vezes. Foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular (linfócito, neutrófilo e monócito). A contagem total de leucócitos foi realizada em extensões coradas por meio da relação eritrócito/leucócito. Em cada extensão foram contadas 2000 células marcando-se o número de leucócitos (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A proteína plasmática total (PPT) foi mensurada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg, pela quebra do capilar de microhematócrito logo acima da camada de leucócitos, após a leitura do hematócrito. Para a análise de albumina (ALB) foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante. Estas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 10 minutos para a obtenção do soro. A quantidade de albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG), para determinação colorimétrica. Após determinação da albumina e da proteína plasmática calculou-se a globulina (GLOB) no soro e, posteriormente, a relação albumina:globulina (A:G) (Jain,

1986). As análises de glicose, triacilglicerol e colesterol foram realizadas com o uso de kits específicos (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG) conforme as instruções do fabricante, sendo feito leitura em espectrofotômetro.

2.9 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Minitab® 16.1.1.0 (Minitab Inc. 2010). Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade e, quando verificada distribuição normal procedeu-se à análise de variância complementada com o teste de comparação de médias de Tukey ($\alpha = 5\%$).

Para os dados que não seguiram distribuição normal, possíveis transformações foram aplicadas, entretanto, a premissa da normalidade não pode ser atendida em todos os casos e, por isso, utilizou-se análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) complementada com o teste de comparações de Mann-Whitney. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão para variáveis com distribuição normal e média $\pm$ desvio padrão (mediana) para variáveis com distribuição não normal.

Os efeitos dos momentos anterior e posterior aos estresses também foram comparados empregando-se a técnica da análise não paramétrica devido à limitação relativa ao n amostral entre grupos ($n = 16$). Nestes casos, os dados estão apresentados como mediana (valor mínimo e máximo).

3. Resultados

3.1 Perfil hematológico e bioquímico

No período anterior aos estímulos houve influência dos níveis de proteína digestível sobre a proteína plasmática total, triglicerídeos e colesterol. Peixes alimentados com a dieta contendo 22,1% PD apresentaram, para estas variáveis, valores superiores ($P < 0,05$; Tabela 3). Efeito significativo se verificou para o número de neutrófilos, sendo este mais elevado ($P < 0,05$) para peixes que receberam as dietas com 28,6 e 31,9% PD (Tabela 4).

3.2 Estresse por baixa temperatura

A temperatura da água dos aquários manteve-se entre $17,05 \pm 0,27^{\circ}\text{C}$ durante a permanência dos animais na sala de desafio e a sobrevivência foi de 100%. A concentração de oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio dissolvido e pH apresentaram variações de $10,55 \pm 0,32 \text{ mg L}^{-1}$; $110,65 \pm 3,47\%$; $7,55 \pm 0,04$; respectivamente e mantiveram-se dentro da faixa de conforto para espécie (Boyd, 1996).

O estímulo pelo frio determinou aumentos ($P < 0,05$) na Hb e CHCM para peixes que receberam a dieta contendo 25,6% PD. Esta última variável se elevou, após estresse, nos animais alimentados com a dieta contendo 31,9% PD (Tabela 5).

Com relação à PPT observou-se efeito ($P < 0,05$) para o nível de 31,9% PD. Para estes animais os níveis séricos desse componente reduziram significativamente após estresse. A ALB não se alterou ($P > 0,05$) para os peixes alimentados com a dieta contendo 25,6% PD, enquanto que para os demais tratamentos houve redução ($P < 0,05$) independente do conteúdo proteico da dieta. A relação A:G foi menor ($P < 0,05$) para peixes que receberam a dieta de menor conteúdo proteico (22,1%), comparando-se o momento anterior ao estresse (Tabela 6).

A concentração de glicose foi afetada ($P < 0,05$) pelo estresse nos peixes que receberam as dietas com 22,1 e 33,9% PD. Após exposição dos animais à baixa temperatura (17°C por 30 h) verificou-se, para estes tratamentos, aumento nos níveis séricos de glicose. Foi constatada redução dos triglicerídeos em resposta ao estresse, quando peixes foram alimentados com a dieta contendo 31,9% PD (Tabela 6).

Após estresse por baixa temperatura houve alterações significativas na contagem de leucócitos. Foi observado leucopenia, linfopenia e neutrofilia em todos os tratamentos. Observou-se, ainda, aumento no percentual de monócitos excetuando-se os peixes alimentados com a dieta contendo 22,1% PD (Tabela 8).

Considerando o momento posterior ao estresse observou-se efeito dos níveis de PD para relação A:G, triglicerídeos e colesterol. Os peixes alimentados com a dieta contendo 22,1% PD apresentaram a menor relação A:G e maiores valores de triglicerídeos e colesterol no soro, apesar de não serem diferentes ($P > 0,05$) dos níveis de 25,6 e 28,6% PD (Tabela 7).

3.3 Estresse térmico

A temperatura da água dos aquários manteve-se a $31,8 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ durante a permanência dos peixes na sala de desafio e a sobrevivência foi de 100%. Para as demais variáveis indicadoras da qualidade de água obtiveram-se valores médios considerados aceitáveis à criação de peixes (saturação de oxigênio dissolvido: $83,21 \pm 2,17\%$; concentração de oxigênio dissolvido: $6,10 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$; pH: $6,93 \pm 0,27$), segundo Boyd (1996).

Após estresse térmico observou-se aumento ($P < 0,05$) do HTC nos animais que receberam a dieta com 22,1% PD. O estresse não influenciou a Hb dos peixes alimentados com a dieta contendo 33,9 % PD, enquanto que para os demais tratamentos se verificou aumentos significativos. A CHCM aumentou ($P < 0,05$) em relação ao momento anterior ao estímulo, para todos os tratamentos (Tabela 9). Nenhum efeito do estresse ($P > 0,05$) foi observado com relação a PPT, ALB, GLOB e A:G (Tabela 10).

A glicose sanguínea se elevou ($P < 0,05$) nos peixes que receberam as dietas com 22,1 e 25,6% PD, enquanto que para triglicerídeos verificou-se diminuição ($P < 0,05$) independente do nível de PD. Peixes alimentados com a dieta contendo 25,6% PD apresentaram níveis séricos de colesterol superiores ($P < 0,05$) aos valores iniciais (Tabela 10).

O estresse térmico determinou redução ($P < 0,05$) no número de leucócitos e percentual de linfócitos, independente da dieta fornecida aos animais. Nenhum efeito ($P > 0,05$) foi verificado em relação ao número de neutrófilos para os peixes que receberam as dietas com 28,5 e 31,9% PD. Aumentos significativos no percentual de monócitos foram observados para peixes alimentados com as dietas contendo 22,1; 28,6; 31,9 e 33,9% PD (Tabela 12).

Os níveis de PD influenciaram a concentração final de PPT e colesterol. Peixes que receberam a dieta contendo 22,1% PD apresentaram a maior ($P < 0,05$) concentração de PPT, porém não foram diferentes ($P > 0,05$) dos peixes alimentados com 25,6 e 28,6% PD. O colesterol foi mais elevado nos peixes do tratamento de menor conteúdo proteico (22,1%) (Tabela 11).

3.4 Estresse por transporte

Houve aumentos na concentração de amônia tóxica e sólidos totais dissolvidos durante o período de permanência dos animais na caixa de transporte. No entanto, os valores não foram considerados críticos à espécie (Boyd, 1996) e ao final do desafio não se verificou mortalidades. Os valores médios para temperatura, saturação de oxigênio dissolvido, concentração de oxigênio dissolvido, pH, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica e amônia tóxica foram de $25,95 \pm 0,48^{\circ}\text{C}$; $172,20 \pm 48,31\%$; $13,99 \pm 4,05 \text{ mg L}^{-1}$; $6,38 \pm 0,07$; $0,20 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$; $0,31 \pm 0,01 \text{ mS cm}^{-1}$; $0,003 \pm 0,002 \text{ ppm}$, respectivamente.

O estresse por transporte determinou aumentos ($P<0,05$) no número de eritrócitos dos peixes alimentados com a dieta contendo 31,9% PD. A Hb se elevou ($P<0,05$), entretanto, para peixes que receberam as dietas com 22,1; 25,6 e 31,9% PD. A CHCM e glicose foram mais elevadas ($P<0,05$) após estresse, independente do nível de PD da dieta (Tabelas 13 e 14). O estresse provocou, ainda, diminuição dos triglicerídeos ($P<0,05$) para os animais alimentados com a dieta de maior conteúdo proteico (33,9%) (Tabela 14). Houve linfopenia, leucopenia, neutrofilia e monocitofilia, independente do nível de PD da dieta (Tabela 16).

Os diferentes níveis de PD influenciaram as concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol dos peixes desafiados (Tabela 15) determinando menores valores ($P<0,05$) para indivíduos que receberam as dietas contendo 31,9 e 33,9% PD. Verificou-se menor número e percentual de linfócitos para os peixes alimentados com a dieta contendo 33,9% PD (Tabela 17).

3.5 Estresse por classificação

Observaram-se alterações ($P<0,05$), após estresse, no número de eritrócitos para os peixes alimentados com as dietas contendo 31,9 e 33,9% PD. O HTC reduziu ($P<0,05$) nos peixes que receberam a dieta com 33,9% PD, enquanto que a Hb aumentou significativamente nos tratamentos com 28,6 e 31,9% PD. A CHCM não foi influenciada pelo estresse nos animais que receberam a dieta com 28,6% PD (Tabela 18).

Observou-se redução nas PPT e ALB para os peixes alimentados com a dieta de menor conteúdo PD (22,1%). A relação A:G reduziu, entretanto, nos peixes alimentados com as dietas contendo 22,1 e 31,9% PD. Os parâmetros de glicose e triglicerídeos foram influenciados ($P<0,05$) pelo estresse independente do nível PD da dieta (Tabela 19). O estresse por classificação determinou linfopenia, neutrofilia e monocitofilia, para os peixes de todos os tratamentos (Tabela 21). A sobrevivência, após estresse, foi de 100%.

4. Discussão

4.1 Perfil hematológico e bioquímico anterior ao estresse

Os níveis de proteína digestível (22,1 a 33,9%) não afetaram a eritropoiese dos peixes e os valores observados mantiveram-se dentro do intervalo de referência estabelecido para espécie (Hrubec e Smith, 2010) e ao obtido para tilápias híbridas, em condições experimentais semelhantes (Sá et al., 2004; Barros et al., 2009, 2014; Teixeira et al., 2012). Entretanto, observou-se alterações na PPT que não refletiram os níveis de proteína da dieta, conforme observado por Abdel-Tawwab et al. (2005).

As proteínas plasmáticas podem representar fonte prontamente disponível de aminoácidos e, portanto, serem utilizadas pelo organismo para formar proteínas celulares onde quer que seja necessário (Guyton e Hall, 2011). Dessa forma, as concentrações plasmáticas podem refletir suas taxas de síntese e utilização em detrimento às diferentes condições metabólicas (Wu, 2013). Portanto, as diferenças observadas neste estudo podem estar relacionadas a ajustes metabólicos e fisiológicos determinados, possivelmente, em função da composição da dieta e, assim, não podem ser justificados como resultante unicamente da concentração de proteína.

