

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**MORFOMETRIA E DESENVOLVIMENTO DAS GÔNADAS DE TILÁPIAS
(*Oreochromis niloticus*) SUPLEMENTADAS COM SAL MINERAL
COMPOSTO POR COBRE, MANGANÊS E ZINCO**

PAULA GRAZIELA LASSEN
Zootecnista

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Zootecnia

Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre – RS – Brasil
Março de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Lassen , Paula Graziela
MORFOMETRIA E DESENVOLVIMENTO DAS GÔNADAS DE
TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) SUPLEMENTADAS COM
SAL MINERAL COMPOSTO POR COBRE, MANGANÊS E ZINCO /
Paula Graziela Lassen . -- 2016.
63 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr. .

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2016.

1. espermatogônias. 2. espermatócitos. 3.
espermatídes. 4. espermatozoides. I. Streit Jr. ,
Danilo Pedro , orient. II. Título.

PAULA GRAZIELA LASSEN
Zootecnista

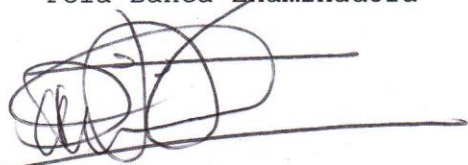
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 31.03.2016
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JR.
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 25.05.2016
Por



PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



ENEDER ROSANA OBERST
UFRGS



JÚLIA GIORA
UFRGS



LEANDRO CESAR DE GODOY
UFRGS



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

***Dedico à minha querida Vó Alzira,
Por todo amor, apoio e oração.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Aos meus queridos avós, Alcindo e Alzira, pelo amor, ensinamentos e apoio incondicional durante toda minha vida.

Aos meus Pais, Hervê e Rosa, por todo o incentivo, apoio e a torcida para que tudo desse certo.

A minha Irmã Priscila, pela companhia e o apoio.

Aos meus primos e tios, por entenderem as ausências nas reuniões familiares.

Enfim, a minha família, por sempre estar lá, quando precisei.

Ao Professor Danilo, por ter me recebido no AQUAM, pelo apoio, ensinamentos e orientação.

Ao Professor Antônio Sergio, pela disponibilidade, o empréstimo das instalações de seu laboratório e colaboração.

Aos Colegas do AQUAM, pela acolhida, amizade e companheirismo.

Aos amigos do Fátima 184, por todo o apoio, amizade e incentivo.

A UFRGS, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade e contribuição para meu crescimento profissional.

Ao CNPq, pela concessão de Bolsa de Estudos.

Muito Obrigada!

MORFOMETRIA E DESENVOLVIMENTO DAS GÔNADAS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) SUPLEMENTADAS COM SAL MINERAL COMPOSTO POR COBRE, MANGANÊS E ZINCO.¹

Autor: Paula Graziela Lassen
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da suplementação da dieta de Tilápias (*Oreochromis niloticus*) utilizando sal comercial composto dos microminerais cobre, manganês e zinco, sobre a histologia e o desenvolvimento das gônadas dos machos. Foram utilizados 1200 machos masculinizados de tilápia, com média de peso de 120g, suplementadas com níveis crescentes (0,00; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40 e 1,75 mg/kg) de um produto comercial composto por Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg e Zn 66,70 g/kg. O experimento foi conduzido em um sistema de recirculação de água, composto por 24 tanques divididos ao meio totalizando 48 unidades experimentais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com medidas repetidas no tempo. As biometrias e coletas foram realizadas em 16 e 32 semanas de experimento, para avaliar o desenvolvimento dos peixes. As gônadas coletadas foram preparadas e cortadas para confecção de lamina histológica, após coradas com hematoxilina e eosina, e posteriormente fotografadas, utilizando microscópio com câmera acoplada. A contagem das fotos foi realizada manualmente, e avaliou-se o número de células por mm³, para espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides. As correlações entre número de espermatozoides, espermatócitos, espermatídes e tratamentos foi de -0,30, -0,20 e -0,30, respectivamente, demonstrando que o efeito da suplementação crescente com o sal, é prejudicial para o desenvolvimento das células reprodutivas masculinas. Foi observado que os tratamentos com adição igual ou superior a 0,70 mg/kg do sal comercial causaram danos as gônadas para os parâmetros da gametogênese de número de espermatócitos, espermatídes e espermatozoides. Sendo assim, a utilização de sais que contenham combinação de Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg e Zn 66,70 g/kg reprodutores machos de tilápia, não é recomendada em função dos danos causados nas etapas da gametogênese, reduzindo a produção de espermatozoides.

Palavras-chave: espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozoides

¹Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (61 p.) Março, 2016.

MORPHOMETRY AND DEVELOPMENT OF GONADS TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) SUPPLEMENTED WITH MINERAL SALT COMPOSITE COPPER, MANGANESE AND ZINC¹.

Author: Paula Graziela Lassen
Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of supplementing the diet of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using commercial salt compound of micro minerals copper, manganese and zinc, on the histology and gonadal development of males. A total of 1200 masculinized male tilapia were used, with 120 g average weight, supplemented with increasing levels (0.00, 0.35, 0.70, 1.05, 1.40 and 1.75 mg / kg) of a product commercial composed of Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg e Zn 66,70 g/kg. The trial was conducted in a water recirculation system, consisting of 24 tanks divided in half, totaling 48 experimental units. The experimental design was completely randomized with repeated measures over time. The biometry and samples were taken at 16 and 32 weeks of experiment, to evaluate the fish development. The collected gonads were prepared and sliced for making histological slide, after stained with hematoxylin and eosin, and then photographed using a microscope with attached camera. The count of the photos was performed manually, and was rated the number of cells per mm³ to spermatogonia, spermatocytes, spermatids and sperm cell. The correlations between the number of spermatozoa, spermatocytes, spermatids and treatments was of -0.30, -0.20 and -0.30, respectively, demonstrating that the effect of increasing supplementation of the salt is detrimental to the development of male reproductive cells. It was observed that the addition equal or superior to 0.70 mg / kg of commercial salt caused damage in the gonads for gametogenesis parameters number of spermatocytes, spermatids and sperma cell. Thus, the use of combination of salts containing 13.40 g Cu / kg; Mn 26.70 g / kg Zn and 66.70 g / kg breeding male tilapia is not recommended due to the damage caused in the stages of gametogenesis, reducing the sperm production.

Keywords: spermatogonia, spermatocytes, spermatids and sperm cells

¹Master of Science Dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (61 p.) March, 2016.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 - Tilápia (<i>Oreochromis Niloticus</i>).....	15
2.2 – Microminerais na nutrição.....	16
2.3 - Cobre.....	17
Função, absorção e metabolismo.....	17
2.4 - Manganês.....	18
Função, absorção e metabolismo.....	18
2.5 - Zinco.....	20
Função, absorção e metabolismo.....	20
2.6 - Estrutura do Testículo em Peixes.....	22
2.7 - Espermatogênese em peixes.....	23
2.8 - Índice Gonadossomático.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 – Animais.....	27
3.2 – Dieta experimental.....	27
3.3 – Qualidade da água.....	29
3.4 – Coleta de gônadas.....	29
3.5 - Histologia.....	29
3.6 – Microscopia de luz.....	30
3.7 – Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	31
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	51
VITA.....	63

Relação de Tabelas

	Página
1. Fases reprodutivas dos machos. Descrição geral das fases dos ciclos reprodutivos em peixes. O tempo de cada fase é espécie-dependente. Esquemas da classificação histológica desenvolvida de espécies individuais podem ser adicionados como subfases dentro de cada fase definida. Alguns critérios listados para as fases podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água.....	22
2. Ingredientes e composição calculada da dieta experimental oferecida às Tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>), com base na matéria seca.....	26
3. Índice gonadossomático de machos de tilápia alimentados com dieta suplementada com Availa® Sow (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg).....	29
4. Número de espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozoides e total de células por mm ³ de machos de tilápia alimentados com dieta suplementada com Availa® Sow (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg).....	30
5. Correlação de Pearson para número de células por mm ³ e tratamentos crescentes de suplementação de Availa® Sow (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg).....	32

Relação de Figuras

	Página
1. Foto das unidades experimentais de unidade de recirculação onde as tilápias estavam alocadas no experimento com suplementação mineral.....	27
2. Número de espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozoides e total de células por mm ³ de machos de tilápia alimentados com dieta suplementada com produto comercial (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg).....	31
3 Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 µm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas. A – Dieta Controle; B – DC+0,350; C – DC+0,700; D – DC+1,050; E – DC+1,400; F – DC+1,750. G – espermatogonias, C – espermatócito, M – espermátide e Z – espermatozóide.....	34
4. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 µm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas. A – Dieta Controle; B – DC+0,350; C – DC+0,700; D – DC+1,050; E – DC+1,400; F – DC+1,750. G – espermatogonias, C – espermatócito, M – espermátide e Z – espermatozóide.....	36

Lista de Abreviaturas

AMPc	Adenosina – monofosfato – cíclico
Cu	Cobre
DC	Dieta Controle
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ED	Energia Digestível
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IGS	Índice Gonadossomático
LH	Hormônio Luteinizante
LHRH	Hormônio Liberador de LH
Mn	Manganês
PB	Proteína Bruta
PKC	Proteína Quinase C
RNA	Ácido Ribonucleico
Se	Selênio
T	Testosterona
T4	Tiroxina
UI	Unidade Internacional
Zn	Zinco

Lista de Símbolos

1. cm	Centímetros
2. cm ²	Centímetros cuadrados
3. mm	Milímetros
4. mm ³	Milímetros cúbicos
5. μm	Micrometro
6. mg	Miligramo
7. g	Gramo
8. Kg	Quilogramo
9. Ton	Tonelada
10. %	Percentual
11. °C	Graus Centigrados

1.INTRODUÇÃO

O comércio mundial de pescado tem se expandido consideravelmente nas últimas décadas, exportando mundialmente cerca de 60% de toda a produção animal. Em países em desenvolvimento, a aquicultura e a pesca são os setores de grande importância atualmente. O Brasil é o segundo maior produtor de aquicultura no continente americano, ficando apenas atrás do Chile (FAO, 2014). Mundialmente, a aquicultura vem se expandindo, tornando-se a alternativa de maior viabilidade para o suprimento da crescente demanda por pescado, tanto de origem marinha quanto de água doce. Entre os anos de 2012 e 2013, o consumo brasileiro de pescado cresceu cerca de 25% e, na última década, mais de 100%, chegando em torno de 14,5 kg por habitante/ano ultrapassando os 12,0 kg, recomendados, pela Organização Mundial da Saúde (MAPA, 2016).

A tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) é, atualmente, a espécie de peixe mais cultivada no Brasil, produzida na sua grande maioria em sistemas intensivos, os quais demandam a implantação de tecnologias, monitoramento de qualidade de água e utilização de alimento completo para atingir o máximo desempenho (MAPA, 2015). Para sua otimização, o processo de produção exige o fornecimento de ração balanceada, contendo proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais de acordo com a exigência da fase de crescimento da espécie. Nos sistemas intensivos de produção, a tilápia se destaca pelo rápido ritmo de crescimento em comparação às demais espécies utilizadas na piscicultura brasileira. Possui carne com boas características organolépticas, passível de processamento industrial para obtenção de filés sem espinhas e de grande versatilidade industrial e culinária (KUBITZA, 2011).

Esse desenvolvimento eficiente e saudável dos animais passa pelo fornecimento de uma dieta que satisfaça as necessidades básicas de crescimento, contendo concentrações muito próximas do ideal, aliados a tecnologia de preparação. A estocagem, a concentração de nutrientes e a biodisponibilidade são exemplos de parâmetros que interferem no desenvolvimento do animal (NAVARRO et al., 2007, KIRON, 2012).

Os organismos aquáticos, em sua maioria, podem suprir as suas necessidades em minerais essenciais por meio da absorção direta da água e/ou através das fontes alimentares. Essa afirmação é válida para as espécies que vivem em águas de maior salinidade, como as marinhas. Contudo, a absorção direta de minerais apresenta particularidades únicas a cada elemento, onde os macrominerais, à exceção do fósforo, podem ser eficientemente absorvidos diretamente da água pelo peixe. Por outro lado, os

microminerais ainda têm nos alimentos as suas principais fontes (HEPHER, 1988).

Assim como outros animais, os peixes apresentam exigências nutricionais, sendo que a falta ou deficiência de nutrientes provoca alterações nas funções metabólicas e afetam o desempenho reprodutivo e a saúde (GATLIN III, 2002). Ao se tratar de nutrientes essenciais, os minerais são indispensáveis ao metabolismo, destacando desde a formação da estrutura esquelética, manutenção dos sistemas coloidais (pressão osmótica, viscosidade e difusão), manutenção do equilíbrio ácido base, bem como compõem ou ativam enzimas e, ainda participam da síntese e até mesmo são componentes de hormônios (GATLIN III, 2002).

A influência dos nutrientes fornecidos na dieta sobre desempenho reprodutivo dos peixes ainda é pouco conhecida. Embora recentes pesquisas estejam sendo conduzidas na área, para otimizar o aproveitamento do potencial da piscicultura, são poucos os trabalhos que relacionam nutrição e parâmetros reprodutivos. (FERNÁNDEZ-PALACIOS et al., 1997; NAVARRO et al., 2006). Sinais de deficiência ou toxicidade raramente são observados a olho nu, quando se trata do fornecimento de uma dieta inadequada em níveis de minerais. E ao fazer-se uso de técnicas e exames clínicos, a deficiência ainda pode ser camuflada pelo uso emergencial dos minerais presentes no esqueleto (HARDY, 2001).

Alterações nutricionais, principalmente as relacionadas a microminerais, possuem efeito sobre o sistema endócrino e conseqüentemente, sobre as funções de reprodução, podendo vir a interferir na formação e desenvolvimento das gônadas, assim como na formação e liberação de gametas. Entretanto, as gônadas dependem de inúmeros fatores, para seu desenvolvimento, tais como a quantidade de luz, temperatura e nutrição (NIKOLSKY, 1963). Além disso, pouco se sabe sobre morfometria e desenvolvimento gonadal relacionados com microminerais, justificando assim, a necessidade de mais estudos referentes à suplementação dos microminerais em dietas, dentre eles, cobre, manganês e zinco, elementos essenciais para os peixes (LIN et al., 2008; LI et al., 2007; O'DELL, 1984).

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Tilápia (*Oreochromis niloticus*)

As tilápias pertencem à ordem dos Cichliformes, família Cichlidae, naturais do continente africano, Israel e Jordânia, encontradas principalmente nas bacias dos rios Nilo, Níger, Tchade e nos lagos do Centro-Oeste africano (VERANI, 1980). Há indícios que seu cultivo foi originado a quatro mil anos atrás, antes mesmo do cultivo das carpas ser introduzido na China (BALARIN e HATTON, 1979).

Existem aproximadamente 70 espécies de tilápia, algumas possuem relativa importância comercial tais como: tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), tilápia-mossâmbica (*O. mossambicus*), tilápia-azul (*O. aureus*), além de *O. maccrochir*, *O. hornorum*, *O. galilaeus*, *Tilápia zillii*, *T. rendalli*, entre outras (EL-SAYED, 2006, POPMA e LOVSHIN, 1996). Seu cultivo ocorre, na maioria, em países que apresentam climas tropical e subtropical (MUNGUTI et al., 2006).