Neste estudo, os incrementos dos níveis de proteína da dieta resultaram em variação no conteúdo de amido, em que maiores concentrações foram verificadas para os mais baixos níveis de proteína (39,24 e 35,99% para as dietas com 22,1 e 25,6% PD, respectivamente). Esta condição, portanto, provavelmente determinou alterações com relação aos triglicerídeos e colesterol sérico, pois, o excedente de carboidrato pode ser transformado em triglicerídeos e armazenado no tecido adiposo. Os triglicerídeos,

formados no fígado, são transportados ao tecido adiposo pelas VLDLs, lipoproteínas contendo concentrações moderadas de colesterol e fosfolípidos, o que explicaria os níveis mais altos de colesterol (Guyton e Hall, 2011).

Os níveis dietéticos de proteína podem, ainda, influenciar a eficácia da resposta imune (Tort et al., 2003; Wu, 2013; Pohlenz e Gatlin III, 2014). Portanto, é provável que o menor número de neutrófilos observado para peixes que receberam dietas contendo baixos níveis de proteína digestível (22,1 e 25,6%) tenha sido influenciado pela condição nutricional dos peixes, uma vez que a granulopoiese é regulada por citocinas produzidas por uma variedade de células. Por outro lado, o aumento no número de neutrófilos observado para peixes alimentados com as dietas contendo 28,6 e 31,9% PD, pode ser interpretado como resposta ao estresse (Campbell, 2012). A tilápia-do-Nilo exibe marcante comportamento de hierarquia social e, portanto, as alterações no número de leucócitos circulantes poderiam ter sido determinadas em função dos confrontos agonísticos observados ao longo do experimento. Resposta similar foi constatada em estudos com tilápia-do-Nilo frente ao estresse (Falcon et al., 2008; Teixeira et al., 2012; Barros et al., 2014).

4.2 Desafios

Peixes expostos a temperaturas abaixo da faixa de conforto apresentam metabolismo reduzido, o que pode afetar a condição fisiológica e determinar redução no perfil hematológico (Atwood et al., 2003; Falcon et al., 2008; Signor et al., 2010; Araujo et al., 2011; Barros et al., 2014; Guimarães et al., 2014; Shi et al., 2015). Entretanto, os resultados desta pesquisa mostraram que o estresse por baixa temperatura não afetou a eritropoiese (Tabela 5), sugerindo que os peixes foram capazes de manter padrão hematológico constante sob estresse. Os aumentos ($P < 0,05$) na Hb e CHCM observados para peixes que receberam as dietas com 25,6% PD podem significar maior capacidade de transporte de Hb pelos eritrócitos e, conseqüentemente, de oxigênio. Há evidências de que estas alterações ocorrem em atendimento ao aumento da demanda fisiológica imposta pela situação adversa (Barros et al., 2014) sugerindo, portanto, que a dieta contendo 25,6% PD foi menos efetiva no preparo para enfrentamento do estresse, exigindo dos peixes mecanismos de resposta adaptativa. O mesmo pode ser atribuído à

dieta contendo 31,9% PD, apesar da ausência de efeito significativo para Hb. Esses resultados são contrários a suposição de que o estresse por baixa temperatura determina prejuízo na síntese de células vermelhas, menor hematócrito e hemoglobina, como constatado em estudos com tilápia-do-Nilo (Barros et al., 2009; Signor et al., 2010; Fernandes Junior et al., 2010; Araujo et al., 2011; Guimarães et al., 2014). As diferenças encontradas são, portanto, atribuídas ao tempo e temperatura de exposição avaliado que, no caso deste estudo (17°C por 30 h), induziram respostas de estresse agudo como demonstrado pelas modificações adaptativas. Nos trabalhos mencionados o período e temperatura do estresse variaram de 3 a 7 dias e de 13 a 17°C, respectivamente.

A elevação dos níveis plasmáticos de glicose configura-se como resposta fisiológica de ajuste para restauração da homeostase durante estresse. Desse modo, a manutenção de elevados níveis de glicose observado para peixes que receberam as dietas contendo 22,1 e 33,9% PD sugere possível ativação da via gliconeogênica e da glicogenólise, atribuída ao cortisol e catecolaminas, para atender a maior demanda de energia devido ao estímulo imposto (Costas et al., 2008, 2011; El-Khaldi, 2010; Jun et al., 2015). Aumentos nas concentrações séricas de glicose podem representar estratégia para incremento da atividade enzimática, induzida por maior síntese de enzimas, para compensar as menores taxas de reação enzimática em condições de baixa temperatura (Atwood et al., 2003; Somero, 2004).

A ausência de efeito significativo para glicose sanguínea observada em níveis intermediários de proteína digestível (25,6; 28,6 e 31,9%) pode sugerir possível diferenças nas respostas de estresse entre indivíduos, pois, a falta de efeito não significa que o estresse não tenha determinado aumentos na atividade gliconeogênica. O estímulo à glicogenólise e gliconeogênese, atribuído ao cortisol, pode não determinar necessariamente aumentos na concentração de glicose plasmática, uma vez que está relacionado a taxa de turnover de glicose no peixe (Mommsen et al., 1999).

Assim como os carboidratos, os triglicerídeos podem ser utilizados para fornecer energia aos diferentes processos metabólicos durante estresse. Neste estudo observou-se que os níveis de triglicerídeos séricos diminuíram após estresse, embora significativo somente para peixes que receberam a dieta contendo 31,9% PD. Essa diminuição sugere, portanto, que o estresse por baixa temperatura determinou alterações na

mobilização e circulação de lipídeos entre fígado e tecidos (Chang et al., 2006; Jun et al., 2015).

Os triglicerídeos armazenados, em grande parte, no tecido adiposo podem ser rapidamente mobilizados por diversas alterações hormonais. O estresse faz com que a corticotropina seja liberada pela hipófise anterior fazendo com que o córtex adrenal secrete quantidades adicionais de glicocorticoides. Tanto a corticotropina, como os glicocorticoides ativam a lipase triglicerídeo sensível a hormônio, presente no tecido adiposo, promovendo a hidrólise dos triglicerídeos armazenados, que são transportados aos tecidos e utilizados como fonte de energia e/ou para síntese de outros lipídeos (Guyton e Hall, 2011). Com base no exposto e nos resultados obtidos neste estudo, é provável que os triglicerídeos mobilizados estejam sendo transportados ao fígado para síntese de fosfolípidios e colesterol. Essa suposição pode ser sustentada quando se considera a funcionalidade das lipoproteínas, responsáveis pelo transporte dos componentes lipídicos no sangue, e à mecanismos envolvidos na manutenção da fluidez de membrana em condições de baixa temperatura.

As lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) são especialmente importantes no transporte dos fosfolípidios e colesterol do fígado para os tecidos periféricos ou da periferia de volta para o fígado e são, portanto, moléculas relativamente ricas em colesterol (Guyton e Hall, 2011; Nelson e Cox, 2011). Além disso, quando os tecidos são expostos ao frio as cadeias de ácidos graxos dos triglicerídeos celulares ficam menores ou mais insaturadas, de modo a reduzir seu ponto de fusão permitindo que a gordura permaneça no estado líquido (Guyton e Hall, 2011). Segundo esses autores, a dessaturação dos ácidos graxos ocorre quase que exclusivamente nas células hepáticas e, desse modo, considerando que neste estudo os níveis plasmáticos de colesterol apresentaram, em alguns casos, concentrações aumentadas, as alterações na mobilização e circulação de lipídeos sob estresse por baixa temperatura podem ter sido condicionadas em detrimento à formação de elementos estruturais de membrana. Entretanto, a possibilidade de síntese de cortisol a partir do colesterol não deve ser descartada.

É importante notar que, para os peixes que receberam as dietas contendo 22,1 e 25,6% PD, a mobilização de triglicerídeos foi menor (25 e 37%, respectivamente) em comparação às demais dietas (47, 54 e 45%, respectivamente). Segundo Guyton e Hall

(2011) o excesso de carboidratos da dieta pode aumentar as reversas de gordura, pois, a disponibilidade de grande quantidade de glicose inibe, automaticamente, o uso de ácidos graxos como fonte de energia. Ainda, segundo os autores, este efeito pode ser devido ao aumento de acetil-CoA formada a partir dos carboidratos, criando assim, condições adequadas para síntese de triglicerídeos. As moléculas sintetizadas por esta via são transportadas pelas VLDLs para o tecido adiposo, onde são armazenadas (Guyton e Hall, 2011). Considerando que o conteúdo de amido das dietas contendo 22,1 e 25,6% PD foi maior (39,24 e 35,99%, respectivamente), essas suposições justificariam, em parte, a menor mobilização dos lipídeos e as maiores e menores concentrações de triglicerídeos e colesterol, respectivamente, observados após estresse (Tabelas 6 e 7).

Os efeitos metabólicos apresentados pelos peixes frente ao estresse por baixa temperatura, que provavelmente refletiram as principais ações do cortisol e catecolaminas (hiperglicemia e lipólise), foram caracterizados ainda por alterações nas concentrações de albumina sérica. Estudos com peixes têm demonstrado que o estresse pode induzir distúrbios osmóticos e iônicos levando ao decréscimo da osmolaridade do plasma, no caso de peixes de água doce (Aragão et al., 2008; Costas et al., 2008; Shi et al., 2015). Dessa forma, é provável que os desequilíbrios entre os compartimentos extracelular e intracelular tenham provocado mudanças no volume plasmático, determinando diminuição da albumina (Melo et al., 2009).

Além das alterações osmóticas e iônicas, os hormônios do estresse, especificamente o cortisol, podem exercer efeitos negativos sobre o sistema imunológico. Leucopenia, linfopenia e neutrofilia são frequentemente reportados em situações de exposição dos peixes à baixa temperatura (Falcon et al., 2008; Fernandes Junior et al., 2010; Barros et al., 2014). Neste estudo, além da queda no número de leucócitos acompanhada pelo decréscimo de linfócitos e aumento de neutrófilos, observou-se maiores percentuais de monócitos. A ausência de efeito significativo para número total de monócitos pode estar relacionada à grande variação na contagem das células. O mesmo pode ser atribuído para peixes que receberam a dieta contendo 22,1% PD referente ao número percentual de monócitos. Esses resultados sugerem que a condição fisiológica determinada pelo estresse poderá diminuir a resistência dos peixes à doenças se a situação adversa for mantida por tempo prolongado.

Ao contrário do que ocorre à temperaturas abaixo da faixa de conforto, peixes apresentam maior taxa metabólica quando são expostos à temperaturas elevadas e, portanto, mudanças nos parâmetros sanguíneos podem ser percebidas (Qiang et al., 2013). Neste estudo, o estresse térmico determinou alterações na Hb e CHCM, entretanto, para este caso, os efeitos foram independentes do nível dietético de proteína digestível. Essas alterações provavelmente ocorreram em atendimento ao aumento da demanda fisiológica, como evidenciado no estresse por baixa temperatura. Porém, apesar do aumento na CHCM, a dieta contendo 33,9% de PD parece prejudicar a eritropoiese. Tem sido demonstrado que o excesso de proteína da dieta pode causar estresse fisiológico e aumentar o dano sobre rim e fígado que poderiam resultar em menor número de eritrócitos (Qiang et al., 2013).

Além do aumento na captação de oxigênio observou-se redução significativa nas concentrações séricas de triglicerídeos, que foram independentes do nível de proteína digestível, entretanto, mais pronunciadas (89 a 65%) comparando-se ao estresse por baixa temperatura (25 a 54%). Em condições de elevada atividade metabólica, os aminoácidos podem constituir substrato preferencial para produção de energia ou, ainda, serem utilizados para síntese de moléculas envolvidas na mobilização de ácidos graxos (Aragão et al., 2008; Costas et al., 2008, 2011, 2012).