Até meados da década de 80, grande parte das espécies com valor comercial pertenciam ao gênero *Tilápia*, do qual fazem parte as espécies que desovam em substratos e não realizam a incubação oral dos ovos. Estudos realizados por Trewavas (1982) demonstraram mudanças no comportamento reprodutivo entre espécies do gênero *Tilápia*, o que levou a criação de outro gênero, o *Sarotherodon*, no qual o macho ou o casal realiza a incubação oral dos ovos. Estudos seguintes indicaram que tilápias pertencentes ao gênero *Sarotherodon* possuíam diferença comportamental, justificando assim a criação de um novo gênero, o *Oreochromis* que é caracterizado pela incubação oral dos ovos pelas fêmeas (TREWAVAS, 1983).

A produção de tilápia nas Américas vêm crescendo a cada ano, devido ao aumento do consumo do mercado interno e também do mercado de exportação para os Estados Unidos (KUBITZA, 2000). No Brasil, o primeiro espécime a ser introduzida foi a tilápia-do-congo (*Tilápia rendalli*) em 1953, em São Paulo, já a tilápia do Nilo, procedente da Costa do Marfim, foi inserida no Nordeste, em 1971 e, posteriormente distribuída pelo restante do país (CASTAGNOLLI, 1992). O interesse pelo cultivo dessa espécie, no Sul e Sudoeste do país, cresceu rapidamente nos últimos anos, em virtude da tecnologia de reversão sexual e da pesca esportiva representada pelos pesque-pague. A tilápia é criada em diferentes sistemas, tanto em cultura semi-intensiva em tanques que recebem dejetos animais, quanto em cultivos intensivos em raceways e tanques-rede (LOVSHIN, 1997).

A espécie apresenta características altamente desejáveis como a alta rusticidade, rápido crescimento, resistência a altas densidades, adaptação a diferentes sistemas de manejo, hábito alimentar onívoro que favorece uma ótima aceitação de rações comerciais de origem vegetal desde o período pós-larva até a terminação. (CASTAGNOLLI, 1992; ZIMMERMANN e FITZSIMMONS, 2004). Por ser uma espécie tropical, a temperatura ideal para seu desenvolvimento varia entre 25 a 30°C, tendo seu crescimento afetado abaixo de 15°C e não resistindo a temperaturas em torno de 9°C (CASTAGNOLLI, 1992; KUBITZA, 2000; GONZÁLEZ e QUEVEDO, 2001; ONO e KUBITZA, 2003; CYRINO e CONTE, 2006).

A *O. niloticus* representou cerca de 72,5% da produção mundial de tilápias cultivadas em 2010 (FAO, 2010). Sua carne é considerada de ótima qualidade e é o peixe mais importante do século XXI, sendo cultivado em mais de 100 países e também no Brasil devido, principalmente, a sua rusticidade e crescimento acelerado (LOVSHIN, 1997; KUBITZA, 2000). No Brasil a tilápia é a espécie mais produzida, especialmente pela sua alta aceitação no mercado por ser isenta de espinhos intramusculares e contém rendimento de filé de aproximadamente 35%, apresentando pacote tecnológico (CASTAGNOLLI, 1992; HILDSORF, 1995; LOVSHIN, 1998).

2.2 – Microminerais na nutrição

O desenvolvimento eficiente e saudável dos animais passa, obrigatoriamente, pela disponibilidade de uma dieta que forneça as necessidades básicas de crescimento, contendo concentrações próximas do ideal e seus diversos componentes, aliados a tecnologia de preparação. A estocagem, a concentração de vitaminas e minerais, a biodisponibilidade dos nutrientes são exemplos de parâmetros que interferem no desenvolvimento do animal (NAVARRO et al., 2007). A influência da dieta no desempenho reprodutivo dos peixes permite que os ingredientes sejam utilizados na forma e níveis mais adequados aos processos metabólicos. Embora pesquisas estejam sendo conduzidas na área, para melhorar o aproveitamento do potencial da piscicultura, são poucos os trabalhos que relacionam nutrição e parâmetros reprodutivos (LUQUET e WATANABE, 1986; FERNÁNDEZ-PALACIOS et al., 1995; FERNÁNDEZ-PALACIOS et al., 1997; NAVARRO et al., 2006).

No organismo animal, os minerais participam em inúmeras funções, estas podendo ser estruturais, bioquímicas e enzimáticas. Fazem parte da constituição dos ossos e dentes e funções biológicas, como composição de diferentes compostos orgânicos, tais como proteínas e lipídios. São também catalisadores de reações bioquímicas, principalmente as relacionadas com os microelementos incorporados ou associados às enzimas, coenzimas ou cofatores, metaloproteínas e hormônios, estes elementos têm papel fundamental como reguladores da velocidade (catalisadores ou de desencadeamento de reações bioquímicas orgânicas) (ORTOLANI, 2002).

Os cofatores enzimáticos (metaloenzimas; anidrase carbônica (Zn^{2+}), citocromo oxidase (Cu^{+}), glutathion peroxidase (Se)) são enzimas que precisam de íons, chamadas metaloenzimas, podendo estes, atuar de diferentes maneiras: como centro catalítico primário, no sítio ativo da enzima;

como complexo de coordenação ou grupo de união entre o substrato e a enzima; como estabilizador da conformação da enzima (MACDONALD et al., 2002). Atuam também na contratilidade de músculos e transmissão dos impulsos nervosos e na manutenção da homeostase osmótica e do equilíbrio ácido-base (GUILLAUME et al., 1999).

Uma característica de destaque da fisiologia mineral é a grande interação (antagônica ou sinérgica) existente entre os minerais que competem entre si por sítios de ligação em moléculas transportadoras, de armazenamento e em enzimas, em alguns casos, para que ocorra o correto metabolismo de determinado mineral. As inadequações moderadas em nutrição mineral, raramente produzem sinais de deficiência ou de toxicidade que sejam detectáveis em exame clínico. Nesses casos, entretanto, sinais subclínicos de deficiência ou de toxicidade poderão ser observados se técnicas investigativas mais detalhadas forem utilizadas. O diagnóstico de deficiência moderada de minerais essenciais torna-se mais difícil pois o esqueleto dos animais pode servir como fonte emergencial de minerais para manutenção da homeostase eletrolítica no plasma (HARDY, 2001).

Os efeitos causados por microminerais sobre o sistema endócrino podem se originar de interferências sobre o eixo neuroendócrino, composto por hipotálamo-hipófise-gônadas, que executa a função de controle da reprodução em peixes e demais vertebrados. O hipotálamo é modulado exogenamente por fatores ambientais como fotoperíodo, pH, temperatura, e endogenamente por meio da dopamina e melatonina (KORF, 2006). Após, passa a sintetizar e secretar o neuro-hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que estimula a adeno-hipófise a sintetizar e secretar a gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) (ROCHA e ROCHA, 2006).

Embora uma ampla gama de funções de microminerais já tenha sido demonstrada para humanos e animais domésticos (bovinos, suínos e aves) as informações para peixes ainda é limitada e incompleta (LALL, 2002). Parte disso se deve a habilidade desses animais de suprir suas exigências por meio da assimilação de íons do ambiente aquático, dificultando assim, a determinação da exigência nutricional (LOVELL, 1998; LIM et al., 2001; LALL, 2002; TRUSHENSKI et al., 2006; SANZ, 2009; NRC, 2011). Contudo, há uma grande diferenciação na eficiência de absorção de minerais diretamente da água, em função de os alimentos serem a principal fonte de microminerais (HEPHER, 1988).

2.3 - Cobre

Função, absorção e metabolismo

O cobre apresenta importante papel metabólico por atuar na hematopoese e ser cofator enzimático essencial de inúmeras enzimas, tais como citocromo oxidase (transporte de elétrons), superóxido dismutase (combate a radicais livres), lisis-oxidase, dopamina beta-hidrolase, tirosinase e triptofano oxidase (WATANABE et al., 1997). O cobre ainda exerce influência sobre o metabolismo do ferro, favorecendo a sua absorção e reabsorção na mucosa intestinal, favorece o transporte de ferro para os tecidos via ceruloplasmina, uma globulina que é indispensável para a oxidação do ferro à

forma férrica, permitindo que este se ligue a transferrina, seja transportado e armazenado na forma de ferritina (MCDOWEL, 1992). Além disso, o cobre participa da síntese de hemoglobina, e, apesar de não fazer parte dela, possui ação direta, pois estimula a eritropoiese na formação do grupo da heme (McNAUGHTON e DAY, 1979).

Seu metabolismo afeta o desenvolvimento das células T, que são importantes para o desenvolvimento imune dos animais (MCDOWEL, 1992). Em seres com sistema imune ativado observam-se concentrações de cobre e de ceruloplasmina no sangue consideravelmente maiores em relação aos sadios (KOH et al., 1996).

A absorção do cobre ocorre no intestino, sendo o duodeno o principal sítio de absorção. Ao entrar no fluido intersticial este mineral é transportado no sangue por proteínas plasmáticas, albumina e transcupreína, de carga reversível (WINZERLING; LAW, 1997), as quais carregam o cobre inicialmente ao fígado, principal órgão de sua estocagem e metabolismo. Nas células hepáticas este mineral é rapidamente deslocado para os sítios, sendo liberado em partículas e subpartículas para a síntese hepática de proteínas cobre-dependentes como: ceruloplasmina, eritrocupreína e incorporação em diversas enzimas (LINDER e HAZEGH-AZAM, 1996).

Não há evidências claras sobre a relação entre a concentração de cobre sanguíneo, concentração de cobre hepático e fertilidade (HIDIROGLOU, 1979). O cobre geralmente é encontrado associado a proteínas e, na forma iônica apresenta toxicidade para os espermatozoides. É integrante da superóxidodismutase e da ceruloplasmina, que são necessárias para a manutenção do equilíbrio na formação e na desativação de radicais livres e, como tal, sua deficiência implica menor disponibilidade dessas moléculas.

A dieta é a principal fonte de cobre para peixes em ótimas condições de desempenho (HANDY, 1996; KAMUNDE et al., 2002b). De acordo com Abdel-Tawwab et al. (2007), existem poucos íons de cobre livre em águas naturais, pois esse mineral está associado com íons inorgânicos e substâncias orgânicas. Em função de este elemento ser essencial para todos os organismos, incluindo os peixes, o mesmo é suplementado em rações comerciais (LORENTZEN et al., 1998). Quando truta-arco-íris foram alimentados com dietas purificadas deficientes em cobre, foi possível observar um crescimento reduzido, cataratas e redução na atividade de enzimas cobre-dependentes, tais como a superóxido dismutase e a citocromo oxidase (SHIAU e NING, 2003; LIN et al., 2008). Em peixes teleósteos a exigência nutricional é de 3,0 a 10 mg Cu/kg⁻¹ em base seca na ração, variando conforme a espécie, estágio de desenvolvimento e regime alimentar (NRC, 2011).

2.4 - Manganês

Função, absorção e metabolismo

O manganês é o décimo segundo elemento mais abundante na natureza estando amplamente distribuído na crosta terrestre, encontrado apenas na forma mineral. Quando em concentrações fisiológicas, é essencial para a manutenção da homeostase dos organismos (KALEMBKIEWICZ et al., 2008). É fundamental no desenvolvimento normal do organismo, fazendo

parte dos componentes essenciais das enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos, dos lipídios e das proteínas, reprodução e como cofator de enzimas (PRESTIFILLIPPO et al., 2007). É absorvido por toda a extensão do intestino delgado e está presente principalmente nos ossos, e também no fígado, músculo, rins, gônadas e pele (HURLEY e KEEN, 1987; LALL, 2002). É cofator de uma série de enzimas como o superóxido dismutase, aquelas envolvidas na oxidação da glicose, metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (LOVELL, 1998; SATOH et al., 2001), bem como, na síntese da ureia a partir da amônia (NRC, 2011).

Em animais terrestres, é um dos minerais responsáveis pelo funcionamento do cérebro, prevenção de deformidades ósseas e reprodução (SATOH et al., 2001). Arginase, piruvato carboxilase e superóxido dismutase são metaloenzimas que contêm manganês, enquanto quinases, transferases, hidrolases e decarboxilases são enzimas que podem ser ativadas por este micromineral (LALL, 2002). Algumas enzimas são ativadas especificamente pelo manganês, como a glicosiltransferase (WATANABE et al., 1997). Dessa maneira, este micromineral pode influenciar no crescimento e na concentração no corpo do animal (PAN et al., 2008).

O manganês participa da síntese do colesterol, e consequentemente da síntese de esteroide e hormônios gonadais. A metaloenzima farnesilpirofosfato-sintetase, é ativada pelo manganês em uma das etapas de controle da síntese do colesterol (HIDIROGLOU, 1979; GRAHAM, 1991). Na deficiência de manganês ocorre a inibição da síntese de colesterol e de seus precursores, limitando a síntese de hormônios sexuais (MARTIN, 1993).

Estudos com ratos mostraram que o manganês atua diretamente no hipotálamo, estimulando a secreção de LHRH (Hormônio liberador do hormônio luteinizante), FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). A secreção de LH controla a produção de testosterona pelas células de Leydig, provocando aumento na espermatogênese, acelerando o início da puberdade (LEE et al., 2006; CHENG et al., 2003; e PRESTIFILIPPO et al., 2007).

Sistemas hormonais dependentes de mensageiros como adenilato-ciclase, guanilato-ciclase e calmodulina são modulados por sais intracelulares. O manganês é um estimulante poderoso da atividade da adenilato-ciclase na célula espermática e nas concentrações de AMPc (adenosina-monofosfato-cíclico) foram correlacionadas com a motilidade dessas células. Um estudo com sêmen congelado mostrou que a presença de manganês (e de magnésio) melhorou a fertilidade e propiciou maior manutenção da viabilidade espermática (LAPOINTE et al., 1996).

Mesmo sendo um elemento essencial aos organismos, o Mn pode causar toxicidade para peixes e outros organismos aquáticos, havendo variações na intensidade de acordo com a espécie e estágio de vida, além da possibilidade de sofrer influência pela água (VIEIRA et al., 2012). Animais expostos a altas concentrações de Mn apresentam mudanças na atividade normal do sistema endócrino, principalmente alterações na produção e secreção de hormônios sexuais (PINE et al., 2005).

Correia (2012) utilizando fêmeas maduras de lambari (*Astyanax bimaculatus*), observou que o manganês provocou uma redução nas concentrações de hormônios esteroides tais como 17 α -OHP, cortisol e o hormônio tireoideo tiroxina (T4). Contudo, quando observada em animais de laboratório de ambos os sexos, a deficiência de manganês está relacionada a prejuízos no crescimento e na reprodução, sugerindo assim, significativa importância nos processos de reprodução (SMITH, 1944).

Nas espécies *Channel catfish* (bagre-americano) (GATLIN and WILSON, 1984), *Atlantic salmon* (Salmão Atlântico) (MAAGE et al., 2000) and *Gibel carp* (carpa prussiana) (PAN et al., 2008), as exigências de manganês são descritas como 2,4; 7,5 e 13 mg Mn/kg da dieta, respectivamente. Em se tratando de peixes confinados, a exigência de Mn para a manutenção da saúde permanece entre 2,4 a 19,0 mg/kg de Mn em sua dieta (WATANABE, 1997).

2.5 - Zinco

Função, absorção e metabolismo

O zinco (Zn) participa do metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Atua como componente catalítico ou como estabilizador de metaloenzimas (Cu-Zn-superóxido-dismutase, anidrase carbônica, desidrogenase alcoólica, carboxipeptidase, fosfatase alcalina e RNA-polimerase), além de ser necessário para a estabilidade celular (GRAHAM, 1991). É necessário para a atuação quase 300 enzimas, e tem um papel catalítico, co-catalítico e/ou estrutural na conformação de proteínas (TAPIERO & TEW, 2003). A estabilização de membranas celulares, a polimerização de microtúbulos, a estrutura e/ou a função de RNA e DNA parecem depender de zinco, além da regulação de sistemas hormonais. O zinco possui atividades regulatórias com a calmodulina, com a proteína-quinase dependente de cálcio (PKC), na formação de fosfato de inositol, na atividade da adenosina-trifosfatase transportadora de sódio e potássio, na atividade da fosfatase da proteína, na ligação ao hormônio tireoideo e ao receptor do estradiol (GRAHAM, 1991).

Existe uma correlação significativa entre a concentração de zinco corporal e o crescimento animal (LORENTZEN e MAAGE, 1999). A participação em todas as fases de crescimento celular sugere que todos os tecidos possam ser prejudicados na deficiência deste mineral. O zinco não se acumula em reservas, porém, pode ser reaproveitado quando houver reabsorção óssea e catabolismo tissular. A deficiência de zinco tem resultados aparentes na produção animal e provoca disfunções endócrinas, particularmente do metabolismo de glicose, da atividade do hormônio de crescimento e da reprodução. A sua deficiência também impede a mobilização hepática de vitamina A.

Peixes alimentados com dietas deficientes em zinco apresentam crescimento reduzido, anorexia, catarata, erosão das nadadeiras, dentre outros sinais clínicos. A queda no consumo alimentar, originado pela ingestão de dietas deficientes em zinco, leva a ingestão inadequada dos demais nutrientes, exacerbando, dessa forma, o quadro de deficiência nutricional (BUENTELLO et al., 2009). Uma dieta deficiente em zinco está associada ao

comprometimento de componentes celulares humorais da resposta imunológica (GRAHAM, 1991; O'DELL, 1996; ROSSI et al., 2001).

A deficiência de zinco altera a estrutura e a função do citoesqueleto. Esse, por sua vez, interage com mensageiros secundários da ação hormonal e/ou controla a localização de moléculas de regulação e assim interfere na expressão genética. Por exemplo, a capacidade das células nervosas de transmitir estímulos da sinapse ao núcleo necessita do reposicionamento de fatores de transcrição, tal como o fator nuclear kB (NF-kB). Na deficiência de zinco, há prejuízo da polimerização da tubulina, inibindo o transporte do NF-kB ao núcleo, o que prejudica a regulação genética dele dependente. A deficiência de zinco, ao modificar o citoesqueleto, pode afetar a proliferação, a diferenciação, a plasticidade e a sobrevivência celular (MACKENZIE et al., 2006).

O zinco, juntamente com o cobre, é componente da enzima superóxido dismutase, que exerce importante função antioxidante no organismo (EVANS e HALLIWELL, 2001). O seu papel na proteção de membranas biológicas dos danos por radicais livres dá-se, devido a alguns fatores: manutenção de concentração adequada de metalotioneínas que também sequestram radicais livres; composição da superóxido dismutase, proteção de tióis; e prevenção da interação de grupos químicos com ferro para formar radicais livres (TAPIERO & TEW, 2003). O zinco pode antagonizar oxidações mediadas por metais de transição e é capaz de inibir processos de oxidação de proteínas. Mais do que isso, o zinco exerce um papel importante na modulação da atividade de caspases, enzimas envolvidas no apoptose (POWELL, 2000). Por prevenir a peroxidação dos lipídios das membranas celulares, o zinco atua, ainda, na estabilização química dos tecidos vivos (BETTGER et al., 1980).

Muitas das proteínas essenciais à maturação epididimal dos espermatozoides são andrógeno-dependentes (FLICKINGER, 1981; HAIDER et al., 1983), de modo que a deficiência de zinco leva à disfunção gonadal (MILLER et al., 1958; PRASAD et al., 1967), falha na espermatogênese, redução na secreção de testosterona, diminuição do peso testicular e atrofia dos túbulos seminíferos (MILLER et al., 1958; TANEJA & NIRMAL, 1980; SAXENA et al., 1991; KAJI, 2001), além de estar ligada a crescimentos malignos nos testículos (GUNN & GOULD, 1970). É comum observar hipogonadismo em machos que apresentam deficiência em zinco, estando relacionado às células de Leydig, que são a principal fonte de andrógenos, entre eles a testosterona, no macho. A deficiência de zinco prejudica a resposta das células de Leydig às gonadotrofinas (KAJI, 2001).

As gônadas são os tecidos que mais rapidamente crescem no organismo. Enzimas vitais para a síntese de ácidos nucléicos e de proteínas são metaloenzimas dependentes de zinco, tais como a DNA-polimerase, a RNA-polimerase e a timidina quinase (SLATER et al., 1971; PRASAD & OBERLEAS, 1973). Assim, o microelemento está relacionado à integridade funcional do DNA, por evitar sua destruição mediante inibição de enzimas degradantes (COLEMAN, 1983).

No alimento, admite-se que a presença de zinco não é indicativa de sua biodisponibilidade (MAFRA e COZZOLINO, 2004). O zinco é indisponível

nos ingredientes vegetais para os peixes. Isso se deve à complexação do zinco com fatores antinutricionais presentes nesses alimentos, principalmente com o ácido fítico (BARROS et al., 2004). Peixes e outros animais monogástricos não possuem atividade suficiente de fitase, enzima responsável para a hidrólise do fitato. Portanto, mesmo que a dieta contenha concentração de zinco endógena igual ou superior a quantidade exigida, é necessária uma suplementação de fonte de zinco nas rações com ingredientes de origem vegetal ricos em fitato (DO CARMO e SÁ et al., 2004).

A absorção de zinco ocorre, principalmente, no intestino delgado, sendo transportado para o interior da membrana celular através de carreadores (UNDERWOOD e SUTTLE, 1999). Dentro da célula da mucosa, a transferência do zinco é realizada por meio da metalotioneína, proteína produzida no fígado, cuja síntese é influenciada pelos níveis dietéticos e plasmáticos de zinco (MCDOWELL, 1992).

A exigência de zinco em dietas para peixes confinados varia entre 15 a 40 mg/kg de dieta, resultados esses, obtidos por meio de pesquisas utilizando ingredientes purificados, isentos de fatores antinutricionais (WATANABE et al., 1987). As dietas comerciais de peixes contêm significativas concentrações de fatores antinutricionais, especialmente aquelas à base de ingredientes vegetais. Por isso, essas dietas devem receber maior suplementação de zinco para compensar as inevitáveis perdas ocasionadas pelos fatores antinutricionais, notadamente pelo fitato (STEFFENS, 1987; BARROS et al., 2004).

2.6 - Estrutura do Testículo em Peixes

Os testículos dos peixes estão localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestivo, ventralmente ao mesonefro e ventro-lateralmente ao longo da bexiga gasosa. Eles se encontram presos à parede celomática e à bexiga gasosa pelo mesórquio (LACERDA, 2006).

Macroscopicamente, a tilápia nilótica possui um par de testículos alongados, com superfície lisa, apresentando tamanho semelhante entre o direito e o esquerdo. Cada testículo apresenta extremidade cranial afilada, parte média de forma triangular e porção caudal (distal) que se afila gradualmente até unir-se à do outro testículo (SILVA, 1987; MATTA, 2000).

Externamente, esse órgão é revestido de delicada cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular, da qual partem septos fibrosos em sentido radial, delimitando os túbulos seminíferos que apresentam a mesma disposição radiada desses septos. Esses túbulos convergem para um sistema de ductos eferentes, que por sua vez desembocam no ducto espermático principal, que se unirá ao ducto espermático principal do outro testículo, formando um ducto único que desemboca na papila urogenital (SILVA, 1987).

A organização básica do testículo é comum aos peixes e aos demais vertebrados. Esse órgão possui as funções espermatogênica e androgênica, contendo dois compartimentos principais: o intersticial e o tubular. No compartimento intersticial ou intertubular estão situados vasos sanguíneos, fibras nervosas, células e fibras do tecido conjuntivo, além das células de Leydig, que possuem função esteroidogênica. A produção de andrógenos tem importância na diferenciação sexual; no desenvolvimento das

características sexuais secundárias e comportamento sexual e na regulação da espermatogênese (MIURA, 1999, LACERDA, 2006).

O compartimento tubular contém células somáticas (células de Sertoli) e as células germinativas que formarão os espermatozoides, depois passarem por processo complexo e organizado da espermatogênese (MATTA, 2000). Unidas entre si por complexos juncionais especializados, as células de Sertoli dos teleósteos delimitam física e funcionalmente um clone de células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento que tem origem a partir de uma única espermatogônia primária, formando, assim, os espermatócitos ou cisto espermatogênico. Dessa forma, as células de Sertoli fornecem às células germinativas suporte físico e importantes fatores para a sobrevivência, diferenciação e proliferação dessas, estando ainda envolvida na intermediação hormonal e com a fagocitose de restos celulares (LACERDA, 2006).

2.7 - Espermatogênese em peixes

Exceto pelo arranjo cístico, no qual as células germinativas se desenvolvem de forma sincronizada (LACERDA, 2006), o processo espermatogênico de teleósteos assemelha-se muito ao de mamíferos. Durante a fase proliferativa ou espermatogonial, a espermatogônia primária ou tipo A se divide originando espermatogônias secundárias ou do tipo B que, depois de um número espécie-específico de divisões mitóticas, diferenciam-se em espermatócitos primários, iniciando a fase meiótica ou espermatocitária. Após a primeira divisão meiótica, formam-se os espermatócitos secundários que, num curto intervalo de tempo, originam as espermátides haplóides, por meio da segunda divisão meiótica. Em seguida, ocorre a fase espermiogênica ou de diferenciação na qual as espermátides se transformam em espermatozoides (SILVA, 1987). As espermatogônias primárias são as maiores células germinativas na maioria das espécies de teleósteos, apresentando núcleo grande e claro, com pouca heterocromatina, contendo um ou dois nucléolos muito evidentes (MIURA, 1999).

Após sucessivas divisões da espermatogônia primária, o número de espermatogônias secundárias por cisto aumenta geometricamente, enquanto o seu diâmetro nuclear sofre gradual redução (VILELA et al., 2003). Em tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*), com base no número de células por cisto e no diâmetro nuclear/volume celular, foi verificada a existência de pelo menos oito gerações espermatogoniais; uma geração de espermatogônia primária e sete diferentes gerações de espermatogônias secundárias. (VILELA, et al., 2003).

Em bagre africano (*Clarias gariepinus*) e em tilápia nilótica já adulta, observou-se que conforme o volume dos cistos espermatogênicos aumenta, as células de Sertoli sofrem divisão. Essa atividade mitótica é muito reduzida em cistos meióticos e ausente em cistos pós-meióticos. A proliferação das células de Sertoli é considerada o fator primário responsável pelo aumento do testículo e da produção espermática observado nos teleósteos. Em condições naturais, a proliferação das células de Sertoli no testículo de mamíferos adultos não é observada (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

2.8 - Fases Reprodutivas

Brown-Peterson et al. (2011), após uma extensa pesquisa de revisão na área, apresenta uma proposta para caracterização das fases reprodutivas dos teleósteos, a qual reúne os aspectos macro e microscópicos das gônadas ao longo do ciclo reprodutivo. Nela são reconhecidas 4 fases ao longo do ciclo reprodutivo dos indivíduos aptos à reprodução: Desenvolvimento; Apto à Desova/Liberação de Esperma; Regressão e Regeneração (Figura 1). Gônadas Imaturas seriam aquelas dos indivíduos que ainda não estão aptos para a reprodução, isto é, ainda muito jovens e fora do ciclo reprodutivo. Apesar de a proposta de Brown-Peterson et al. (2011) ter sido primariamente desenvolvida para os Perciformes marinhos, é facilmente adaptável para os teleósteos em geral.

A caracterização histológica das fases reprodutivas em machos, tem por base as alterações que ocorrem no epitélio dos túbulos seminíferos, considerando a presença ou ausência de espermatocistos e o tipo de células germinativas contidas nos espermatocistos presentes. Quando o epitélio seminífero está totalmente tomado pelos espermatocistos, ele é dito contínuo. Conforme a gônada se desenvolve e a espermatogênese avança e se completa, os espermatocistos se abrem para liberar os espermatozoides. Como resultado da não reposição dos espermatocistos, o epitélio passa a ser formado apenas pelas células de Sertoli e é dito descontínuo (Brown-Peterson et al., 2011).

Tabela 1. Fases reprodutivas dos machos. Descrição geral das fases dos ciclos reprodutivos em peixes. O tempo de cada fase é espécie-dependente. Esquemas da classificação histológica desenvolvida de espécies individuais podem ser adicionados como subfases dentro de cada fase definida. Alguns critérios listados para as fases podem variar dependendo da espécie, estratégia reprodutiva ou temperatura da água.

Fase	Terminologia anterior	Características macroscópicas e microscópicas
<i>Imaturo:</i> Nunca liberou esperma.	Imaturo, virgem.	Testículos pequenos, translúcidos e filiformes. Somente espermatogônias indiferenciadas presentes. Lúmen dos túbulos imperceptível.
<i>Desenvolvimento:</i> Testículos começando a crescer e a desenvolver.	Em maturação, desenvolvimento inicial, maturação inicial, amadurecimento.	Testículos pequenos, mas facilmente identificáveis. Início da espermatogênese e formação dos espermatocistos. Espermatogônias diferenciadas, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides iniciais e mesmo finais podem estar presentes no interior dos espermatocistos. Espermatozoides presentes no lúmen dos túbulos seminíferos ou ductos espermáticos. Epitélio germinativo contínuo ao

<p><i>Apto a liberar esperma:</i> Os peixes encontram-se aptos para liberar esperma neste ciclo, tanto em termos de desenvolvimento como fisiológicos.</p>	<p>Desenvolvimento tardio, maturação intermediária, maturação final, maduro, parcialmente esgotado, maturando, maduro, liberando esperma</p>	<p>longo de todo o testículo.</p> <p><i>Subfase “Desenvolvimento inicial”</i> Apenas espermatogônias e espermatócitos primários presentes nos espermatocistos.</p> <p>Testículos grandes, firmes e opacos. Espermatozoides presentes no lúmen dos lóbulos/túbulos seminíferos e/ou ductos espermáticos. Todos os estágios da espermatogênese (espermatogônias, espermatócitos, espermátides) podem estar presentes nos espermatocistos ao longo do epitélio seminífero/germinativo que pode ser contínuo ou descontínuo. Características do epitélio germinativo nessa fase: <i>Inicial</i>, epitélio contínuo ao longo de todo o testículo; <i>Intermediária</i>, epitélio descontínuo nas proximidades do ducto espermático; <i>Final</i>, epitélio descontínuo por todo o testículo.</p>
<p><i>Regressão:</i> Término da liberação de esperma.</p>	<p>Esgotado, regressão, pós-liberação de esperma, recuperação.</p>	<p><i>Subfase “Liberação ativa de esperma”</i> Esperma liberado sob suave pressão do abdômen</p> <p>Testículos pequenos e flácidos, esperma não liberado sob pressão. Presença de espermatozoides residuais no lúmen dos túbulos seminíferos e/ou ductos espermáticos. Espermatocistos contendo espermátides não liberadas, dispersos pelo epitélio seminífero. Proliferação das espermatogônias e regeneração do epitélio germinativo podem ter início.</p>
<p><i>Regeneração:</i> Maduro sexualmente, reprodutivamente inativo</p>	<p>Em repouso, regredido, em recuperação, inativo.</p>	<p>Testículos pequenos, filiformes. Lúmen dos túbulos seminíferos não detectável ou discreto. Espermatogônias em proliferação por todo testículo. Epitélio seminífero</p>

contínuo. Espermatocistos podem estar ausentes. Espermatozoides residuais ocasionalmente presentes no lúmen dos lóbulos/túbulos seminíferos e ducto espermático.