Para níveis de proteína mais baixos (22,1 e 25,6%) lisina e metionina poderiam ser utilizados para síntese de L-carnitina favorecendo o transporte de ácidos graxos ao sítio de oxidação (Harpaz, 2005). Esta condição é sustentada pelos elevados níveis de colesterol observados após estresse (Tabela 11), devido ser este transporte mediado pelas LDLs, lipoproteínas de elevado colesterol. Por outro lado, para os demais níveis de proteína avaliados (28,6; 31,9 e 33,9%) aspartato e glutamato foram mais elevados (Tabela 2) e, dessa forma, podem ter sido utilizados como substrato energético por serem as principais moléculas envolvidas no processo de transaminação (Costas et al., 2012). Essa condição poderia justificar a ausência de efeito sobre a glicose sanguínea para dietas de elevada proteína (>28,6%) e concordam, de certa forma, com as menores concentrações de proteína plasmática observadas para estes mesmos tratamentos (Tabela 11).

De modo similar ao verificado para o estresse por baixa temperatura, o estresse térmico determinou linfopenia, leucopenia e neutrofilia sugerindo que, tanto em

condições de baixa, quanto elevada temperatura, a resistência dos peixes à doenças pode estar comprometida. Isto implica que o prejuízo ocasionado por estes estressores às condições de higidez dos peixes fica evidente mesmo em condições nutricionais adequadas (Falcon et al., 2008; Fernandes Junior et al., 2010).

As respostas de estresse avaliadas por meio do perfil hematológico e bioquímico dos animais demonstraram, após o transporte, que as dietas contendo níveis de proteína digestível determinaram aumentos na captação de oxigênio e substratos energéticos independentes da condição nutricional dos peixes (Tabelas 13 e 14). Além disso, observou-se que este agente estressor foi mais prejudicial do que o estresse por baixa e elevada temperatura, concordando com o observado para tilápia-do-Nilo por Barros et al. (2014). A hiperglicemia observada, provavelmente, foi mantida por elevados níveis de cortisol, pois, este hormônio em situações de estresse, aumenta a disponibilidade de glicose por meio da ativação de enzimas gliconeogênicas (Aragão et al., 2008). Entretanto, observou-se que o estresse por transporte não determinou alterações nos valores de triglicerídeos séricos, exceto para dieta contendo 33,9% PD.

O transporte é considerado procedimento traumático, caracterizado por sucessão de estímulos adversos (manuseio, captura, adensamento, transporte propriamente dito) (Chagas et al., 2012) e, portanto, determinam a severidade do estresse, exigindo rápida mobilização de energia para manutenção da homeostase. Dessa forma, considerando que os aminoácidos constituem substratos preferencias para gliconeogênese em peixes (Mommsen et al., 1999) é provável que o fornecimento de glicose tenha sido mantido pela conversão de aminoácidos em carboidratos. Segundo Gayton e Hall (2011) os glicocorticoides aumentam a degradação de proteínas extra-hepáticas gerando, assim, quantidades elevadas de aminoácidos no plasma. Portanto, isso supostamente serviu como estímulo para elevar a intensidade da gliconeogênese e, assim, a manutenção de elevada glicose agiu como poupador de gordura e, provavelmente, aumentou as reservas lipídicas corporais como demonstrado pelos elevados valores de triglicerídeos e colesterol.

Os efeitos do estresse por transporte sobre a diferenciação e contagem total de leucócitos foram semelhantes ao descrito para os demais estresses. Entretanto, a dieta de elevada proteína (33,9%) determinou menor número de linfócitos (Tabela 17), que

podem estar associadas ao estresse fisiológico devido ao excesso de proteína como verificado para o estresse térmico (Qiang et al., 2013).

As respostas ao estresse por classificação determinaram alterações na Hb e CHCM, glicose e triglicerídeos, entretanto, o estímulo foi menos severo do que o estresse por baixa e elevada temperatura. Os efeitos obtidos para série vermelha sob essa condição de estresse determinaram prejuízos a eritropoiese quando peixes foram alimentados com dietas de elevada proteína (33,9%) (Tabelas 18 e 20) e, eventualmente, estão associados aos efeitos descritos previamente para estresse térmico e transporte. Elevados níveis de proteína (>28,6%) promoveram alterações na produção de albumina e globulina devido à menor A:G. Entre as proteínas do soro, as globulinas desempenham importante papel na resposta imune e, portanto, alterações nas concentrações séricas poderiam indicar maior resistência dos peixes à doenças (Kumar et al., 2015).

Este estudo confirmou a hipótese de que a adaptação do peixe à condição estressante está intimamente relacionada ao seu estado nutricional. Considerando-se a série vermelha, as dietas contendo níveis de proteína digestível determinaram, em diferentes proporções, alterações metabólicas adaptativas que possibilitaram o enfrentamento do estresse pelos peixes sem prejuízos à saúde. Contudo, analisando-se a série branca observou-se que as dietas não foram efetivas em amenizar os efeitos do estresse. Entretanto, para os mais baixos níveis de proteína estes efeitos revelaram menor capacidade de adaptação dos peixes ao estresse em comparação à níveis de proteína próximos à exigência da espécie. Portanto, o nível ótimo de proteína digestível de 29,2% para máximo crescimento atende as necessidades da tilápia-do-Nilo sob condições de estresse. É necessário destacar a importância da formulação de rações por parte da indústria com valores digestíveis, principalmente para proteína/aminoácidos e energia buscando atender as exigências de crescimento e saúde, minimizando perdas com custos endógenos e manutenção da higidez.

5. Referências

Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A., Sharaf, S.M., Ahmad, M.H., 2005. Effect of crowding stress some physiological functions of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fed different dietary protein levels. Intl. J. Zool. Res., 1, 41-47.

- Abdel-Tawwab, M., 2012. Interactive effects of dietary protein and live bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry and their challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquacult. Int.*, 20, 317-331.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. 17. ed. Arlington: Inc, 2000.
- Aragão, C., Corte-Real, J., Costas, B., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2008. Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino acids*, 34, 143-148.
- Araujo, D.M., Pezzato, A.C., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Nakagome, F.K., 2011. Hematology of Nile tilapia fed diets with vegetable oils and stimulated by cold. *Pesq. Agropec. Bras.*, 45, 294-302.
- Atwood, H.L., Tomasso, J.R., Webb, K., Gatlin III, D.M., 2003. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. *Aquac. Res.*, 34, 241-251.
- Barros, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., 2009. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquac. Res.*, 40, 895-903.
- Barros, M.M., Falcon, D.R., Orsi, R.O., Pezzato, L.E., Fernandes Jr., Guimarães, I.G., Fernandes Jr., A.; Padovani, C.R., Sartori, M.M.P., 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immun.*, 39, 188-195.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 1, 3-26.
- Boyd C.E., 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Shrimp Mart, Songkhla, Thailand.
- Campbell, T.W., 2012. Hematology of fish, in: Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R., Campbell, T.W. (Ed), *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, p.298-312.
- Chagas, E.C., Araújo, L.D., Boijink, C.L., Inoue, L.A.K.A., Gomes, L.C., Moraes, F.R., 2012. Tambaqui responses to stress due to transport after feeding with β -glucan supplemented diets. *Biotemas*, 25, 221-227.
- Chang, Y.M., Cao, D.C., Sun, X.W., Liang, L.Q., 2006. Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures. *Chin. J. Fish.*, 2, 71-75.

- Collier, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determination. *Can. Med. Assoc. J.*, 50, 550-552.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquac. Res.*, 39, 1-9.
- Costas, B., Conceição, L.E.C., Aragão, C., Martos, J.A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M., Afonso, A., 2011. Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, 316, 68-76.
- Costas, B., Aragão, C., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2012. Different environmental temperatures affect amino acid metabolism in the eurytherm teleost Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) as indicated by changes in plasma metabolites. *Amino Acids*, 43, 327-335.
- El-Khaldi, A., 2010. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Saudi J. Biol. Sci.*, 17, 241-246.
- Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Solarte, W.V.N., Guimarães, I.G., 2008. Differential leucocyte counts of Nile tilapia fed diets supplemented vitamin C and lipid and submitted to low temperature stress. *Ci. Anim. Bras.*, 9, 543-551.
- Fernandes Junior, A.C., Pezzato, L.E., Guimarães, I.G., Teixeira, C.P., Koch, J.F.A., Barros, M.M., 2010. Hematic response of Nile tilapia fed diets supplemented with choline and submitted to stimulus by low temperature. *R. Bras. Zootec.*, 39, 1619-1625.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Boscolo, W.R., Cyrino, J.E.P., Furuya, V.R.B., Feiden, A., 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 100p.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Path.*, 56, 35-39.
- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Santos, V.G., Orsi, R.O., Barros, M.M., 2014. Vitamin A affects haematology, growth and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.), but has not protective effect against bacterial challenge or cold-induced stress. *Aquac. Res.*, 1-15.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., 2011. Tratado de fisiologia médica. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1151p.
- Harpaz, S., 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition - a review. *Aquaculture*, 249, 3-21.

- Hooley, C.G., Barrows, F.T., Paterson, J., Sealey, W.M., 2014. Examination of the effects of dietary protein and lipid levels on growth and stress tolerance of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. World Aquacul. So., 45, 115-126.
- Hrubec, T.C., Smith, S., 2010. Hematology of fishes, in: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Ed). Schalm's veterinary hematology. USA: Wiley-Blackwell, p. 994-1003.
- Jain, N.C., 1986. Schalm's veterinary hematology. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febrieger, 1221p.
- Jun, Q., Hong, Y., Hui, W., Didlyn, K.M., Jie, H., Pao, X., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding. Aquac. Res., 46, 335-345.
- Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R., Vani, T., Brahmachari, R.K., Nayak, S.K., 2015. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* on haematological and immunological parameters of *Catla catla* (Hamilton). Aquacult. Int., 1-18.
- Luz, R.K., Ribeiro, P.A.P., Ikeda, A.L., Santos, A.E.H., Melillo Filho, R., Turra, E.M., Teixeira, E.A., 2012. Performance and stress resistance of Nile tilapias fed different crude protein levels. R. Bras. Zootec., 41, 457-461.
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Melo, M.M., Júnior, D.V., Teixeira, E.A., Guimarães, S.R., 2009. Proteic electrophoretic profile of chitralada tilapia nilotic (*Oreochromis niloticus*), exposed to hypoxia chronic stress. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 61, 1183-1190.
- Minitab, Inc: Minitab: Data Analysis Software, release 16.1.1.0. State College, Pa, Minitab Inc, 2010.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish., 9, 211-268.
- National Research Council - NRC., 2011. Nutrient Requirements of Fishes and Shrimp Washington: DC. National Academies Press, 376p.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2011. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 1274p.
- Okamura, D., Araújo, F.G., Logato, P.V.R., Murgas, L.D.S., Freitas, R.T.F., Araújo, R.V., 2007. Effect of vitamin C over the haematocrit and glycemia of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) alevins in simulated transport. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 59, 883-888.
- Pohlenz, C., Gatlin III, D.M., 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. Aquaculture, 431, 111-117.