Adaptado de Brown-Peterson et al. (2011).

2.9 - Índice Gonadossomático

O índice gonadossomático (IGS) representa o percentual de massa que as gônadas representam no peso corporal e é utilizado como importante parâmetro reprodutivo para fêmeas e machos. Em machos, esse índice nem sempre representam adequadamente a condição reprodutiva, particularmente em peixes (NIKOISKI, 1963; VAZZOLER, 1996). Inúmeros autores têm utilizado o índice gonadossomático em estudos relacionados à biologia reprodutiva (ANDRADE, 1980; FERREIRA, 1986; FERREIRA e GODINHO, 1990; COSTA, 1999) ou para associá-lo a maturidade e a fecundidade dos indivíduos (JONS e MIRANDA, 1997).

Durante o processo de maturação gonadal ocorre o aumento gradativo dos valores de IGS, em que o maior valor é atribuído ao estágio de maturação mais avançada dos machos, e os valores menores são relacionados às fases como regressão, regeneração e imaturo. Esse comportamento foi observado em *Leporinus copelandii* (Nomura, 1976), *Colossoma mitrei* (Ferraz de Lima, 1984), *Parodon tortuosus* (Azevedo et al., 1988); *Shizodon knerii* (Ferreira e Godinho, 1990), *Leporinus friderici* (Barbieri e Santos, 1988) e em *Leporinus piau* (Tavares e Godinho, 1994).

Jons e Miranda (1997) concluíram que as oscilações sazonais do peso das gônadas podem ser utilizadas como indicador grosseiro da época de reprodução da população. Para Tavares e Godinho (1994) os valores máximos de IGS para *L. piau* coincidiram, em ambos os sexos, com os estágios de maturação avançada e intermediária e os valores mínimos com o estágio de repouso. A sazonalidade do desenvolvimento das gônadas está associada também com o armazenamento de reservas orgânicas e minerais nos tecidos somáticos, que são transferidas para as gônadas durante a gametogênese (LAWRENCE, 1976).

Entretanto, as gônadas não dependem somente da quantidade e da qualidade do alimento consumido, mas também de outros fatores, como a quantidade de luz e variação da temperatura (NIKOLSKY, 1963).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Piscicultura, AQUAM, localizado no Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o período de março á outubro de 2015. As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Rio Grande.

3.1 – Animais

Foram utilizadas 1200 tilápias, todos revertidos sexualmente, distribuídas aleatoriamente, em 24 tanques de 500 lt, divididos ao meio, formando assim, 48 unidades experimentais, com uma densidade de 50 peixes por tanque. As tilápias foram alocadas nos tanques, para um período de adaptação de duas semanas. Após, realizou-se uma biometria inicial, redistribuindo os animais em 25 por unidade experimental com peso médio de 120g.

3.2 – Dieta experimental

As tilápias foram alimentadas, duas vezes ao dia, *ad libitum*, às 9:00 e as 17:00 horas, com produto comercial Availa® Sow, em seis diferentes níveis de inclusão de manganês (Mn), cobre (Cu) e zinco (Zn), sendo eles (0,00; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40 e 1,75 g/ton). Diariamente, foi realizado o processo de sifonagem para retirada de sobras de rações e fezes dos animais.

A dieta controle (Tabela 1) foi elaborada de forma a ser isoproteica e isoenergética, com 27% de proteína bruta (PB) e 3075 kg de energia digestível/kg (kg ED/kg), respectivamente (FURUYA et al., 2010), balanceadas de acordo com os valores de ED, PB, aminoácidos digestíveis e fósforo disponível (PEZZATO et al., 2002; BOSCOLO et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2008 e GONÇALVES et al., 2009).

Considerando que o produto utilizado na suplementação (Availa® Sow) possui em sua composição (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg), a suplementação mineral nos diferentes tratamentos era composta por:

Tratamento 1 - Dieta controle (DC);

Tratamento 2 - DC + 4,69 mg de Cu, 9,35 mg de Mn e 23,35 mg de Zn/ kg de ração;

Tratamento 3 - DC + 9,38 mg de Cu, 18,69 mg de Mn e 46,69 mg de Zn/ kg de ração;

Tratamento 4 - DC + 14,07 mg de Cu, 28,04 mg de Mn e 70,04 mg de Zn/ kg de ração;

Tratamento 5 - DC + 18,76 mg de Cu, 37,38 mg de Mn e 93,38 mg de Zn/ kg de ração;

Tratamento 6 - DC + 23,45 mg de Cu, 46,73 mg de Mn e 116,73 mg de Zn/ kg de ração.

Previamente ao processo de extrusão, os ingredientes foram moídos em peneira (0,70 mm), misturados e, acrescido o óleo, os tratamentos foram pré-misturados e depois acrescidos a dieta controle, permitindo uma melhor homogeneidade da ração. As dietas passaram por processo de extrusão em equipamento de rosca simples, obtendo-se péletes com diâmetro geométrico médio, aproximado, de 3,0 mm para primeira fase e 6,0 mm para segunda fase. Posteriormente à extrusão, as rações passaram por secagem em estufa de ventilação forçada, (550°C/24h), e armazenadas.

Tabela 2. Ingredientes e composição calculada da dieta experimental oferecida às Tilápias (*Oreochromis niloticus*), com base na matéria seca.

Ingredientes (%)	Níveis de inclusão de Availa® Sow (%)					
	0,00	0,35	0,70	1,05	1,40	1,75
Farelo de Soja 45%	52,00	52,00	52,00	52,00	52,00	52,00
Milho	29,00	29,00	29,00	29,00	29,00	29,00
Farelo de Arroz	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
Óleo de Soja	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84	4,84
Fosfato Bicálcico	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Premix vitamínico ¹	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
L – Treonina	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
DL – Metionina	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Sal	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Inerte (Caulim)	1,00	0,96	0,93	0,89	0,86	0,83
Availa® Sow	0,00	0,03	0,07	0,10	0,14	0,17
Total (%)	100	100	100	100	100	100

Composição Calculada

Energia Digestível (Kcal/Kg)	3075	3075	3075	3075	3075	3075
Proteína Bruta %	27,36	27,36	27,36	27,36	27,36	27,36
Extrato Etéreo	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20
Cálcio %	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
Fósforo %	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51
Lisina %	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
Metionina %	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
Met. + Cistina %	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
Treonina %	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07

¹Premix vitamínico: composição/kg de produto: Pantotenato de Cálcio = 1.045mg, Cloreto de Potássio = 15g, Cloreto de Sódio = 38g, Inositol = 14g, Citrato de Colina = 60g, Ácido Fólico = 320 mg, Nicotinamida = 9.000 mg, Vitamina A = 8.000 UI, Vitamina B1 = 2.940 mg, Vitamina B2 = 8.640 mg, Vitamina B6 = 3.000 mg, Vitamina B12 = 750 mcg, Vitamina D = 162.500 UI, Vitamina E = 100 UI.

3.3 – Qualidade da água

As análises dos parâmetros físicos e químicos da água foram realizadas semanalmente para amônia, alcalinidade, nitrito e dureza e, diariamente, para temperatura, oxigênio e pH. A temperatura e oxigênio da água foram obtidas diariamente, com oxímetro digital (Modelo 550A – YSI – Yellow Springs, EUA), pH com um pHmetro digital (Servylab mPA/210). A amônia, alcalinidade, nitrito e dureza foram analisados por meio do uso de kit colorimétrico Alfakit®.

O experimento foi executado em sistema de recirculação de água, termorregulado, dotado de filtro biológico, formado por 24 tanques circulares construídos em PVC com capacidade de 500 litros cada, divididos ao meio, com entrada e saída de água independentes e renovação de água constante (Figura 1).



Figura 1 - Foto das unidades experimentais de unidade de recirculação onde as tilápias estavam alocadas no experimento com suplementação mineral.

3.4 – Coleta de gônadas

Foram coletadas gônadas de oito peixes/tratamento nas semanas 16 e 32 após o início do experimento. Para as coletas, os peixes permaneceram em jejum ($-12 \pm 0,5$ horas) e foram anestesiados com benzocaína (30mg/L de água) (BROWN, 1988). A partir dos resultados da biometria foi determinado valores para peso total e comprimento padrão e total. Os peixes utilizados para a coleta foram sacrificados por secção medular e eviscerados para obtenção do comprimento e largura das gônadas e índice gonadossomático. As gônadas coletadas, foram fixadas em solução de formaldeído 4% tamponado e após 12 horas, transferidos para álcool 70% (NAKATANI et al., 2001).

3.5 – Análise histológica

Para a análise histológica, as gônadas foram seccionadas transversalmente (0,3 – 0,5 mm) e processadas automaticamente à vácuo

(Leica ASP200S). As seções foram impregnadas e embebidas em Paraplast Xtra (Sigma P3808) e os blocos resultantes cortados em seções de 6 µm usando um micrótomo rotativo motorizado (Leica RM2255). Lâminas obtidas com seções foram coradas com hematoxilina e eosina (CARSON & HADLIK, 2009). As seções histológicas foram fotografadas usando uma câmera digital (Olympus DP72) acoplada ao microscópio (Olympus BX51). Os procedimentos histológicos de rotina seguiram as recomendações de Lemos et al. (2014).

3.6 – Microscopia de luz

No microscópio de luz (40X) avaliou-se o número de células presentes no tecido testicular. Pontos correspondentes a espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozóides foram computados em cinco campos aleatoriamente distribuídos para cada animal. As contagens foram realizadas manualmente com o auxílio de um contador mecânico. Os valores foram transformados para número de células por mm³, para posterior análise estatística.

3.7 – Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo, com seis tratamentos e oito repetições de área, sendo os tanques foram considerados as unidades experimentais. Foi realizada a análise de normalidade dos dados para todas as variáveis dependentes pelo teste de Shapiro-Wilk. O peso da gônada e índice gonadossomático foram transformadas para logaritmo. O resíduo da largura da gônada foi transformado. Utilizou-se um modelo misto com o efeito fixo de tratamentos, coletas e suas interações e os efeitos aleatórios do resíduo e de tilápias aninhadas nos tratamentos, utilizando o procedimento MIXED. Quando observadas diferenças, as médias foram comparadas pelo recurso lsmeans. As médias foram submetidas ao teste de correlação de Pearson. Foram utilizados testes de seleção da estrutura, utilizando o critério de informação bayesiano (BIC), para determinar o modelo que melhor representasse os dados. O programa estatístico utilizado foi o SAS versão 9.4 (2014). Foi adotado 5% como o nível de significância máximo das análises.

4. RESULTADOS

Não foi observado interação ($P=0,2400$; Tabela 3) entre tratamentos e coletas IGS. Não foi observada diferença ($P<0,05$, Tabela 4) entre tratamento e coleta para número de espermatozoides. Porém, na primeira coleta as tilápias com maior número de espermatozoides foram as que receberam o tratamento 1, e 2. Em contraste os animais que receberam o tratamento 6 produziram uma menor quantidade de espermatozoides por mm^3 . Quanto a segunda coleta o maior número de espermatozoides foi observado apenas no tratamento 1 com média de 4836 células/ mm^3 .

Foi observado diferença ($P<0,05$, Tabela 4) entre tratamento e coleta para número de espermátides, apenas nos tratamentos 1 e 2. Todavia, dentro da mesma coleta, os animais que receberam o tratamento 1 foram superiores aos demais neste parâmetro. Quando coletados com trinta e duas semanas, apenas o tratamento 2 diferiu dos demais, quanto ao número menor de espermátides por mm^3 .

Tabela 3: Índice gonadossomático de machos de tilápia alimentados com dieta suplementada com produto comercial (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg).

Coletas (semanas)	Tratamentos						Média	P*	P**
	1	2	3	4	5	6			
IGS (%)									
1	0,60±0,06	0,71±0,08	0,49±0,06	0,58±0,08	0,66±0,24	0,71±0,14	0,62±0,05	0,9363	0,8467
2	0,69±0,12	0,78±0,09	0,53±0,11	0,62±0,09	0,66±0,15	0,46±0,04	0,63±0,04		
Média	0,64±0,07	0,75±0,06	0,51±0,06	0,60±0,06	0,66±0,14	0,59±0,08		0,1923	

*Probabilidade Coletas e Tratamento, letras diferentes nas linhas e colunas diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P<0,05$); **Probabilidade interação tratamento e coleta, letras diferentes nas linhas diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P<0,05$).

Tabela 4: Número de espermatogônias, espermatócitos, espermátides, espermatozoides e total de células por mm³ de machos de tilápia alimentados com dieta suplementada com produto comercial (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg).

Coleta (semana)	Tratamentos					
	1	2	3	4	5	6
Número de espermatozoides (mm ³)						
16	15047±1544 ^{Aa}	13990±1017 ^{ABa}	11504±991 ^{Ba}	11693±932 ^{Ba}	10841±1151 ^{Ba}	5186±942 ^{Ca}
32	4836±1544 ^{Aa}	10430±1329 ^{Ba}	12552±781 ^{BCa}	10810±947 ^{Ba}	10436±886 ^{BCa}	7355±728 ^{Ca}
Número de espermátides (mm ³)						
16	9569±611 ^{Aa}	8626±444 ^{A^{Ba}}	8014±535 ^{BCa}	7354±402 ^{BCa}	6865±668 ^{Ca}	5038±424 ^{Da}
32	6790±961 ^{Ab}	4596±430 ^{Cb}	6512±592 ^{Ab^a}	6960±521 ^{Aa}	6802±459 ^{Aa}	4974±398 ^{Ab^a}
Número de espermatócitos (mm ³)						
16	8402±409 ^{Aa}	6913±305 ^{Ba}	5930±262 ^{Ca}	6042±264 ^{Ca}	4198±180 ^{Da}	4017±298 ^{Da}
32	3480±244 ^{CD^b}	4090±198 ^{Bb}	3967±230 ^{BC^b}	4799±211 ^{Ab}	4314±210 ^{ABa}	3039±128 ^{Db}
Número de espermatogônias (mm ³)						
16	3313±179 ^{Ba}	3549±233 ^{Ba}	3534±124 ^{Ba}	4346±229 ^{Aa}	3289±132 ^{Ba}	2507±118 ^{Ca}
32	1642±119 ^{BC^b}	1842±94 ^{Bb}	1125±59 ^{Db}	2719±137 ^{Ab}	1706±88 ^{BC^b}	1437±82 ^{Ab}
Número de outras células (mm ³)						
16	201±48 ^{Ba}	284±64 ^{Ba}	594±60 ^{Aa}	191±44 ^{Ba}	596±59 ^{Aa}	297±27 ^{Ba}
32	90±16 ^{Ab}	103±20 ^{Ab}	67±16 ^{Ab}	80±18 ^{Ab}	83±15 ^{Ab}	79±18 ^{Ab}
Número total de células (mm ³)						
16	36534±1719 ^{Aa}	33364±1178 ^{Aa}	29578±1226 ^{Ba}	29628±986 ^{Ba}	25791±1550 ^{Ca}	17047±1142 ^{Da}
32	26840±1790 ^{Ab}	21070±1281 ^{Bb}	24224±1187 ^{AB^b}	25370±928 ^{Ab}	25505±1062 ^{Aa}	16886±1026 ^{Ca}

^{A, B, C} Letras sobrescritas maiúsculas diferentes significam, na linha, diferença estatística entre os tratamentos (P < 0,05).

^{a, b, c} Letras sobrescritas minúsculas diferentes significa diferença estatística entre coleta. (P < 0,05).

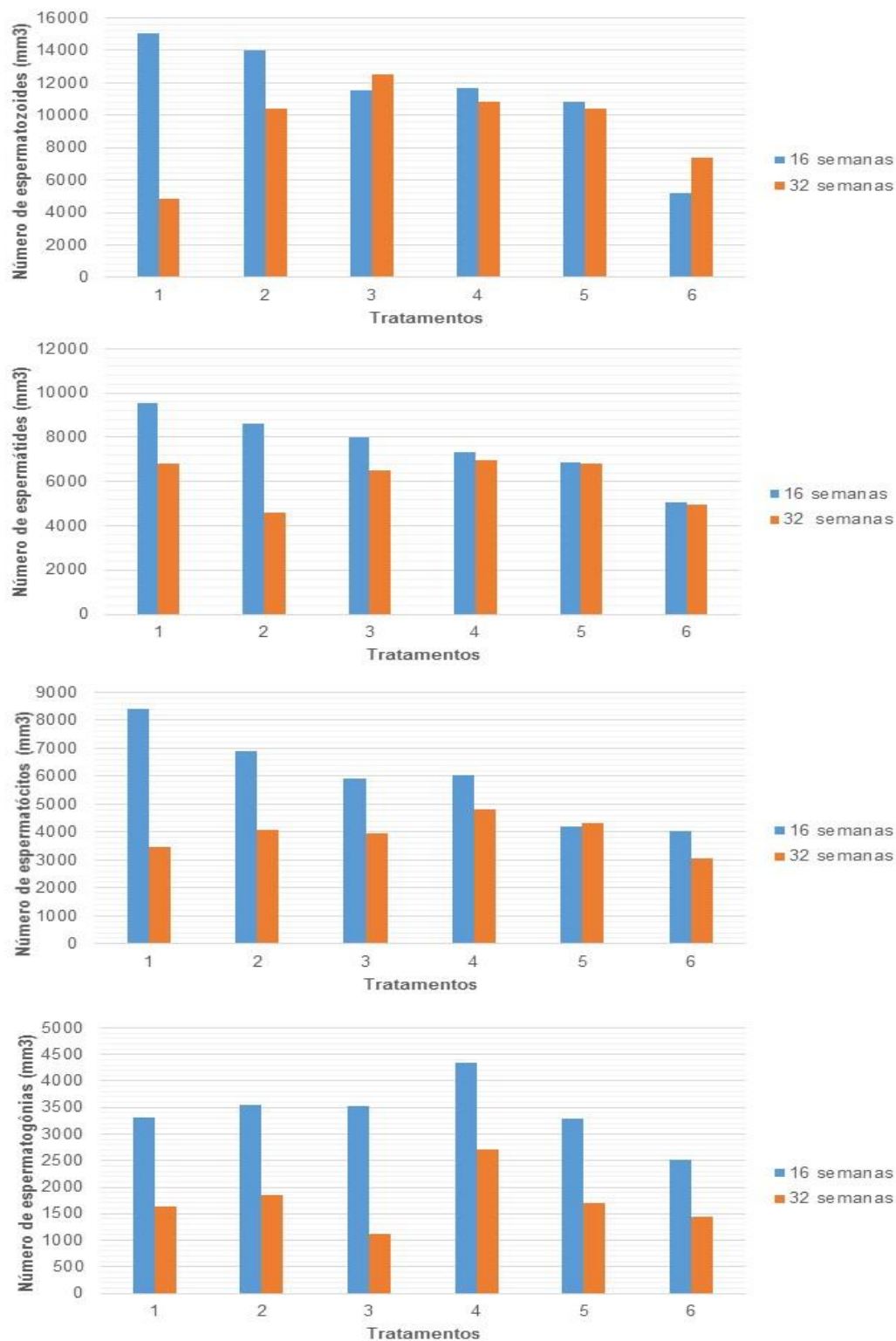


Figura 2: Número de espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozoides e total de células por mm^3 de machos de tilápia alimentados com dieta suplementada com produto comercial (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg).

Houve diferença entre coletas ($P < 0,05$, Tabela 4) para número de espermatozóitos para todos os tratamentos, exceto o tratamento 5. Quanto as tilápias do tratamento 1, durante a primeira coleta, foi observado maior número de espermatozóitos/ mm^3 . Todavia, na segunda coleta, as tilápias alimentadas com os tratamentos 4 e 5 foram superiores aos demais tratamentos (Figura 2).

Todos os tratamentos apresentaram diferença entre coletas ($P < 0,05$, Tabela 4) para número de espermatogônia entre coletas, sendo que na coleta 1 no tratamento 4 foi observado o maior número de células/ mm^3 . Já segunda coleta, os animais no tratamento 4 e 6 apresentaram maiores números de células/ mm^3 .

O número de total de células não apresentou diferença nas coletas ($P < 0,05$, Tabela 4) dos tratamentos 5 e 6. Quanto aos animais nos tratamentos 1 e 2 não houve diferença para o número total de células, sendo os mesmos com as medias mais elevadas. Por outro lado, na segunda coleta, o tratamento 1 continuou como sendo o com o maior número assim como os animais nos tratamentos 4 e 5.

Tabela 5: Correlação de Pearson para número de células por mm^3 e tratamentos crescentes de suplementação de produto comercial (Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg)

Parâmetro	Tratamentos
Nº espermatozóides	-0,3076
Nº espermátides	-0,2016
Nº espermatozóitos	-0,3409
Nº espermatogônias	-0,0700
Nº Leydig	#
Nº Total de células	-0,3926

Correlação de Pearson que não foi estatisticamente significativa, as demais são estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A suplementação de microminerais pode levar a respostas nem sempre positivas às variáveis zootécnicas. No presente estudo após 32 semanas de exposição diária as doses suplementadas com níveis mais elevados dos microminerais combinados (0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75 g/ton), podem ter levado a um quadro de comprometimento na formação dos espermatozoides. Se por um lado os dados de gametogênese convergiram para respostas semelhantes para a maioria dos parâmetros, os dados biométricos tiveram poucas alterações significativas.

Isoladamente ou em conjunto os microminerais podem provocar efeitos negativos. Em altas doses o zinco seguramente afeta o desenvolvimento das células germinativas de *A. bimaculatus*, provocando retardo no desenvolvimento celular da espermatogênese, comprometendo o processo de divisão celular (SANTOS, 2009). Neste estudo, o fato relacionado no parágrafo anterior possui similaridade com os resultados encontrados na espermatogênese das tilápias. Com exceção dos tratamentos que receberam o tratamento 1 (sem microminerais) e o T2 (menor nível oferecido), os parâmetros: número de espermatozoides, espermátides e espermátócitos e número total de células/mm³ foram afetadas nos demais tratamentos (Figura 3 e Figura 4). As respostas gerais da espermatogênese da tilápia, nestas dosagens mais elevadas, reforçam a ideia quanto a concentração máxima recomendada para peixes por (WATANABE, 1997; NRC, 2011) de 10mg Cu/kg-1; 19,0mg Mn/kg-1 e 40 mg Zn/kg-1 para estes minerais.

Outro ponto relevante com relação a toxidez dos microminerais, é que estes podem atuar diretamente sobre o equilíbrio entre os hormônios gonadotróficos, o que reflete na maturação, morfologia e fisiologia gonadal (ADAMS, 1990). A concentração de 3,10 mg/kg de cobre na espécie *Puntius conchoniis*, provocou o desaparecimento de estádios intermediários entre espermatogônias e espermátides, após dois meses de exposição (KUMAR, 1984). Esta informação corrobora com as concentrações mais elevadas observadas a partir do tratamento 2, onde todos os resultados foram sempre comprometedores para a gametogênese. Certamente o desaparecimento dos estádios intermediários (espermátides, em especial) impossibilita a formação do espermatozoide.

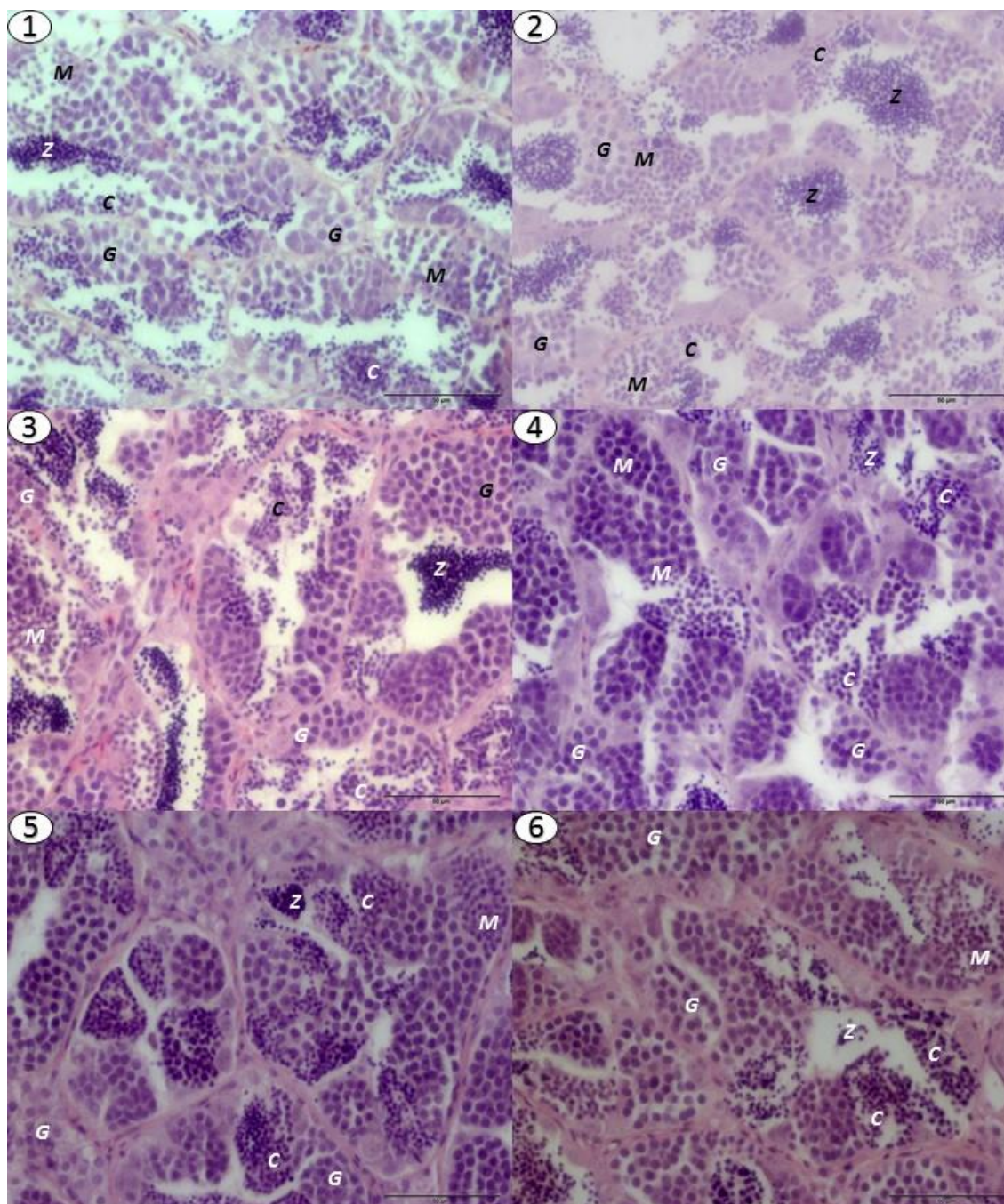


Figura 3. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 µm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas. 1 – Tratamento 1; 2 – Tratamento 2; 3 – Tratamento 3; 4 – Tratamento 4; 5 – Tratamento 5; 6 – Tratamento 6. G – espermatogonias, C – espermatócito, M – espermatíde e Z – espermatozóide.

A severa degeneração celular reprodutiva observada nas tilápias expostas as concentrações mais elevadas de minerais podem ter uma relação com a observação de Yamagushi et. al. (2007). Onde o autor estudando o efeito da exposição a metais em inúmeras espécies de peixes, observaram que o processo de espermatogênese não prosseguiu além das espermatogônias,

pois o mesmo foi interrompido devido a morte celular. Todavia, deve ser considerado o processo adaptativo dos peixes quanto a intoxicação com microminerais, como por exemplo o cobre. Nas tilápias em que foram ofertados com níveis mais altos de suplementação (T3, T4, T5 e T6) (Figura 3) ocorreu uma melhora no número de espermatídes, espermatócitos e espermatogônias. Este fato pode ter relação com as observações de Kumar (1984) em *Puntius conchoni*, que verificaram que o cobre interferiu nos estádios germinativos nos primeiros meses de exposição, mas após cinco meses, houve uma adaptação do organismo de forma a reduzir os efeitos negativos do mineral na multiplicação celular. De todo modo, mesmo sendo de amplo conhecimento que os fatores bióticos e abióticos interferem no desenvolvimento espermático, a literatura é pouco expressiva quanto as informações referenciadas a morfometria e o desenvolvimento gonadal relacionado com microminerais.