- Qiang, J., Yang, H., Wang, H., Kpundeh, M.D., Xu, P., 2013. Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immun.*, 34, 8-16.
- Ranzini-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 140p.
- Sá, M.V.C., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Padilha, P.M., 2004. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture*, 238, 385-401.
- Signor, A., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., Barros, M.M., 2010. Hematological parameters of Nile tilapia: effect of diet and cold stress. *Ci. Anim. Bras.*, 11, 509-519.
- Shi, Gui-Cheng, Dong, Xiao-Hui, Chen, Gang, Tan, Bei-Ping, Yang, Qi-Hui, Chi, Shu-Yan, Liu, Hong-Yu., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. *Aquac. Res.*, 46, 658-668.
- Somero, G.N., 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic strategies. *Com. Biochem. Physiol. B*, 139, 321-333.
- Teixeira, C.P., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Fernandes Jr, A.C., Koch, J.F.A., Padovani, C.R., 2012. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. *Aquac. Res.*, 43, 1081-1088.
- Tort, L., Balasch, J., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Imunologia*, 22, 277-286.
- Veras, G.C., Murgas, L.D.S., Zangeronino, M.G., Rosa, P.V., Leon, J.A.S., Salaro, A.L., 2013. Photoperiod on physiological parameters related to stress in Nile tilapia fingerlings. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 65, 1434-1440.
- Wenderlaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.
- Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.*, 51, 32-49.
- Wu, G., 2013. Amino acids: biochemistry and nutrition. Boca Raton: CRC Press, 481p.

Table 1. Formulation (%) and analyzed composition of experimental diets.

Ingredients	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Soybean meal	20.26	28.57	31.75	45.25	53.73
Wheat middling	7.00	7.00	7.00	8.00	8.00
Meat and bone meal	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Poultry viscera meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Corn	52.64	45.79	37.50	30.09	22.28
Soybean oil	2.80	2.00	1.80	1.00	0.50
L-lysine	1.00	0.54	0.68	-	-
DL-methionine	0.38	0.32	0.25	0.18	0.13
L-threonine	0.57	0.46	0.35	0.24	0.14
L-tryptophan	0.13	0.09	0.05	0.01	-
Antioxidant (BHT) ¹	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Vitamin and mineral premix ²	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Salt	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin C ³	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>Analyzed composition (% dry matter)</i>					
Dry matter	94.79	94.71	94.86	93.58	92.47
Digestible energy (kJ g ⁻¹)	16.76	16.52	15.57	15.94	15.05
Crude fat	10.00	9.03	8.59	8.94	7.15
Crude fiber	1.39	1.99	2.33	2.64	3.27
Ash	7.39	7.86	8.18	9.04	9.19
Digestible protein	22.11	25.64	28.59	31.92	33.98
DE:DP (kJ g ⁻¹) ⁴	75.80	64.41	54.46	49.94	44.29

¹Butylated hydroxytoluene; ²Vitamin and mineral supplement (levels per kg of product): vitamin A = 1,200,000 IU; vitamin D3 = 200,000 IU; vitamin E = 12,000 mg; vitamin K3 = 2,400 mg; vitamin B1 = 4,800 mg; vitamin B2 = 4,800 mg; vitamin B6 = 4,000 mg; vitamin B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000 mg; vitamin C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; nicotinic acid = 24,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Cu = 4 mg e Se = 20 mg; ³Vitamin C Rovimix@ Stay-35, DMS Nutritional Products, Switzerland; ⁴DE:DP = digestible energy:digestible protein ratio.

Table 2. Composition (g 100 g⁻¹) and digestibility coefficients (%) of amino acids of experimental diets¹.

Composition	Digestible protein level (%)					Requirement Nile tilapia ²
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9	
<i>Essential amino acids</i>						
Arginine	1.27 (95.92)	1.50 (96.70)	1.80 (96.20)	2.02 (97.06)	2.28 (97.19)	1.26
Histidine	0.48 (96.05)	0.56 (96.36)	0.66 (94.82)	0.74 (95.85)	0.84 (95.90)	0.52
Isoleucine	0.77 (93.61)	0.89 (92.96)	1.15 (91.78)	1.30 (93.22)	1.46 (93.09)	0.93
Leucine	1.66 (94.75)	1.84 (94.38)	2.14 (92.39)	2.34 (93.43)	2.64 (93.20)	1.01
Lysine	1.84 (97.19)	1.61 (96.83)	2.02 (96.42)	1.78 (96.32)	2.03 (96.24)	1.53
Methionine	0.55 (98.39)	0.52 (98.32)	0.50 (96.78)	0.39 (97.37)	0.42 (97.07)	0.52
Phenylalanine	0.87 (94.78)	1.01 (94.66)	1.21 (92.85)	1.36 (94.13)	1.54 (93.93)	1.10³
Threonine	1.21 (95.62)	1.23 (95.62)	1.23 (92.48)	1.26 (93.01)	1.31 (92.30)	1.18
Valine	0.90 (92.85)	1.00 (92.14)	1.25 (90.51)	1.39 (92.34)	1.54 (91.85)	0.83
<i>Non-essential amino acids</i>						
Alanine	1.24 (91.35)	1.35 (91.05)	1.53 (86.99)	1.63 (90.45)	1.80 (89.34)	-
Aspartic acid	1.52 (98.17)	1.82 (98.48)	2.08 (97.39)	2.62 (98.51)	3.18 (97.52)	-
Cystine	0.18 (99.30)	0.23 (100.00)	0.24 (100.00)	0.28 (100.00)	0.34 (100.00)	-
Glutamic acid	4.00 (97.79)	4.61 (98.14)	5.36 (96.96)	6.13 (98.10)	6.94 (97.41)	-
Glycine	1.54 (91.23)	1.69 (91.55)	1.90 (86.98)	2.02 (90.77)	2.22 (89.58)	-
Proline	1.54 (93.61)	1.67 (93.81)	1.87 (89.89)	1.98 (92.45)	2.19 (92.47)	-
Serine	0.90 (95.37)	1.07 (96.05)	1.17 (93.98)	1.32 (94.41)	1.55 (94.60)	-
Tyrosine	0.46 (95.06)	0.55 (95.50)	0.64 (94.03)	0.69 (94.66)	0.83 (94.96)	-

¹Values expressed on wet weight basis. Number in parentheses represent the apparent digestibility coefficients of amino acids. ²Values expressed according to Furuya et al. (2010). ³Values expressed according to NRC (2011).

Table 3. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days¹.

	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	2.02 $\pm$ 0.16	1.96 $\pm$ 0.25	1.94 $\pm$ 0.21	1.84 $\pm$ 0.13	2.03 $\pm$ 0.19
HTC (%)	28.84 $\pm$ 2.27	28.16 $\pm$ 2.10	29.34 $\pm$ 4.15	27.25 $\pm$ 2.30	28.84 $\pm$ 3.19
Hb (g dL ⁻¹)	6.26 $\pm$ 1.21	5.99 $\pm$ 1.11	6.63 $\pm$ 1.57	5.96 $\pm$ 1.13	6.74 $\pm$ 1.13
MCV (fL)	143.04 $\pm$ 9.49	145.27 $\pm$ 16.82	150.79 $\pm$ 10.47	148.49 $\pm$ 14.99	147.44 $\pm$ 11.58
MCHC (%)	21.67 $\pm$ 3.72	21.20 $\pm$ 3.21	22.40 $\pm$ 3.06	21.76 $\pm$ 3.07	22.64 $\pm$ 2.36
TPP (mg dL ⁻¹)	3.94 $\pm$ 0.47a	3.26 $\pm$ 0.43b	3.48 $\pm$ 0.52ab	3.29 $\pm$ 0.24b	3.63 $\pm$ 0.64ab
ALB (mg dL ⁻¹)	1.34 $\pm$ 0.35	1.09 $\pm$ 0.15	1.33 $\pm$ 0.29	1.37 $\pm$ 0.28	1.31 $\pm$ 0.25
GLOB (mg dL ⁻¹)	2.63 $\pm$ 0.40	2.16 $\pm$ 0.37	2.23 $\pm$ 0.48	1.95 $\pm$ 0.24	2.32 $\pm$ 0.75
A:G (mg dL ⁻¹)	0.47 (0.40-0.64)	0.52 (0.49-0.54)	0.61 (0.46-0.72)	0.66 (0.62-0.79)	0.47 (0.41-0.98)
GLU (mg dL ⁻¹)	47.19 $\pm$ 8.79	48.62 $\pm$ 8.56	63.97 $\pm$ 25.61	56.16 $\pm$ 14.83	47.18 $\pm$ 4.90
TGL (mg dL ⁻¹)	568.33 $\pm$ 184.29a	319.32 $\pm$ 80.81ab	317.13 $\pm$ 199.17b	197.91 $\pm$ 56.75b	239.34 $\pm$ 59.62b
COL (mg dL ⁻¹)	169.53 $\pm$ 32.09a	119.96 $\pm$ 28.42ab	132.80 $\pm$ 44.24ab	124.98 $\pm$ 27.95ab	114.83 $\pm$ 16.24b

¹Values are means $\pm$ standard deviation for data normally distributed and medians (minimum and maximum values) for data not normally distributed. Means and medians are values of eight replicates. Means in the same row with different letters differ by (P<0.05) Tukey test. Medians in the same row with different letters differ by (P<0.05) Mann-Whitney test. RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP = total plasma protein concentration; A:G = albumin:globulin ratio; GLU = glucose; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 4. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte number leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days¹.

	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Lymphocyte (%)	92.38 ± 3.52	93.14 ± 3.56	88.06 ± 5.68	87.19 ± 7.98	89.00 ± 6.36
Neutrophil (%)	2.50 ± 1.46	3.07 ± 1.54	6.38 ± 3.86	6.56 ± 5.49	4.38 ± 2.89
Monocyte (%)	5.13 ± 2.80	3.79 ± 2.41	5.56 ± 2.11	6.25 ± 3.85	6.63 ± 4.92
Leukocyte (cells μL^{-1})	61019 ± 16569	66689 ± 18825	62892 ± 13811	59134 ± 16693	58594 ± 17773
Lymphocyte (cells μL^{-1})	56586 ± 16519	61880 ± 16331	55657 ± 14385	52462 ± 18457	52898 ± 18539
Neutrophil (cells μL^{-1})	1237 (872-1693)b	1857 (1420-2547)ab	3708 (2269-5556)a	2816 (1817-4098)a	2002 (1630-2915)ab
Monocyte (cells μL^{-1})	3003 ± 1962	2589 ± 2251	3472 ± 1380	3282 ± 1672	3422 ± 2396

¹Values are means ± standard deviation for data normally distributed and medians (minimum and maximum values) for data not normally distributed. Means and medians are values of eight replicates. Means in the same row with different letters differ by (P<0.05) Tukey test. Medians in the same row with different letters differ by (P<0.05) Mann-Whitney test.