Quanto ao zinco, foi observado que em altas doses provoca apoptose das células de linhagem germinativa, reduzindo assim, a quantidade de células viáveis. Por exemplo, o fornecimento de doses excessivas de Zn, pode resultar em interações antagônicas com outros microminerais que podem competir por um mesmo sítio, podendo assim ocasionar sua deficiência (SIGNOR, 2007). Além disso, o zinco possui efeito antagônico ao cobre devido a sua similar natureza, competindo, assim, por sítios de ligação das proteínas responsáveis pela absorção do mineral (SANDSTRÖM, 2001; BARROS et al., 2002; SÁ, 2003). Kumar (1984) observou que indivíduos machos de *Puntius conchoni*, possuíam lesões permanentes e severas, como necrose e degeneração de túbulos seminíferos expostos a Zn. Em contraponto, o manganês possui efeito sobre a atividade dos hormônios sexuais, e em sua produção e secreção, o que pode explicar os resultados obtidos para número de espermatogônias. A ação do manganês foi observada por Lee et.al. (2006), em que constataram que mesmo em baixas concentrações, ele foi capaz de induzir a produção dos hormônios LH, FSH e T em ratos machos, e induzir a maturação desses animais.

A partir dos parâmetros de gametogênese, podemos obter alguns questionamentos quanto aos dados biométricos. Pois, como no peso dos animais na segunda biometria, os valores foram mais elevados para os tratamentos T1, T2 e T3 em relação aos demais tratamentos. Os resultados na gametogênese, com exceção do T3 (Figura 4), também resultaram em melhores índices na grande maioria dos parâmetros, mesmo que no parâmetro biológico geral, os IGS dos valores não tenham diferidos entre os tratamentos, porém quando analisamos quanto a desenvolvimento celular reprodutivo, há evidências da redução de atividades gametogênicas das tilápias nos tratamentos mais elevados em microminerais (GATLIN III e WILSON, 1986; LANNO et.al, SHAW e HANDY, 2006). Vale ressaltar que o NRC (2011) para teleósteos a exigência nutricional é de 3,0 a 10 mg Cu/kg-1 em base seca na ração, variando conforme a espécie, estágio de desenvolvimento e regime alimentar.

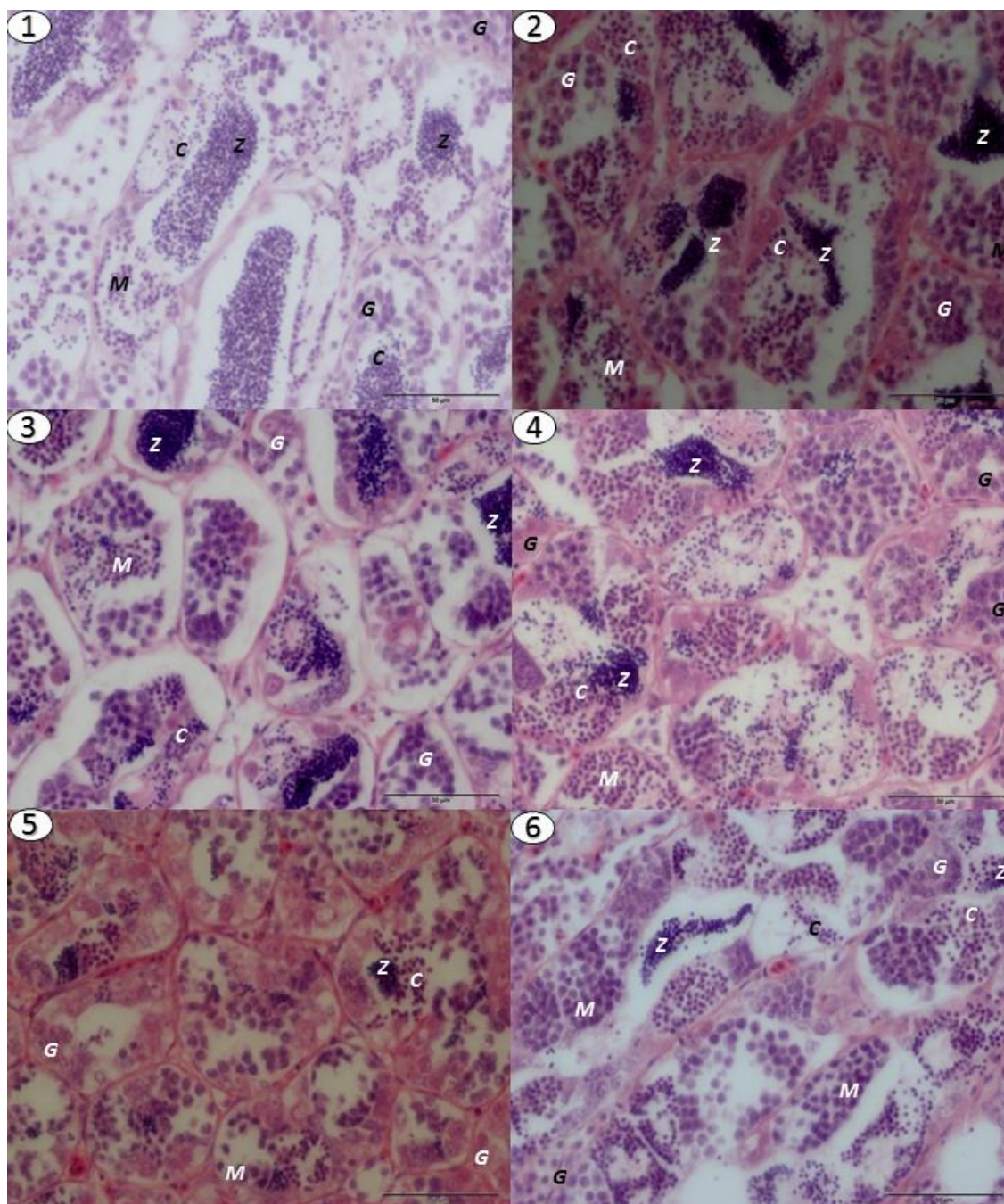


Figura 4. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 µm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas. 1 – Tratamento 1; 2 – Tratamento 2; 3 – Tratamento 3; 4 – Tratamento 4; 5 – Tratamento 5; 6 – Tratamento 6. G – espermatogonias, C – espermatócito, M – espermatíde e Z – espermatozói de.

A ausência de sinais de deficiência nos peixes no T1 (ausência de suplementação de minerais combinados) pode ser explicada pelo fato da dieta controle suprir a exigências minerais por meio da composição química de seus ingredientes. Dietas básicas contém fontes proteicas, que podem vir a conter ácidos graxos e minerais, o que dificultam a interpretação de estudos (CLEARWATER et.al, 2002). Os microminerais podem ser encontrados

distribuídos tanto nos alimentos quanto no ambiente aquático, entretanto em situações extremas pode vir a ocorrer situações de deficiência (LALL, 2002). Ressaltando que as tilápias são filtradoras de zooplânctons e retiram o percentual quase total, que necessitam destes organismos.

Com relação a ausência de diferença para os dados de índice gonadossomático, embora seja bastante usual, a utilização deste parâmetro como indicador de desenvolvimento de peixes, pode não ser sempre um índice confiável de atividade gonadal, especialmente em relação a indivíduos machos (MATTA et.al., 2009). Alterações no IGS são comumente observadas em peixes expostos a poluentes (KIME, 1995), como a constatação de Levesque et.al. (2006) em *Perca flavescens* observou a redução do IGS após exposição a diferentes metais.

6. CONCLUSÃO

Os níveis mais elevados de um sal mineral comercial (0,70; 1,05; 1,40 e 1,75 mg/Kg), correspondendo a: Cu 13,40 g/kg; Mn 26,70 g/kg; Zn 66,70 g/kg, foram danosos aos parâmetros da gametogênese número de espermatócitos, espermátides e espermatozoides para machos reprodutores de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-TAWWAB, M. et al. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, n. 1-4, p. 335–345, 2007.

ADAMS, S. M. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1990.p. 333-353.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 17. ed. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC International, 2000. 3.413 p.

ASHMEAD, H. D.; ZUNINO, H. Factors which affect the intestinal absorption of minerals. In: ASHMEAD, H. D. **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**. New Jersey: Noyes Publications, 1992. p. 21-46.

BARROS, M. M. et al. Nutrição e saúde de peixes. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Palestras técnicas ...** São Paulo: CBNA - AMENA, 2006. p. 1-15.

BARROS, M. M. et al. Complexo zinco aminoácido em dietas práticas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Animal Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 437-441, 2004.

BETTGER, W. J. et al. Interaction of zinc and vitamin E in the chick. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 163, n. 3, p. 432-436, 1980.

BILLARD, R. Hypophysectomie et spermatogenèse chez *Poecilia reticulata* (poisson Cyprinodontidae). **C R Acad Sci Hebd Séances Acad Sci D**, v. 268, p. 1856-1859, 1969.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Apparent digestibility of the energy and nutrients of conventional and alternatives foods for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 539-545, 2002.

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN-PETERSON, N. J. et al. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, Bethesda, v. 3, n. 1, p. 52–70, 2011.

BUENTELLO, J. A.; GOFF, J. B.; GATTLIN III, D. M. Dietary zinc requirement of hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*, and Bioavailability of two chemical different zinc compounds. **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 40, n. 5, p. 687-693, 2009.

BURY, N. R.; GLOVER, C. N.; HOGSTRAND, C. Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. **Biochemic et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1614, n. 2, p. 211-219, 2003.

BURY, N. R.; WALKER, P. A.; GLOVER, C. N. Nutritive metal uptake by teleost fish. **The Journal Of Experimental Biology**, London, v. 206, p. 11-23, 2003.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: Funep, São Paulo, 1992. 189 p.

CARSON, F. L.; HADLIK, C. **Histotechnology**: Self-Instructional Text. 3. ed. Chicago: ASCP Press, 2009.

CLEARWATER S. J.; FARAG, A. M.; MEYER, J. S. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v. 132, n. 3, p. 269-313, 2002.

COSSARINI-DUNIER, M. et al. Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. **Developmental and Comparative Immunology**, Tarrytown, v. 12, n. 3, p. 573-579, 1988.

CONSINS, R. J. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 65, n. 2, p. 238-309, 1985.

CYRINO J. E. P.; PORTZ, L. Y R. MARTINO, R. C. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus salmoides*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 609-616, 2000.

CYRINO, J. E.; CONTE, L. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Ed.). **AquaCiência 2004**: Tópicos

Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2006. cap.12, p.151-171.

DE ROSA, G. et al. Regulation of superoxide dismutase activity by dietary manganese. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 110, n. 4, p. 795–804, 1980.

DO CARMO E SÁ, M. V. et al. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juvenile diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1-4, p. 385-401, 2004.

EVANS, P.; H ALLIWELL B. Micronutrients: Oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 85, supl. 2, p. 67-74, 2001.

FAO. **Fisheries and aquaculture information and statistic service**: 2015: Global aquaculture production: 1950-2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/figis>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**: Opportunities and challenges. 2014 Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA, R. (Ed.). **Male Reproduction: A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p. 197-219.

FURUYA, W. M. et al. **Tabelas brasileiras de nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, Gráfica & Editora, 2010.

GATLIN, D. M.; WILSON, R. P. Studies on the manganese requirement of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 85-92, 1984.

GATLIN III, D. M. Nutrition and Fish Health. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. **Fish Nutrition**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 671-702.

GATLIN III D. M.; WILSON R. P. Dietary zinc requirement of fingerling channel catfish. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 113, n. 3, p. 630-635, 1983.

GATLIN III D. M.; WILSON R. P. Zinc supplementation of practical channel catfish diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 31-36, 1984.

GONÇALVES, G. S. et al. Efeitos da suplementação de fitase sobre a disponibilidade aparente do Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe e suplementação de fitase em alimentos vegetais para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2155-2163, 2005.

GONÇALVES, G. S. et al. Digestible nutrients of Nile tilapia feed. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 201-213, 2009.

GONZÁLEZ, C. E.; QUEVEDO, E. T. Cultivo de las tilápias roja (*Oreochromis spp.*) y plateada (*Oreochromis niloticus*). In: GOMEZ, H. R.; DAZA, P. V.; AVILA, M. C. C. **Fundamentos de Acuicultura Continental**. Bogotá: Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, 2001. cap. XIII, p. 283-299.

GUILLLAUME, J. et al. **Nutrition and feeding of fish and crustaceans**. Plouzané, France: Springer-Praxis, 1999.

GUIMARÃES, I. G. et al. Nutrient digestibility of several grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 39, n. 6, p. 781-789, 2008.

HANDY, R. D. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: TAYLOR, E. W. **Toxicology of Aquatic Pollution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 29-60.

HARDY, R. W. Nutritional deficiencies in commercial aquaculture: Likelihood, onset, and identification. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. (Ed.). **Nutrition and fish health**. New York: Food Products Press, 2001. p. 131-148.

HANDY, R. D. et al. Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the African walking catfish: copper dose-effect and a novel anion-dependent pathway in the intestine. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 230, p. 2365-2377, 2000.

HEIDINGER, R. C.; CRAWFORD S. D. Effect of temperature and feeding rate on the liversomatic index of the largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Journal of the Fish. Res. Board of Canada**, Ottawa, v. 34, n. 5, p. 633-638, 1977.

HEPHER, B. **Nutrition of Pond Fishes**. New York: Cambridge University Press, 1988. p. 388.

HIDALGO, M. C.; UREA, E.; SANZ, A. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits: Proteolytic and amylase activities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 170, n. 3-4, p. 267-283, 1999.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37 n. 12, p. 1393-1399, 1959.

HURLEY, L. S.; KEEN, C. L. Manganese. In: MERTS, W. (Ed.). **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**. 5th Edition. London, UK: Academic Press, 1987. p. 185-224. v. 1.

JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Haematology**. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986.

KAMUNDE, C. N.; CLAYTON, C.; WOOD, C. M. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 1, p. R69-R78, 2002a.

KAMUNDE, C. et al. Copper metabolism in actively growing rainbow, trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 205, p. 279-290, 2002b.

KIME, D. E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 5, n. 1, p. 52-96, 1995.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 111-133, 2012.

KOH, T. S.; PENG, R. K.; KLASING, K. C. Dietary copper level affects copper metabolism during lipopolysaccharide-induced immunological stress in chicks. **Poultry Science**, Oxford, v. 75, n. 7, p. 867-872, 1996.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2. ed. Jundiaí: F. Kubitza, 2011. p. 316.

KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Fernando Kubitza, 2000. 289 p.

KUMAR, S.; PANT, S. C. Comparative effects of the sublethal poisoning of zinc, copper and lead on the gonads of the teleost *Puntius conchonius* ham. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 189-194, 1984.

LALL, S. P. The Minerals In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish Nutrition**. 3. ed. New York: Academic Press, 2002. p. 259-308.

LACERDA, S. M. S. **Transplante de espermatogônias a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental**. 2006. 67 f.y Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

LANNO, R. P. et al. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 49, n. 3-4, p. 257-268, 1985.

LEMOS, V. M. et al. Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in south Brazil. **Journal of Fish Biology**, London, v. 85, n. 3, p. 671-687, 2014.

LEVESQUE, H. M. et al. Hormonal, morphological and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, D.C., v. 66, n. 7, p. 657-676, 2003.

LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Comparison of chelated zinc and zinc sulphate as zinc source for growth and bone mineralization of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed practical diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, p. 237-243, 1996

LIM, C.; KLESIOUS, P. H.; WEBSTER, C. D. The role of dietary phosphorus, zinc, and selenium in fish health. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. **Nutrition and Fish health**. New York: Food Products Press, 2001. p. 201-212.

LIN, Y.-H.; LIN, S.-M.; SHIAU, S.-Y. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 284, n. 1-4, p. 207-210, 2008.

LI, J.-S.; LI, J.-L.; WU, T.-T. The effects of copper, iron and zinc on digestive enzyme activity in the hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) x *Oreochromis aureus* (Steindachner). **Journal of Fish Biology**, London, v. 71, n. 6, p. 1788-1798, 2007.

LORENTZEN, M.; MAAGE, A.; JULSHAMN, K. Supplementing copper to a fish meal based diet fed to Atlantic salmon parr affects liver copper and selenium concentrations. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 67-77, 1998.

LORENTZEN, M.; MAAGE, A. Trace element status of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed a fish-meal based diet with or without supplementation of zinc, iron, manganese and copper from first feeding. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 163-171, 1999.

LOVELL, R. T. Diet and fish husbandry. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. **Fish Nutrition**. Third Edition. London: Academic Press, 2002. p. 703-754.

LOVSHIN, L. L. Tilapia farming. A growing worldwide aquaculture industry. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba. **Anais ...** Piracicaba: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p. 137-164.

LOVELL, R. T. **Nutrition and feeding of fish**. 2. ed. Norwell, Massachusetts, USA: Kluwer Academic Publishers, 1998.

LOVELL, T. Dietary Requirements. In: **Nutrition and feeding of fish**. 2. ed. Auburn: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 61-68.

MAAGE, A.; LYGREN, B.; EL-MOWAFI, A. F. Manganese requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2000.

MAAGE, A. et al. Zinc gluconate and zinc sulfate as dietary zinc sources for Atlantic salmon. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 183-187, 2001.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. The importance of zinc in human nutrition. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de inspeção para identificação de espécies de peixes e valores indicativos de substituições em produtos da pesca e aquicultura**. Brasília, 188 p, 2016.

MATTA, S. L. P. **Efeitos do hipotireoidismo induzido pelo PTU (6-n-Propil-2-Tiouracil) sobre a proliferação das células de Sertoli e células germinativas em tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2000. 108 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

MATTA, S. L. P. et al. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cells number per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 143, n. 3, p. 970-978, 2002.

MATTA, S. L. P.; GOMES, M. L. M; ANDRADE, D. R. Reproductive biology of *Oligosarcus argenteus* (Gunther, 1864) adult males and description of the gonadal maturation stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 1, p. 119-126, 2009.

MCCALL, K. A.; HUANG, C. C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 130, p. 1437S-46S, 2000.

McNAUGHTON, J. L.; DAY, E. Effect of dietary Fe to Cu ratios on hematological and growth responses of broiler chickens. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 559-564, 1979.

McDOWEL, L. R. **Copper and molybdenum**: minerals in animal and human nutrition. San Diego, Califórnia: Academy Press Inc., 1992. p. 178-204.

MIURA, T. Spermatogenetic cycle in fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press; 1999. p. 571-578. v. 4.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce.** Desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: Eduem, 2001. 378 p.

NAVARRO, R. D. et al. Comparação morfométrica e índices somáticos de machos e fêmeas de lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jerenyms, 1842) em diferente sistema de cultivo. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 24, n. 2, p. 165-176, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp.** Washington: National Academic Press, 2011. p. 164-184.

O'DELL, B. L. **Present Knowledge of Nutrition, Nutrition Reviews.** Nutrition Foundation, Washington, D.C.: Nutrition Foundation, 1984. p. 506.

ONO, E. A.; KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanques-rede.** 3. ed. Jundiaí: Eduardo A. Ono, 2003. 112 p.

PAN, L. et al. Effects of dietary manganese on growth and tissue manganese concentrations of juvenile gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 14, n. 5, p. 459-463, 2008.

PARK, J. T.; JOHNSON, M. J. A submicrodetermination of glucose. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 181, n. 1, p. 149-151, 1949.

PEARCE, J.; HARRIS, J. E., DAVIES, S. J. The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 337-340, 2003.

PEZZATO, L. E. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1595-1604, 2002.

PHILIPPART, J.; RUWET, C. L. Ecology and distribution of tilapias. In: PULLIN, R. S. V.; LOWE-MCCONNELL, R. H. (Ed.). **The biology and culture of tilapias.** Manila: Internatinal Center for Living Aquatic Resources, 1982. p. 15-59.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects for comercial production of tilapia.** Alabama: Research and Development Series, 1996. p. 23.

RAMSEYER, L. et al. Effect of dietary zinc supplementation and phytase pre-treatment of soybean meal or corn gluten meal on growth, zinc status and zinc-related metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 251-261, 1999

ROBERTS, R. J. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In: ROBERTS, R. J. (Ed.). **Fish pathology**. 2nd ed. London: Baillière Tindall, 1989. p. 56-134.

ROSSI, L. et al. Reduced growth and skeletal changes in zinc-deficient growing rats are due to impaired growth plate activity and inanition. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 131, n. 4, p. 1142-1146, 2001.

SÁ, M. V. C. et al. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 273-281, 2005.

SÁ, M. V. C. et al. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1-4, p. 385-401, 2004.

SANTOS, G. L. **Determinação de Cádmio e Chumbo em Tecidos de Cetáceos por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SATOH, S. et al. Availability to rainbow trout of zinc in white fish meal and various zinc compounds. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v. 53, n. 4, p. 595-599, 1987

SATOH, S. et al. Bioavailability of amino acid-chelated and glass-embedded manganese to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fingerlings. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, supl. 1, p. 18-25, 2001.

SANDSTRÖM, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 85, supl. 2, p. 181-185, 2001.

SANZ, F. (Org.). **La nutrición y alimentación en piscicultura**. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 111-121, 2006

SHIAU, S. Y.; NING, Y. C. Estimation of dietary copper requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Animal Science**, Penicuik, v. 77, n. 2, p. 287-279, 2003.

SIGNOR, A. **Desempenho produtivo e resistência ao estresse pelo frio da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com levedura**

autolisada e zinco. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro De Aqüicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SILVA, M. **Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemotesticular da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Peixe, Ciclídeo).** 1987, 164 f. Tese (Doutorado em Ciências-Morfologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1987.

SPIES, J. R. Colorimetric procedures for amino acids. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 3, p. 467-477, 1957.

STEFFENS, W. **Principios fundamentales de la alimentación de los peces.** Zaragoza: Editora Acribia, 1987. 272 p.

TOCHER, D. G. et al. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L., halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. and sea bream *Sparus aurata* L. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 195–207, 2002.

TRUSHENSKI, J.; KASPER, C.; KOHLER, C. Challenges and opportunities in finfish nutrition. **North American Journal of Aquaculture**, London, v. 68, n. 2, p. 122-140, 2006.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock.** 3. ed. Wallingford: CABI, 1999. 614 p.

VERDOUW, H.; VANECHTELDT, C. J. A.; DECKKERS, E. M. J. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, New York, v. 12, n. 6, p. 399-402, 1978.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística experimental.** São Paulo: Atlas, 1989.

VILELA, D. A. R. **Duração da espermatogênese e proliferação das células de Sertoli em tilápiasnilóticas (*Oreochromis niloticus*) mantidas em diferentes temperaturas.** 2003. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2003.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 151, n. 1-4, p. 185-207, 1997.

WINZERLING, J.; LAW, J. H. Comparative nutrition of iron and copper. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 501-526, 1997.

ANEXOS 1

Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas.

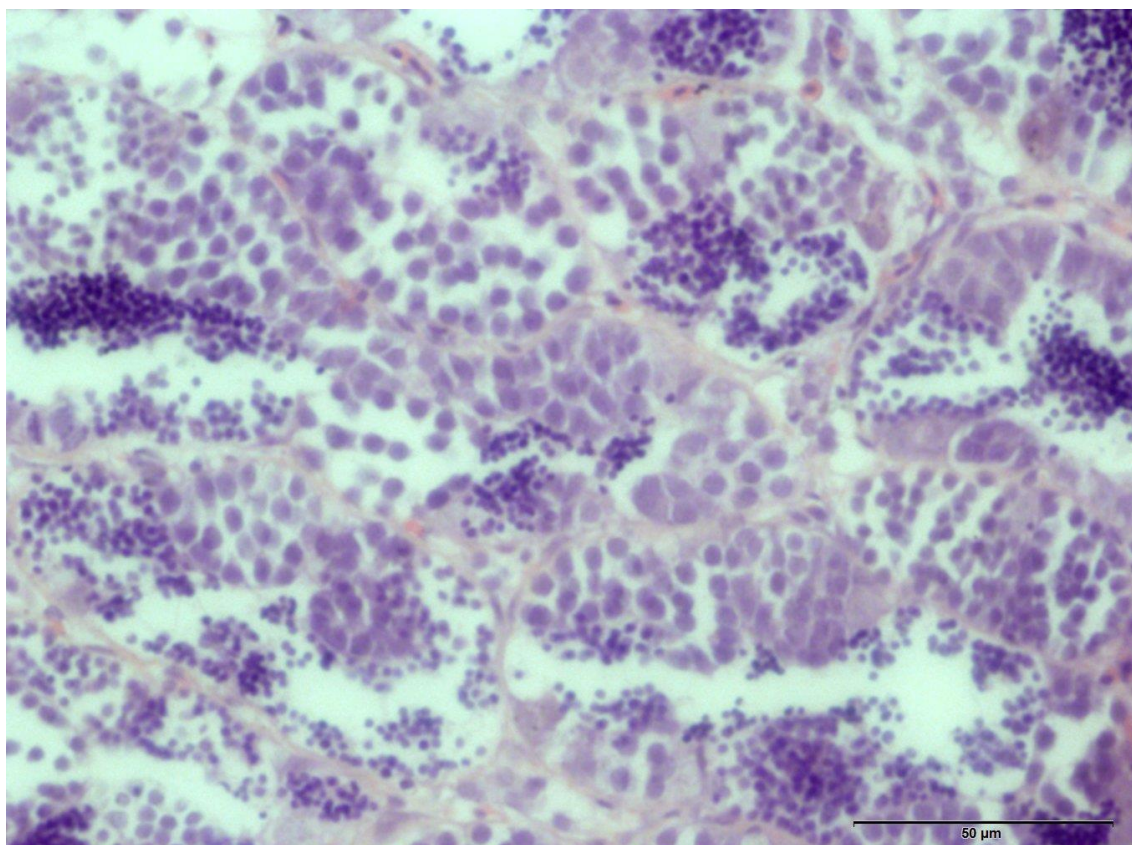


Figura 1. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas, (Tratamento 1 – Dieta Controle).

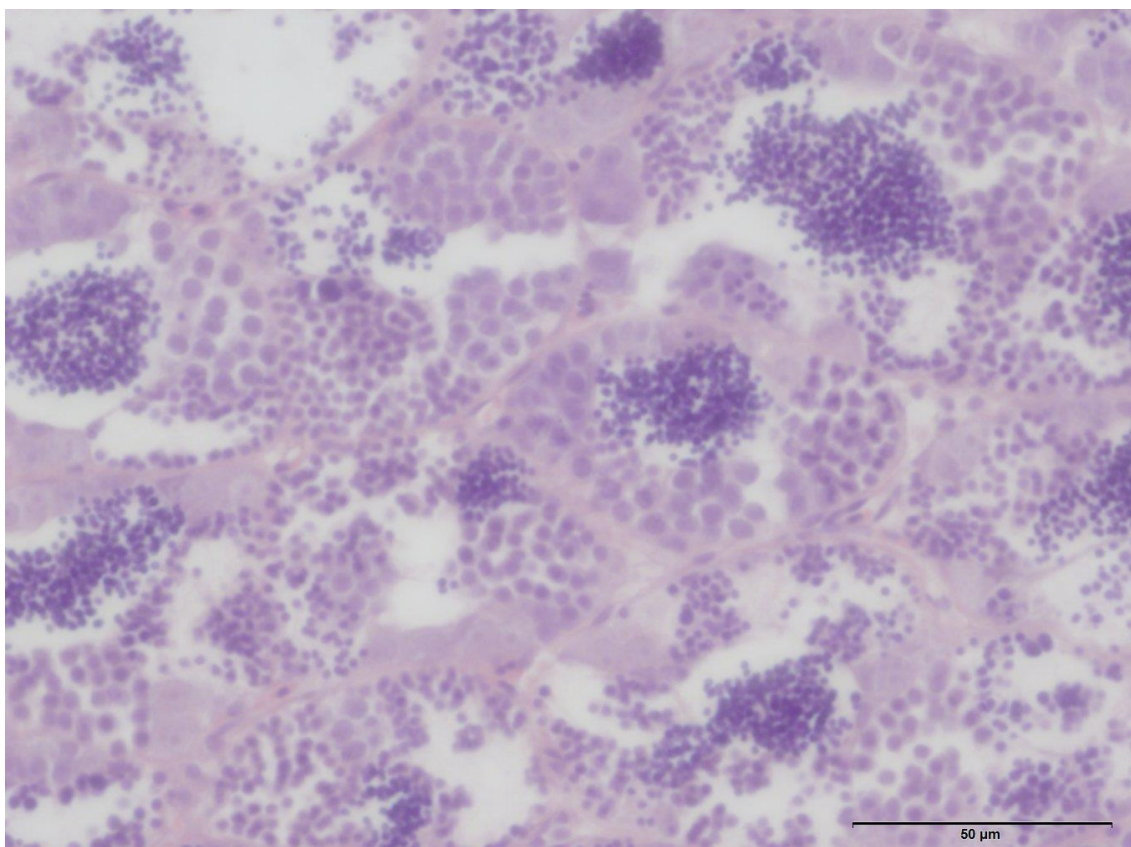


Figura 2. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas, (Tratamento 2 - DC + 4,69 mg de Cu, 9,35 mg de Mn e 23,35 mg de Zn/ kg de ração).