Table 5. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to cold-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	No stress	2.00 (1.93-2.11)	1.97 (1.73-2.18)	1.91 (1.83-2.03)	1.87 (1.74-1.95)	2.09 (1.85-2.12)
	Stressed	2.00 (1.87-2.36)	2.10 (2.01-2.16)	2.01 (1.89-2.28)	1.91 (1.76-1.97)	2.01 (1.82-2.05)
HTC (%)	No stress	28.75 (26.88-30.50)	28.88 (27.50-29.63)	28.50 (26.00-32.00)	27.88 (26.00-29.00)	30.63 (27.88-32.50)
	Stressed	29.13 (27.13-33.75)	30.63 (28.88-31.38)	27.88 (25.50-33.50)	26.63 (24.50-29.63)	28.25 (26.75-30.13)
Hb (g dL ⁻¹)	No stress	6.31 (5.25-7.27)	5.76 (4.82-7.16)B	6.77 (5.33-7.66)	5.93 (5.15-6.77)	6.54 (5.72-7.55)
	Stressed	7.16 (6.62-8.12)	7.59 (7.27-8.03)A	7.33 (6.76-8.29)	7.02 (6.66-7.35)	6.89 (6.30-7.50)
MCV (fL)	No stress	143.24 (135.12-152.15)	143.40 (132.09-161.22)	156.40 (142.31-158.74)	145.37 (136.48-160.05)	153.24 (135.50-155.51)
	Stressed	144.70 (132.25-149.41)	141.00 (133.51-147.80)	140.10 (135.04-146.77)	147.00 (138.43-152.29)	149.20 (141.98-153.84)
MCHC (%)	No stress	21.66 (18.17-25.11)	19.76 (18.68-24.28)B	23.75 (19.52-24.73)	20.43 (19.18-25.06)B	23.92 (19.71-25.07)
	Stressed	24.63 (23.52-25.01)	25.21 (24.84-26.21)A	24.87 (24.15-28.07)	26.13 (24.61-26.96)A	24.49 (22.81-25.59)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$). RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 6. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to cold-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
TPP (mg dL ⁻¹)	No stress	3.90 (3.60-4.28)	3.13 (2.95-3.50)	3.38 (3.15-3.63)	3.25 (3.13-3.43)A	3.68 (3.05-3.85)
	Stressed	3.70 (2.93-4.03)	3.23 (2.80-3.55)	3.13 (3.05-3.70)	2.93 (2.50-3.08)B	3.05 (2.75-3.28)
ALB (mg dL ⁻¹)	No stress	1.37 (1.14-1.63)A	1.05 (1.02-1.14)	1.34 (1.20-1.41)A	1.30 (1.27-1.51)A	1.36 (1.13-1.49)A
	Stressed	0.84 (0.74-1.02)B	0.93 (0.77-1.02)	0.88 (0.83-1.14)B	0.97 (0.78-1.11)B	0.99 (0.80-1.20)B
GLOB (mg dL ⁻¹)	No stress	2.75 (2.42-2.92)	2.03 (1.95-2.48)	2.21 (1.84-2.39)	1.98 (1.79-2.14)	2.55 (1.53-2.77)
	Stressed	2.64 (2.05-3.19)	2.20 (1.76-2.56)	2.29 (1.80-2.66)	1.80 (1.61-2.06)	2.01 (1.72-2.30)
A:G (mg dL ⁻¹)	No stress	0.47 (0.40-0.64)A	0.52 (0.49-0.54)	0.61 (0.46-0.72)	0.66 (0.62-0.79)	0.47 (0.41-0.98)
	Stressed	0.30 (0.25-0.39)B	0.38 (0.32-0.51)	0.38 (0.33-0.64)	0.51 (0.38-0.67)	0.48 (0.39-0.64)
GLU (mg dL ⁻¹)	No stress	48.03 (43.15-52.91)B	46.26 (46.11-48.47)	56.16 (52.46-62.22)	50.54 (48.33-54.98)	47.59 (45.22-50.99)B
	Stressed	110.10 (65.02-165.96)A	81.72 (53.94-107.14)	77.29 (70.05-87.04)	65.47 (56.01-70.79)	80.25 (57.04-116.60)A
TGL (mg dL ⁻¹)	No stress	557.77 (426.69-719.52)	304.78 (251.39-376.49)	249.00 (182.87-433.07)	199.20 (155.38-219.52)A	252.19 (183.67-283.67)
	Stressed	417.19 (253.91-525.00)	190.63 (112.89-294.92)	130.86 (77.34-310.16)	91.80 (75.00-141.41)B	137.50 (75.00-233.20)
COL (mg dL ⁻¹)	No stress	165.45 (156.12-180.26)	114.91 (111.37-122.96)	117.81 (112.02-128.11)	113.95 (107.93-137.12)	115.56 (103.97-126.82)
	Stressed	162.18 (142.45-184.38)	135.97 (116.55-166.50)	141.52 (117.78-172.97)	113.46 (105.45-133.20)	128.26 (119.94-146.15)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; P<0.05). TPP = total plasma protein concentration; ALB = albumin; GLOB = globulin; A:G = albumin:globulin ratio; GLU = glucose; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 7. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after cold-induced stress¹.

	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	2.09 $\pm$ 0.26	2.10 $\pm$ 0.19	2.04 $\pm$ 0.40	1.87 $\pm$ 0.22	1.93 $\pm$ 0.16
HTC (%)	29.66 $\pm$ 4.39	29.63 $\pm$ 2.74	29.38 $\pm$ 4.82	27.28 $\pm$ 3.06	28.53 $\pm$ 2.13
Hb (g dL ⁻¹)	7.21 $\pm$ 0.98	7.60 $\pm$ 0.82	7.52 $\pm$ 1.06	7.06 $\pm$ 0.82	6.91 $\pm$ 0.89
MCV (fL)	141.74 $\pm$ 12.45	141.14 $\pm$ 9.54	146.10 $\pm$ 22.04	146.24 $\pm$ 10.43	148.15 $\pm$ 10.39
MCHC (%)	24.36 $\pm$ 1.00	25.63 $\pm$ 1.14	25.74 $\pm$ 2.05	25.90 $\pm$ 1.50	24.14 $\pm$ 1.70
TPP (mg dL ⁻¹)	3.69 $\pm$ 0.94	3.17 $\pm$ 0.49	3.27 $\pm$ 0.47	2.81 $\pm$ 0.37	3.03 $\pm$ 0.49
ALB (mg dL ⁻¹)	0.87 $\pm$ 0.18	0.96 $\pm$ 0.30	1.02 $\pm$ 0.31	0.96 $\pm$ 0.26	1.01 $\pm$ 0.23
GLOB (mg dL ⁻¹)	2.59 $\pm$ 0.55	2.21 $\pm$ 0.48	2.25 $\pm$ 0.60	1.85 $\pm$ 0.27	2.02 $\pm$ 0.40
A:G (mg dL ⁻¹)	0.30 (0.25-0.39)b	0.38 (0.32-0.51)ab	0.38 (0.33-0.64)ab	0.51 (0.38-0.67)a	0.48 (0.39-0.64)a
GLU (mg dL ⁻¹)	125.73 $\pm$ 76.17	81.24 $\pm$ 32.68	77.22 $\pm$ 15.12	65.73 $\pm$ 16.03	86.34 $\pm$ 34.85
TGL (mg dL ⁻¹)	433.50 $\pm$ 253.61a	225.00 $\pm$ 144.33ab	208.69 $\pm$ 178.72ab	125.49 $\pm$ 86.48b	153.81 $\pm$ 91.45b
COL (mg dL ⁻¹)	163.00 $\pm$ 28.65a	139.67 $\pm$ 31.86ab	146.99 $\pm$ 37.15ab	120.78 $\pm$ 18.70b	134.58 $\pm$ 28.45b

¹Values are means $\pm$ standard deviation for data normally distributed and medians (minimum and maximum values) for data not normally distributed. Means and medians are values of eight replicates. Means in the same row with different letters differ by (P<0.05) Tukey test. Medians in the same row with different letters differ by (P<0.05) Mann-Whitney test. RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP = total plasma protein concentration; A:G = albumin:globulin ratio; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 8. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to cold-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Lymphocyte (%)	No stress	92.25 (89.50-95.25)A	94.50 (91.50-95.50)A	87.75 (83.75-92.50)A	88.25 (80.75-94.50)A	89.75 (86.25-93.25)A
	Stressed	57.00 (45.00-69.75)B	47.75 (42.75-61.75)B	46.50 (37.50-52.75)B	43.25 (35.00-56.00)B	36.25 (31.50-51.25)B
Neutrophil (%)	No stress	1.75 (1.50-3.75)B	2.50 (2.25-4.00)B	6.75 (3.50-10.00)B	4.50 (3.00-9.00)B	3.75 (2.50-6.50)B
	Stressed	30.50 (21.25-47.00)A	32.00 (25.50-43.00)A	35.75 (28.25-45.75)A	27.50 (25.00-50.25)A	46.50 (38.25-53.75)A
Monocyte (%)	No stress	5.00 (3.25-7.50)	4.00 (1.50-5.25)B	4.75 (4.00-7.00)B	6.75 (3.00-9.00)B	5.00 (2.75-11.00)B
	Stressed	5.75 (4.25-13.00)	14.00 (9.25-20.00)A	16.00 (10.25-20.25)A	10.50 (9.75-17.50)A	14.00 (13.50-16.00)A
Leukocyte (cells μL^{-1})	No stress	64778 (43855-72103)A	68229 (54778-75918)A	60643 (51126-75537)A	56874 (47568-68762)A	59340 (42148-71991)A
	Stressed	33758 (29312-36523)B	29806 (25392-33711)B	34013 (32111-35103)B	30075 (28074-37454)B	30270 (28261-35431)B
Lymphocyte (cells μL^{-1})	No stress	58680 (40829-66812)A	63794 (51011-72494)A	51760 (45202-66962)A	51124 (38804-63594)A	53258 (37380-66623)A
	Stressed	18736 (13653-21919)B	15372 (11120-19927)B	14911 (9651-23985)B	15322 (11085-19308)B	11412 (8727-14890)B
Neutrophil (cells μL^{-1})	No stress	1237 (872-1693)B	1857 (1420-2547)B	3708 (2269-5556)B	2816 (1817-4098)B	2002 (1630-2915)B
	Stressed	12395 (8535-15721)A	10513 (8025-11668)A	12657 (9247-17279)A	9675 (7961-13394)A	13028 (11126-14826)A
Monocyte (cells μL^{-1})	No stress	2575 (1847-4025)	1795 (1139-2950)	3259 (2295-4748)	3346 (2335-4513)	2854 (1851-4521)
	Stressed	2576 (1429-4745)	4411 (2914-5888)	4400 (3310-6607)	3794 (2450-5938)	4334 (3888-5634)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$).

Table 9. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to heat-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	No stress	2.00 (1.93-2.11)	1.97 (1.73-2.18)	1.91 (1.83-2.03)	1.87 (1.74-1.95)	2.09 (1.85-2.12)
	Stressed	2.08 (1.94-2.24)	1.97 (1.66-2.34)	2.00 (1.94-2.14)	2.00 (1.74-2.10)	2.06 (1.94-2.16)
HTC (%)	No stress	28.75 (26.88-30.50)B	28.88 (27.50-29.63)	28.50 (26.00-32.00)	27.88 (26.00-29.00)	30.63 (27.88-32.50)
	Stressed	34.13 (31.63-35.63)A	30.50 (28.50-36.75)	32.38 (27.13-33.88)	30.88 (27.50-33.50)	29.50 (27.50-31.00)
Hb (g dL ⁻¹)	No stress	6.31 (5.25-7.27)B	5.76 (4.82-7.16)B	6.77 (5.33-7.66)B	5.93 (5.15-6.77)B	6.54 (5.72-7.55)
	Stressed	8.83 (7.59-9.30)A	8.63 (8.11-9.79)A	8.46 (7.59-9.27)A	8.54 (8.34-9.18)A	8.17 (6.81-9.03)
MCV (fL)	No stress	143.24 (135.12-152.15)	143.40 (132.09-161.22)	156.40 (142.31-158.74)	145.37 (136.48-160.05)	153.24 (135.50-155.51)
	Stressed	165.79 (133.91-174.99)	161.00 (127.14-172.65)	156.78 (141.91-163.13)	159.34 (145.56-169.51)	148.72 (136.56-159.11)
MCHC (%)	No stress	21.66 (18.17-25.11)B	19.76 (18.68-24.28)B	23.75 (19.52-24.73)B	20.43 (19.18-25.06)B	23.92 (19.71-25.07)B
	Stressed	25.89 (24.19-27.40)A	29.29 (25.95-29.98)A	27.24 (26.77-28.65)A	28.22 (26.90-29.57)A	28.18 (26.20-28.40)A

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$). RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 10. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to heat-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
TPP (mg dL ⁻¹)	No stress	3.90 (3.60-4.28)	3.13 (2.95-3.50)	3.38 (3.15-3.63)	3.25 (3.13-3.43)	3.68 (3.05-3.85)
	Stressed	4.13 (3.75-4.38)	3.53 (3.50-3.70)	3.33 (2.88-3.75)	3.18 (2.90-3.45)	3.20 (3.08-3.43)
ALB (mg dL ⁻¹)	No stress	1.37 (1.14-1.63)	1.05 (1.02-1.14)	1.34 (1.20-1.41)	1.30 (1.27-1.51)	1.36 (1.13-1.49)
	Stressed	1.48 (1.06-1.62)	1.05 (0.93-1.13)	1.06 (0.91-1.42)	0.96 (0.91-1.18)	1.39 (1.14-1.56)
GLOB (mg dL ⁻¹)	No stress	2.75 (2.42-2.92)	2.03 (1.95-2.48)	2.21 (1.84-2.39)	1.98 (1.79-2.14)	2.55 (1.53-2.77)
	Stressed	2.42 (2.17-3.02)	2.37 (2.20-2.67)	2.35 (1.61-2.53)	2.24 (1.92-2.46)	2.01 (1.57-2.24)
A:G (mg dL ⁻¹)	No stress	0.47 (0.40-0.64)	0.52 (0.49-0.54)	0.61 (0.46-0.72)	0.66 (0.62-0.79)	0.47 (0.41-0.98)
	Stressed	0.54 (0.34-0.76)	0.48 (0.33-0.53)	0.46 (0.36-0.79)	0.45 (0.41-0.51)	0.72 (0.56-0.93)
GLU (mg dL ⁻¹)	No stress	48.03 (43.15-52.91)B	46.26 (46.11-48.47)B	56.16 (52.46-62.22)	50.54 (48.33-54.98)	47.59 (45.22-50.99)
	Stressed	58.18 (54.09-64.24)A	53.48 (51.06-56.67)A	66.67 (49.39-91.67)	60.15 (50.76-68.33)	58.33 (48.33-86.36)
TGL (mg dL ⁻¹)	No stress	557.77 (426.69-719.52)A	304.78 (251.39-376.49)A	249.00 (182.87-433.07)A	199.20 (155.38-219.52)A	252.19 (183.67-283.67)A
	Stressed	59.51 (56.25-105.98)B	85.19 (74.59-111.28)B	61.14 (53.40-76.63)B	70.11 (55.43-81.52)B	61.14 (51.36-75.00)B
COL (mg dL ⁻¹)	No stress	165.45 (156.12-180.26)	114.91 (111.37-122.96)B	117.81 (112.02-128.11)	113.95 (107.93-137.12)	115.56 (103.97-126.82)
	Stressed	202.31 (193.57-210.75)	168.84 (147.14-178.49)A	148.94 (132.96-161.61)	143.22 (135.68-148.34)	131.16 (112.76-145.03)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$). TPP = total plasma protein concentration; ALB = albumin; GLOB = globulin; A:G = albumin:globulin ratio; GLU = glucose; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 11. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after heat-induced stress¹.

	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	2.09 $\pm$ 0.22	1.98 $\pm$ 0.39	2.03 $\pm$ 0.23	1.98 $\pm$ 0.28	2.00 $\pm$ 0.23
HTC (%)	32.75 $\pm$ 4.68	30.50 $\pm$ 7.05	30.81 $\pm$ 4.17	30.69 $\pm$ 3.59	29.61 $\pm$ 3.95
Hb (g dL ⁻¹)	8.44 $\pm$ 1.21	8.75 $\pm$ 1.44	8.41 $\pm$ 0.99	8.61 $\pm$ 0.77	8.13 $\pm$ 1.46
MCV (fL)	157.49 $\pm$ 22.64	154.61 $\pm$ 23.54	151.94 $\pm$ 15.14	156.68 $\pm$ 17.41	148.46 $\pm$ 17.59
MCHC (%)	25.92 $\pm$ 2.75	29.30 $\pm$ 3.64	27.40 $\pm$ 1.57	28.22 $\pm$ 2.29	27.42 $\pm$ 2.66
TPP (mg dL ⁻¹)	4.01 $\pm$ 0.56a	3.45 $\pm$ 0.38ab	3.32 $\pm$ 0.53ab	3.21 $\pm$ 0.45b	3.26 $\pm$ 0.45b
ALB (mg dL ⁻¹)	1.40 $\pm$ 0.44	1.08 $\pm$ 0.24	1.17 $\pm$ 0.33	1.06 $\pm$ 0.22	1.35 $\pm$ 0.32
GLOB (mg dL ⁻¹)	2.61 $\pm$ 0.58	2.37 $\pm$ 0.38	2.15 $\pm$ 0.53	2.14 $\pm$ 0.49	1.91 $\pm$ 0.45
A:G (mg dL ⁻¹)	0.54 (0.34-0.76)	0.48 (0.33-0.53)	0.46 (0.36-0.79)	0.45 (0.41-0.51)	0.72 (0.56-0.93)
GLU (mg dL ⁻¹)	59.77 $\pm$ 8.60	59.89 $\pm$ 19.85	70.76 $\pm$ 29.28	57.05 $\pm$ 13.88	66.78 $\pm$ 26.27
TGL (mg dL ⁻¹)	78.36 $\pm$ 33.22	94.46 $\pm$ 31.58	67.08 $\pm$ 18.98	68.36 $\pm$ 18.92	65.32 $\pm$ 23.59
COL (mg dL ⁻¹)	207.94 $\pm$ 25.41a	163.94 $\pm$ 31.44b	149.25 $\pm$ 22.06b	146.01 $\pm$ 21.41b	127.61 $\pm$ 23.87b

¹Values are means $\pm$ standard deviation for data normally distributed and medians (minimum and maximum values) for data not normally distributed. Means and medians are values of eight replicates. Means in the same row with different letters differ by (P<0.05) Tukey test. Medians in the same row with different letters differ by (P<0.05) Mann-Whitney test. RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP = total plasma protein concentration; A:G = albumin:globulin ratio; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 12. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to heat-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Lymphocyte (%)	No stress	92.25 (89.50-95.25)A	94.50 (91.50-95.50)A	87.75 (83.75-92.50)A	88.25 (80.75-94.50)A	89.75 (86.25-93.25)A
	Stressed	79.25 (76.50-82.75)B	79.50 (70.75-87.00)B	77.00 (68.00-81.75)B	75.75 (72.00-78.75)B	76.50 (74.50-78.75)B
Neutrophil (%)	No stress	1.75 (1.50-3.75)B	2.50 (2.25-4.00)B	6.75 (3.50-10.00)	4.50 (3.00-9.00)	3.75 (2.50-6.50)B
	Stressed	7.50 (5.25-12.25)A	9.50 (7.25-12.25)A	10.00 (7.75-12.50)	9.00 (5.25-11.25)	9.50 (8.25-12.25)A
Monocyte (%)	No stress	5.00 (3.25-7.50)B	4.00 (1.50-5.25)	4.75 (4.00-7.00)B	6.75 (3.00-9.00)B	5.00 (2.75-11.00)B
	Stressed	13.00 (6.75-17.50)A	10.50 (6.00-14.00)	12.50 (10.50-15.50)A	17.00 (9.00-21.00)A	14.00 (12.00-15.75)A
Leukocyte (cells μL^{-1})	No stress	64778 (43855-72103)A	68229 (54778-75918)A	60643 (51126-75537)A	56874 (47568-68762)A	59340 (42148-71991)A
	Stressed	37719 (31560-51361)B	39656 (38265-46289)B	43725 (35859-51973)B	37224 (31047-45066)B	34249 (31749-43030)B
Lymphocyte (cells μL^{-1})	No stress	58680 (40829-66812)A	63794 (51011-72494)A	51760 (45202-66962)	51124 (38804-63594)A	53258 (37380-66623)
	Stressed	28844 (24002-42503)B	31420 (26916-36429)B	38090 (22815-46765)	26010 (23501-34877)B	27868 (25002-38654)
Neutrophil (cells μL^{-1})	No stress	1237 (872-1693)B	1857 (1420-2547)B	3708 (2269-5556)	2816 (1817-4098)	2002 (1630-2915)B
	Stressed	3474 (2234-4137)A	3644 (2960-5152)A	4269 (3879-4633)	3091 (2375-3600)	4400 (3030-5707)A
Monocyte (cells μL^{-1})	No stress	2575 (1847-4025)	1795 (1139-2950)	3259 (2295-4748)	3346 (2335-4513)	2854 (1851-4521)B
	Stressed	6317 (2679-6887)	4459 (2795-6215)	4460 (4205-7804)	5669 (2592-9104)	5273 (4428-7114)A

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$).

Table 13. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to transport-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	No stress	2.00 (1.93-2.11)	1.97 (1.73-2.18)	1.91 (1.83-2.03)	1.87 (1.74-1.95)B	2.09 (1.85-2.12)
	Stressed	1.94 (1.85-2.09)	2.06 (2.03-2.26)	2.08 (1.99-2.11)	2.11 (2.03-2.24)A	1.95 (1.84-2.21)
HTC (%)	No stress	28.75 (26.88-30.50)	28.88 (27.50-29.63)	28.50 (26.00-32.00)	27.88 (26.00-29.00)	30.63 (27.88-32.50)
	Stressed	28.50 (27.13-30.88)	30.50 (28.38-31.88)	32.25 (29.50-32.75)	30.38 (27.38-32.75)	29.75 (27.38-32.25)
Hb (g dL ⁻¹)	No stress	6.31 (5.25-7.27)B	5.76 (4.82-7.16)B	6.77 (5.33-7.66)	5.93 (5.15-6.77)B	6.54 (5.72-7.55)
	Stressed	7.57 (7.21-7.89)A	8.07 (7.67-8.76)A	8.03 (7.27-8.92)	8.21 (7.07-8.32)A	8.27 (7.35-8.50)
MCV (fL)	No stress	143.24 (135.12-152.15)	143.40 (132.09-161.22)	156.40 (142.31-158.74)	145.37 (136.48-160.05)	153.24 (135.50-155.51)
	Stressed	143.62 (139.96-149.11)	144.36 (142.14-147.52)	143.03 (141.43-152.65)	145.94 (140.65-155.85)	139.40 (132.50-148.26)
MCHC (%)	No stress	21.66 (18.17-25.11)B	19.76 (18.68-24.28)B	23.75 (19.52-24.73)B	20.43 (19.18-25.06)B	23.92 (19.71-25.07)B
	Stressed	25.73 (25.30-26.80)A	27.25 (25.78-27.65)A	26.05 (25.43-26.74)A	25.58 (23.66-26.52)A	26.29 (25.90-26.77)A

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$). RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 14. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to transport-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
TPP (mg dL ⁻¹)	No stress	3.90 (3.60-4.28)	3.13 (2.95-3.50)	3.38 (3.15-3.63)	3.25 (3.13-3.43)	3.68 (3.05-3.85)
	Stressed	3.58 (3.30-4.08)	3.55 (3.50-3.95)	3.70 (3.15-3.90)	3.48 (3.28-3.50)	3.60 (3.05-4.48)
ALB (mg dL ⁻¹)	No stress	1.37 (1.14-1.63)	1.05 (1.02-1.14)	1.34 (1.20-1.41)	1.30 (1.27-1.51)	1.36 (1.13-1.49)
	Stressed	0.95 (0.83-1.05)	1.09 (1.01-1.17)	1.17 (0.93-1.24)	1.15 (0.85-1.45)	1.19 (1.03-1.45)
GLOB (mg dL ⁻¹)	No stress	2.75 (2.42-2.92)	2.03 (1.95-2.48)	2.21 (1.84-2.39)	1.98 (1.79-2.14)	2.55 (1.53-2.77)
	Stressed	2.69 (2.42-2.87)	2.57 (2.44-2.78)	2.48 (2.02-2.86)	2.23 (1.82-2.72)	2.44 (2.04-3.02)
A:G (mg dL ⁻¹)	No stress	0.47 (0.40-0.64)	0.52 (0.49-0.54)	0.61 (0.46-0.72)	0.66 (0.62-0.79)	0.47 (0.41-0.98)
	Stressed	0.38 (0.29-0.42)	0.42 (0.39-0.46)	0.43 (0.37-0.60)	0.52 (0.29-0.83)	0.50 (0.47-0.52)
GLU (mg dL ⁻¹)	No stress	48.03 (43.15-52.91)B	46.26 (46.11-48.47)B	56.16 (52.46-62.22)B	50.54 (48.33-54.98)B	47.59 (45.22-50.99)B
	Stressed	198.47 (159.79-273.63)A	190.11 (147.79-203.37)A	234.32 (178.58-256.11)A	177.95 (134.84-223.42)A	202.89 (185.05-238.74)A
TGL (mg dL ⁻¹)	No stress	557.77 (426.69-719.52)	304.78 (251.39-376.49)	249.00 (182.87-433.07)	199.20 (155.38-219.52)	252.19 (183.67-283.67)A
	Stressed	414.02 (295.96-571.50)	304.85 (261.19-578.98)	193.26 (160.11-279.38)	145.55 (102.70-203.37)	131.81 (106.74-161.73)B
COL (mg dL ⁻¹)	No stress	165.45 (156.12-180.26)	114.91 (111.37-122.96)	117.81 (112.02-128.11)	113.95 (107.93-137.12)	115.56 (103.97-126.82)
	Stressed	169.55 (138.01-189.92)	144.58 (123.22-158.38)	129.46 (106.13-130.45)	102.85 (97.26-108.76)	122.89 (110.08-137.68)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; P<0.05). TPP = total plasma protein concentration; ALB = albumin; GLOB = globulin; A:G = albumin:globulin ratio; GLU = glucose; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 15. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after transport-induced stress¹.

	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	1.98 $\pm$ 0.17	2.13 $\pm$ 0.17	2.05 $\pm$ 0.10	2.13 $\pm$ 0.17	2.09 $\pm$ 0.39
HTC (%)	28.81 $\pm$ 2.07	30.32 $\pm$ 2.49	31.71 $\pm$ 5.07	29.69 $\pm$ 4.43	29.84 $\pm$ 3.76
Hb (g dL ⁻¹)	7.55 $\pm$ 0.46	8.11 $\pm$ 0.77	8.20 $\pm$ 1.48	7.52 $\pm$ 1.41	7.82 $\pm$ 1.35
MCV (fL)	145.70 $\pm$ 8.83	142.84 $\pm$ 9.47	146.52 $\pm$ 14.16	149.12 $\pm$ 14.15	140.58 $\pm$ 15.79
MCHC (%)	26.25 $\pm$ 1.40	26.73 $\pm$ 1.12	25.81 $\pm$ 1.61	25.23 $\pm$ 2.38	26.10 $\pm$ 2.68
TPP (mg dL ⁻¹)	3.63 $\pm$ 0.43	3.85 $\pm$ 0.70	3.58 $\pm$ 0.67	3.48 $\pm$ 0.30	3.79 $\pm$ 0.83
ALB (mg dL ⁻¹)	0.96 $\pm$ 0.24	1.08 $\pm$ 0.16	1.11 $\pm$ 0.18	1.16 $\pm$ 0.38	1.27 $\pm$ 0.27
GLOB (mg dL ⁻¹)	2.67 $\pm$ 0.39	2.77 $\pm$ 0.82	2.47 $\pm$ 0.78	2.31 $\pm$ 0.58	2.53 $\pm$ 0.58
A:G (mg dL ⁻¹)	0.38 (0.29-0.42)	0.42 (0.39-0.46)	0.43 (0.37-0.60)	0.52 (0.29-0.83)	0.50 (0.47-0.52)
GLU (mg dL ⁻¹)	212.01 $\pm$ 58.42	172.33 $\pm$ 45.16	220.20 $\pm$ 51.94	184.34 $\pm$ 66.27	214.66 $\pm$ 46.36
TGL (mg dL ⁻¹)	440.80 $\pm$ 166.49a	460.69 $\pm$ 335.01a	218.79 $\pm$ 82.03ab	162.94 $\pm$ 87.58b	145.15 $\pm$ 63.21b
COL (mg dL ⁻¹)	164.46 $\pm$ 30.16a	140.85 $\pm$ 30.74a	118.95 $\pm$ 21.38ab	102.68 $\pm$ 29.16b	123.30 $\pm$ 23.69ab

¹Values are means $\pm$ standard deviation for data normally distributed and medians (minimum and maximum values) for data not normally distributed. Means and medians are values of eight replicates. Means in the same row with different letters differ by (P<0.05) Tukey test. Medians in the same row with different letters differ by (P<0.05) Mann-Whitney test. RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP = total plasma protein concentration; A:G = albumin:globulin ratio; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 16. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to transport-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Lymphocyte (%)	No stress	92.25 (89.50-95.25)A	94.50 (91.50-95.50)A	87.75 (83.75-92.50)A	88.25 (80.75-94.50)A	89.75 (86.25-93.25)A
	Stressed	30.50 (25.50-37.75)B	31.00 (20.00-36.25)B	28.50 (16.25-31.75)B	22.50 (20.00-24.75)B	13.25 (10.75-18.75)B
Neutrophil (%)	No stress	1.75 (1.50-3.75)B	2.50 (2.25-4.00)B	6.75 (3.50-10.00)B	4.50 (3.00-9.00)B	3.75 (2.50-6.50)B
	Stressed	57.25 (46.75-59.50)A	53.00 (50.00-60.25)A	59.00 (53.75-65.50)A	60.25 (56.00-63.75)A	67.25 (63.25-78.25)A
Monocyte (%)	No stress	5.00 (3.25-7.50)B	4.00 (1.50-5.25)B	4.75 (4.00-7.00)B	6.75 (3.00-9.00)B	5.00 (2.75-11.00)B
	Stressed	16.25 (11.50-20.50)A	16.00 (13.00-19.00)A	16.00 (12.00-21.00)A	17.50 (14.00-17.75)A	17.00 (12.25-17.50)A
Leukocyte (cells μL^{-1})	No stress	64778 (43855-72103)A	68229 (54778-75918)A	60643 (51126-75537)A	56874 (47568-68762)A	59340 (42148-71991)A
	Stressed	32709 (27911-38334)B	333554 (31474-38883)B	35713 (31971-36167)B	38825 (30405-48832)B	30491 (23904-37676)B
Lymphocyte (cells μL^{-1})	No stress	58680 (40829-66812)A	63794 (51011-72494)A	51760 (45202-66962)A	51124 (38804-63594)A	53258 (37380-66623)A
	Stressed	10428 (7436-13482)B	10279 (7073-12526)B	9462 (5838-10965)B	9318 (7625-11141)B	3489 (3068-6690)B
Neutrophil (cells μL^{-1})	No stress	1237 (872-1693)B	1857 (1420-2547)B	3708 (2269-5556)B	2816 (1817-4098)B	2002 (1630-2915)B
	Stressed	17718 (14622-19711)A	20596 (14548-23326)A	18838 (17938-21690)A	23814 (18583-28810)A	21997 (12723-27237)A
Monocyte (cells μL^{-1})	No stress	2575 (1847-4025)B	1795 (1139-2950)B	3259 (2295-4748)	3346 (2335-4513)B	2854 (1851-4521)
	Stressed	4919 (3905-6845)A	5369 (4262-6837)A	5312 (4342-7015)	6802 (5331-8207)A	4448 (3763-7117)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$).

Table 17. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed experimental diets after transport-induced stress¹.

	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Lymphocyte (%)	29.75 ± 9.19a	29.36 ± 12.28a	24.36 ± 9.20ab	22.19 ± 6.23ab	14.81 ± 5.50b
Neutrophil (%)	53.44 ± 8.29	54.36 ± 14.44	58.71 ± 10.56	58.06 ± 14.35	67.06 ± 13.59
Monocyte (%)	16.81 ± 6.52	16.29 ± 5.10	16.93 ± 6.94	16.79 ± 4.50	15.43 ± 4.89
Leukocyte (cells μL^{-1})	33533 ± 8005	34708 ± 8068	34674 ± 3897	39196 ± 12698	31426 ± 9662
Lymphocyte (cells μL^{-1})	10495 ± 5008a	9879 ± 3950ab	8502 ± 3479ab	8795 ± 3217ab	4598 ± 2117b
Neutrophil (cells μL^{-1})	17555 ± 3326	18960 ± 6640	20163 ± 3281	22746 ± 8390	21230 ± 8427
Monocyte (cells μL^{-1})	5484 ± 2112	5869 ± 2884	6009 ± 2995	6687 ± 2738	5598 ± 3069

¹Values are means ± standard deviation for data normally distributed and medians (minimum and maximum values) for data not normally distributed. Means and medians are values of eight replicates. Means in the same row with different letters differ by (P<0.05) Tukey test. Medians in the same row with different letters differ by (P<0.05) Mann-Whitney test.

Table 18. Hematological parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to grading-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	No stress	2.00 (1.93-2.11)	1.97 (1.73-2.18)	1.91 (1.83-2.03)	1.87 (1.74-1.95)B	2.09 (1.85-2.12)A
	Stressed	1.97 (1.68-2.08)	1.85 (1.81-2.09)	1.89 (1.79-1.99)	2.03 (1.94-2.07)A	1.73 (1.63-1.85)B
HTC (%)	No stress	28.75 (26.88-30.50)	28.88 (27.50-29.63)	28.50 (26.00-32.00)	27.88 (26.00-29.00)	30.63 (27.88-32.50)A
	Stressed	29.00 (27.88-30.75)	30.38 (28.38-31.88)	28.25 (27.75-31.13)	29.50 (28.50-31.50)	25.88 (23.63-26.88)B
Hb (g dL ⁻¹)	No stress	6.31 (5.25-7.27)	5.76 (4.82-7.16)B	6.77 (5.33-7.66)	5.93 (5.15-6.77)B	6.54 (5.72-7.55)
	Stressed	7.43 (7.01-7.84)	7.80 (7.45-8.25)A	7.39 (7.04-7.78)	8.23 (7.59-8.50)A	6.93 (6.35-7.59)
MCV (fL)	No stress	143.24 (135.12-152.15)	143.40 (132.09-161.22)	156.40 (142.31-158.74)	145.37 (136.48-160.05)	153.24 (135.50-155.51)
	Stressed	150.40 (139.78-160.34)	156.78 (150.96-166.88)	156.85 (148.20-160.64)	149.75 (141.01-158.67)	146.41 (144.35-153.65)
MCHC (%)	No stress	21.66 (18.17-25.11)B	19.76 (18.68-24.28)B	23.75 (19.52-24.73)	20.43 (19.18-25.06)B	23.92 (19.71-25.07)B
	Stressed	26.06 (25.14-26.69)A	26.30 (24.36-27.34)A	25.24 (23.82-26.65)	26.86 (26.07-27.15)A	26.64 (26.30-27.67)A

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$). RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 19. Blood biochemical parameters of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to grading-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
TPP (mg dL ⁻¹)	No stress	3.90 (3.60-4.28)A	3.13 (2.95-3.50)	3.38 (3.15-3.63)	3.25 (3.13-3.43)	3.68 (3.05-3.85)
	Stressed	3.48 (3.10-3.70)B	3.25 (3.08-4.00)	3.23 (3.18-3.40)	3.20 (3.15-3.58)	3.35 (3.00-3.68)
ALB (mg dL ⁻¹)	No stress	1.37 (1.14-1.63)A	1.05 (1.02-1.14)	1.34 (1.20-1.41)	1.30 (1.27-1.51)	1.36 (1.13-1.49)
	Stressed	0.87 (0.82-0.90)B	0.89 (0.76-1.38)	0.98 (0.89-1.23)	1.02 (0.95-1.23)	1.13 (0.96-1.28)
GLOB (mg dL ⁻¹)	No stress	2.75 (2.42-2.92)	2.03 (1.95-2.48)	2.21 (1.84-2.39)	1.98 (1.79-2.14)	2.55 (1.53-2.77)
	Stressed	2.66 (2.27-2.83)	2.36 (2.12-2.72)	2.35 (2.15-2.45)	2.29 (2.14-2.55)	2.17 (1.93-2.61)
A:G (mg dL ⁻¹)	No stress	0.47 (0.40-0.64)A	0.52 (0.49-0.54)	0.61 (0.46-0.72)	0.66 (0.62-0.79)A	0.47 (0.41-0.98)
	Stressed	0.33 (0.31-0.37)B	0.36 (0.33-0.52)	0.40 (0.36-0.48)	0.40 (0.40-0.52)B	0.52 (0.37-0.62)
GLU (mg dL ⁻¹)	No stress	48.03 (43.15-52.91)B	46.26 (46.11-48.47)B	56.16 (52.46-62.22)B	50.54 (48.33-54.98)B	47.59 (45.22-50.99)B
	Stressed	118.18 (101.23-127.77)A	106.82 (73.56-139.45)A	102.51 (89.87-147.28)A	115.94 (91.15-126.33)A	146.64 (127.45-168.39)A
TGL (mg dL ⁻¹)	No stress	557.77 (426.69-719.52)A	304.78 (251.39-376.49)A	249.00 (182.87-433.07)A	199.20 (155.38-219.52)A	252.19 (183.67-283.67)A
	Stressed	97.31 (87.62-111.84)B	75.10 (59.35-105.79)B	63.39 (53.39-153.43)B	69.04 (58.14-75.91)B	65.81 (56.93-79.14)B
COL (mg dL ⁻¹)	No stress	165.45 (156.12-180.26)	114.91 (111.37-122.96)	117.81 (112.02-128.11)	113.95 (107.93-137.12)	115.56 (103.97-126.82)
	Stressed	138.42 (126.24-169.01)	112.87 (101.29-145.25)	125.64 (108.71-146.73)	110.20 (99.80-129.80)	108.12 (99.80-140.50)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$). TPP = total plasma protein concentration; ALB = albumin; GLOB = globulin; A:G = albumin:globulin ratio; GLU = glucose; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 20. Hematological and biochemical parameters of Nile tilapia fed experimental diets after grading-induced stress¹.

	Digestible protein level (%)				
	22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
RBC (10 ⁶ μ L ⁻¹)	1.89 $\pm$ 0.25	1.94 $\pm$ 0.17	1.90 $\pm$ 0.12	2.00 $\pm$ 0.18	1.75 $\pm$ 0.15
HTC (%)	28.75 $\pm$ 3.77ab	30.19 $\pm$ 2.11a	29.31 $\pm$ 2.58ab	29.68 $\pm$ 2.18ab	25.78 $\pm$ 2.73b
Hb (g dL ⁻¹)	7.39 $\pm$ 0.65ab	7.81 $\pm$ 0.59ab	7.31 $\pm$ 0.83ab	8.08 $\pm$ 0.59a	6.99 $\pm$ 0.79b
MCV (fL)	153.01 $\pm$ 17.01	156.75 $\pm$ 16.52	154.54 $\pm$ 7.31	149.54 $\pm$ 12.26	147.56 $\pm$ 7.18
MCHC (%)	25.92 $\pm$ 2.20	25.90 $\pm$ 1.71	24.99 $\pm$ 2.50	26.87 $\pm$ 1.06	27.09 $\pm$ 1.12
TPP (mg dL ⁻¹)	3.43 $\pm$ 0.34	3.44 $\pm$ 0.53	3.45 $\pm$ 0.69	3.39 $\pm$ 0.36	3.36 $\pm$ 0.39
ALB (mg dL ⁻¹)	0.87 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.36	1.05 $\pm$ 0.21	1.08 $\pm$ 0.22	1.13 $\pm$ 0.19
GLOB (mg dL ⁻¹)	2.56 $\pm$ 0.32	2.39 $\pm$ 0.42	2.40 $\pm$ 0.61	2.30 $\pm$ 0.31	2.24 $\pm$ 0.44
A:G (mg dL ⁻¹)	0.33 (0.31-0.37)a	0.36 (0.33-0.52)ab	0.40 (0.36-0.48)b	0.40 (0.40-0.52)b	0.52 (0.37-0.62)b
GLU (mg dL ⁻¹)	116.54 $\pm$ 19.42	109.42 $\pm$ 48.82	112.22 $\pm$ 34.51	111.66 $\pm$ 29.27	153.92 $\pm$ 51.17
TGL (mg dL ⁻¹)	118.81 $\pm$ 69.20	103.77 $\pm$ 82.47	123.25 $\pm$ 126.38	66.72 $\pm$ 11.91	75.71 $\pm$ 34.83
COL (mg dL ⁻¹)	142.43 $\pm$ 28.35	123.86 $\pm$ 30.04	133.14 $\pm$ 35.97	114.06 $\pm$ 25.70	115.17 $\pm$ 32.74

¹Values are means $\pm$ standard deviation for data normally distributed and medians (minimum and maximum values) for data not normally distributed. Means and medians are values of eight replicates. Means in the same row with different letters differ by (P<0.05) Tukey test. Medians in the same row with different letters differ by (P<0.05) Mann-Whitney test. RBC = red blood cell; HTC = hematocrit; Hb = hemoglobin; MCV = mean corpuscular volume; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; TPP = total plasma protein concentration; A:G = albumin:globulin ratio; TGL = triglycerides; COL = cholesterol.

Table 21. Percentage lymphocyte, neutrophil and monocyte and leukocyte, lymphocyte, neutrophil and monocyte of Nile tilapia fed diets containing levels of digestible protein for 110 days and subjected to grading-induced stress¹.

	Group	Digestible protein level (%)				
		22.1	25.6	28.6	31.9	33.9
Lymphocyte (%)	No stress	92.25 (89.50-95.25)A	94.50 (91.50-95.50)A	87.75 (83.75-92.50)A	88.25 (80.75-94.50)A	89.75 (86.25-93.25)A
	Stressed	45.25 (36.25-66.50)B	42.75 (31.75-62.25)B	52.50 (43.50-60.25)B	61.00 (48.50-66.00)B	46.00 (36.00-52.75)B
Neutrophil (%)	No stress	1.75 (1.50-3.75)B	2.50 (2.25-4.00)B	6.75 (3.50-10.00)B	4.50 (3.00-9.00)B	3.75 (2.50-6.50)B
	Stressed	40.00 (26.25-49.75)A	45.00 (29.00-49.25)A	32.75 (29.00-38.25)A	25.50 (20.50-35.50)A	40.75 (35.50-53.75)A
Monocyte (%)	No stress	5.00 (3.25-7.50)B	4.00 (1.50-5.25)B	4.75 (4.00-7.00)B	6.75 (3.00-9.00)B	5.00 (2.75-11.00)B
	Stressed	11.50 (7.25-14.75)A	11.75 (8.50-18.75)A	15.00 (10.75-18.25)A	14.50 (11.00-17.00)A	13.75 (11.00-17.00)A
Leukocyte (cells μL^{-1})	No stress	64778 (43855-72103)	68229 (54778-75918)A	60643 (51126-75537)	56874 (47568-68762)A	59340 (42148-71991)
	Stressed	42417 (37171-55822)	38283 (26571-48449)B	49780 (38129-62690)	42906 (38737-45519)B	48564 (40321-60726)
Lymphocyte (cells μL^{-1})	No stress	58680 (40829-66812)A	63794 (51011-72494)A	51760 (45202-66962)A	51124 (38804-63594)A	53258 (37380-66623)A
	Stressed	22733 (14427-29093)B	17236 (8362-27934)B	23222 (17353-33221)B	26173 (20792-30389)B	18802 (16667-25899)B
Neutrophil (cells μL^{-1})	No stress	1237 (872-1693)B	1857 (1420-2547)B	3708 (2269-5556)B	2816 (1817-4098)B	2002 (1630-2915)B
	Stressed	17649 (11196-21998)A	13321 (11336-18108)A	15273 (11081-20356)A	11818 (10248-14812)A	19229 (15099-27352)A
Monocyte (cells μL^{-1})	No stress	2575 (1847-4025)	1795 (1139-2950)	3259 (2295-4748)	3346 (2335-4513)	2854 (1851-4521)
	Stressed	4220 (2622-6242)	4609 (3231-5924)	8590 (4574-9522)	5452 (4453-8001)	5747 (4960-7368)

¹Values are medians (minimum and maximum values) of eight replicates and compare the different groups (no stress and stressed) with treatment fixed. Medians followed by different letters differ statistically (Mann-Whitney test; $P < 0.05$).

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

No presente estudo ficou evidente os efeitos da nutrição sobre a saúde dos peixes tornando clara a evidência de que diferentes fatores nutricionais exercem importantes funções em detrimento, não somente ao adequado crescimento, mas também garantindo maior resistência frente às adversidades a que os peixes são expostos durante a criação.

Os aminoácidos são exigidos em vias metabólicas consideradas essenciais para restauro da homeostase durante estresse e, portanto, dietas deficientes podem tornar estes mecanismos menos eficientes, comprometendo severamente a saúde dos peixes. Em níveis excessivos esta condição também pode prevalecer, porém, associado ao estresse acumulativo imposto pelo nutriente em excesso, como apontado neste estudo.

Dessa forma, a busca pela dieta que atenda as exigências para ótimo crescimento e saúde é de grande importância para otimização da produção, uma vez que peixes estressados podem ter seu sistema imunológico debilitado, predispondo-os às enfermidades e, conseqüentemente, acarretando em prejuízos ao produtor.

As respostas ao estresse observadas neste estudo com a tilápia-do-Nilo, mostraram que os nutrientes da dieta forneceram substratos para serem utilizados como fonte de energia ou na gliconeogênese, ou ainda, para síntese de compostos relacionados ao transporte de ácidos graxos. Entretanto, embora não tenham sido efetivas em amenizar as alterações metabólicas do estresse, é provável que as exigências em condições de estresse estejam próximas àquelas determinadas para máximo crescimento.

Pesquisas futuras devem ser conduzidas para melhor compreensão dos efeitos da proteína e, também, aminoácidos digestíveis sobre aspectos de saúde dos peixes. Esta abordagem assume relevância do ponto de vista prático, pois poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de formulações custo-efetivas que beneficiarão toda cadeia produtiva.