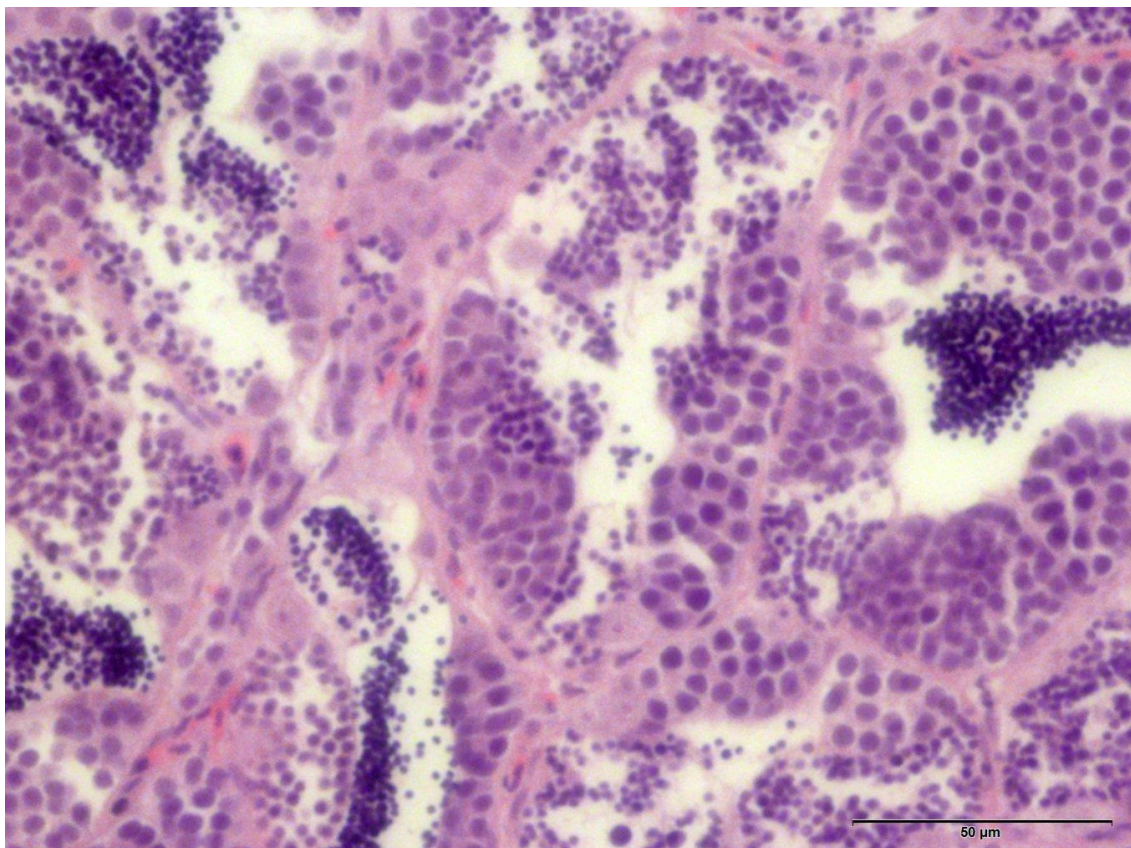


Figura 3. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas, (Tratamento 3 - DC + 9,38 mg de Cu, 18,69 mg de Mn e 46,69 mg de Zn/ kg de ração).

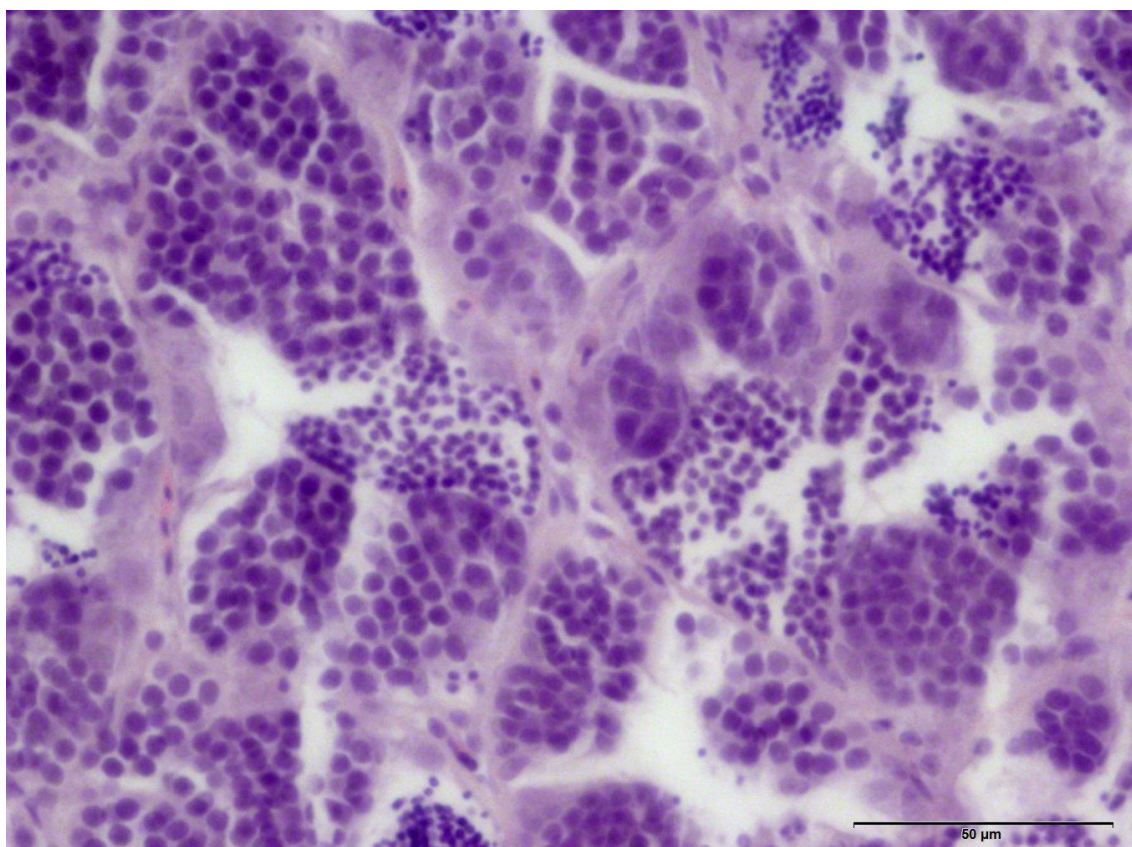


Figura 4. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 µm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas, (Tratamento 4 - DC +14,07 mg de Cu, 28,04 mg de Mn e 70,04 mg de Zn/ kg de ração).

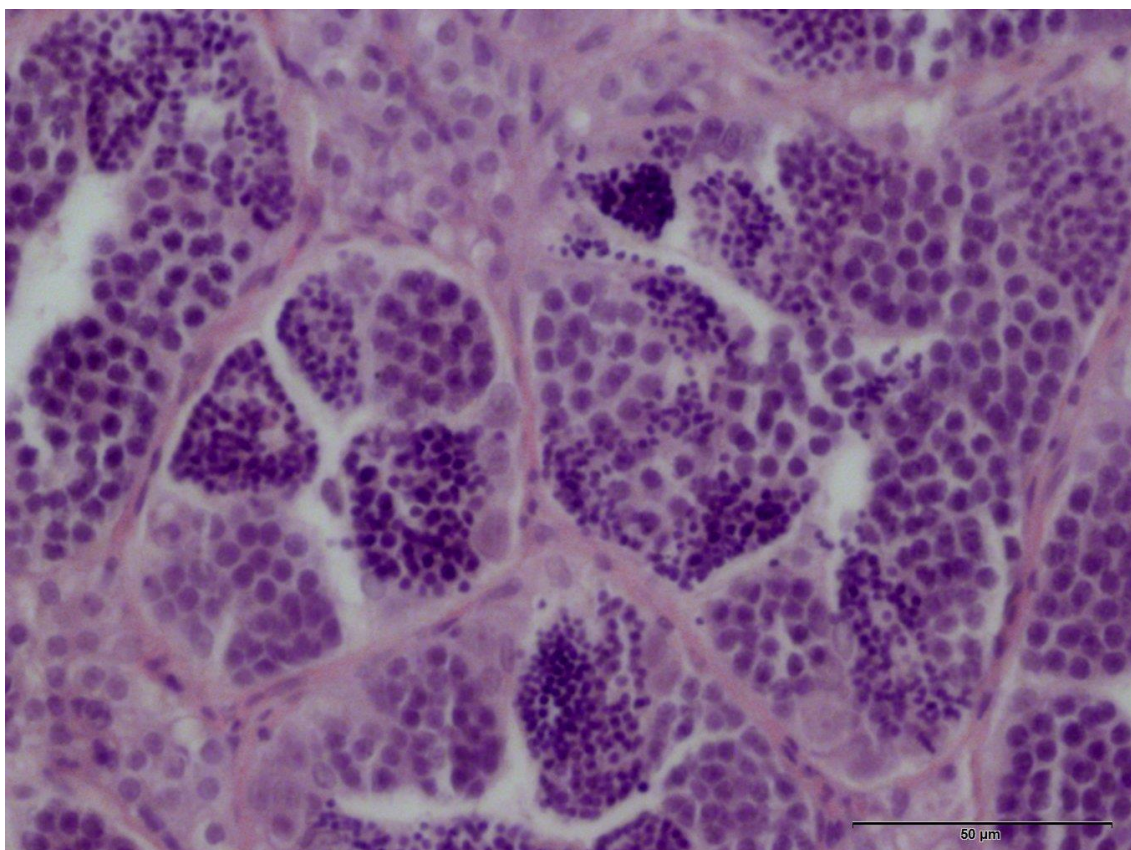


Figura 5. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas, (Tratamento 5 - DC + 18,76 mg de Cu, 37,38 mg de Mn e 93,38 mg de Zn/ kg de ração).

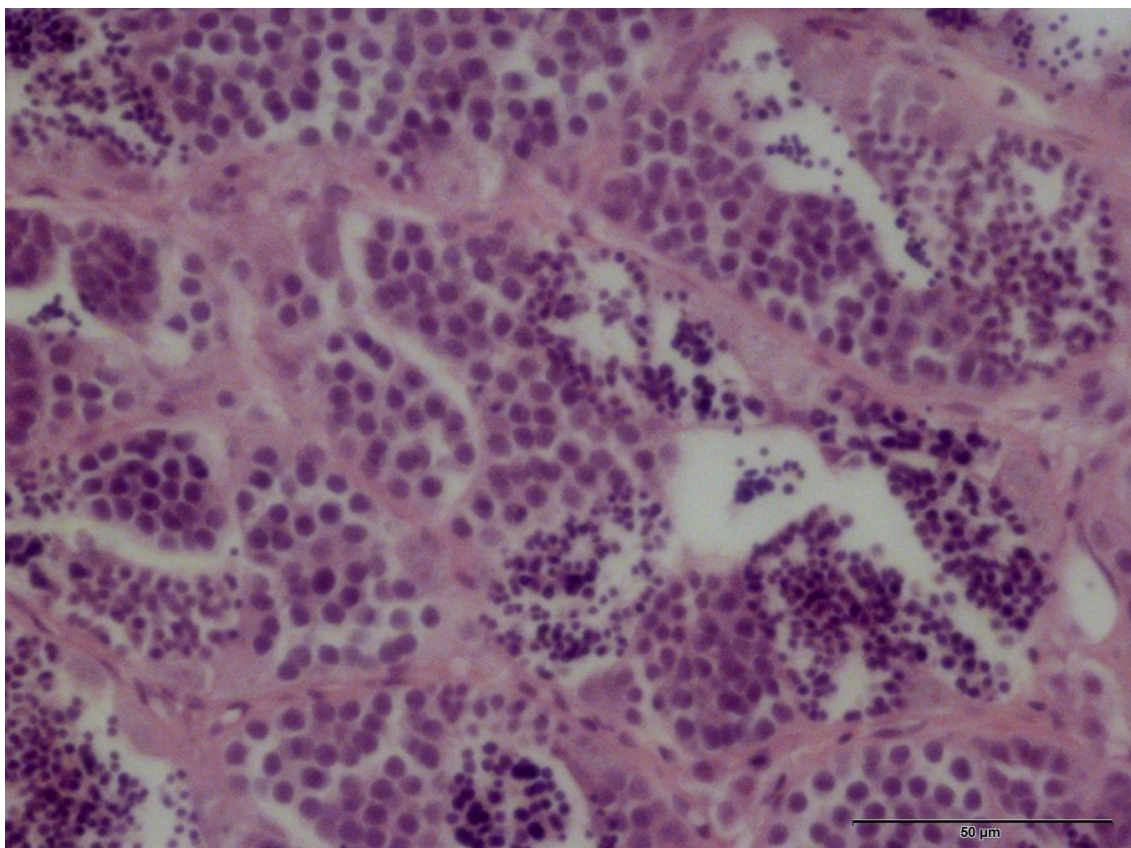


Figura 6. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 16 semanas, (Tratamento 6 - DC + 23,45 mg de Cu, 46,73 mg de Mn e 116,73 mg de Zn/ kg de ração).

Anexo 2

Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas.

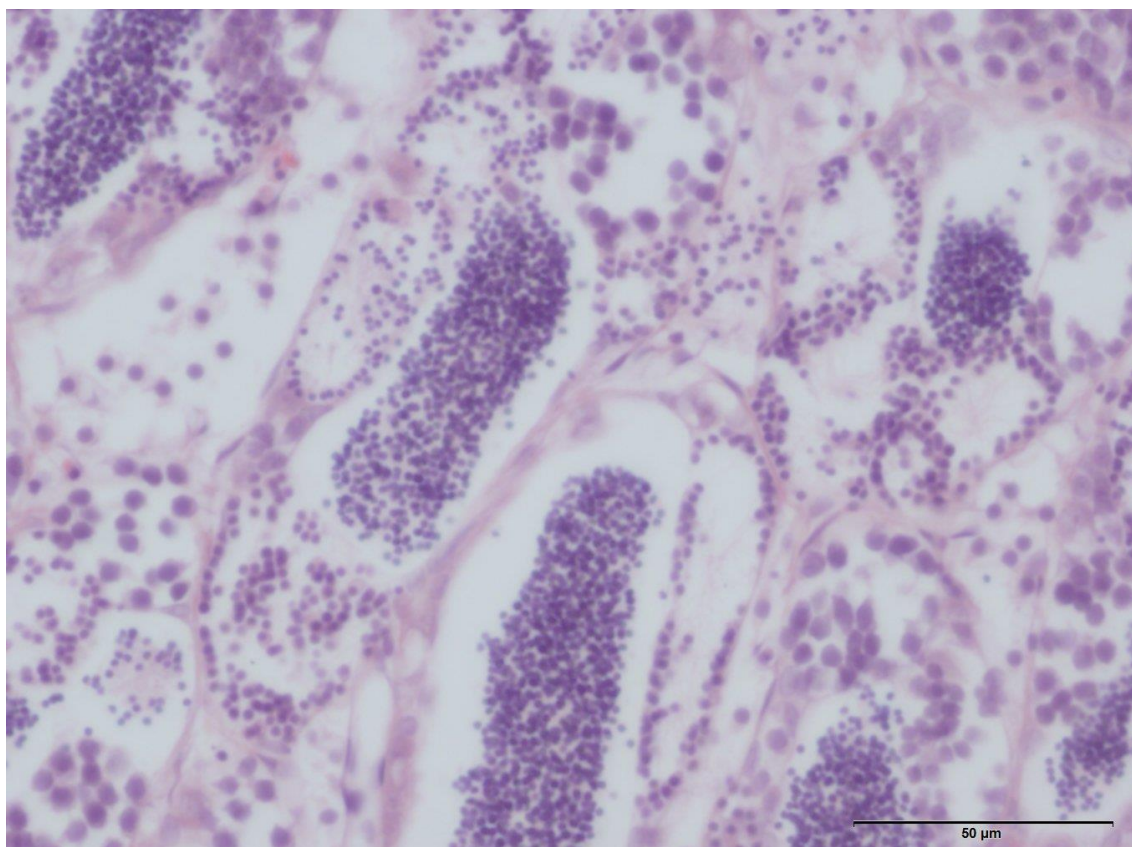


Figura 1. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, aumento, coletadas com 32 semanas, (Tratamento 1 – Dieta Controle).

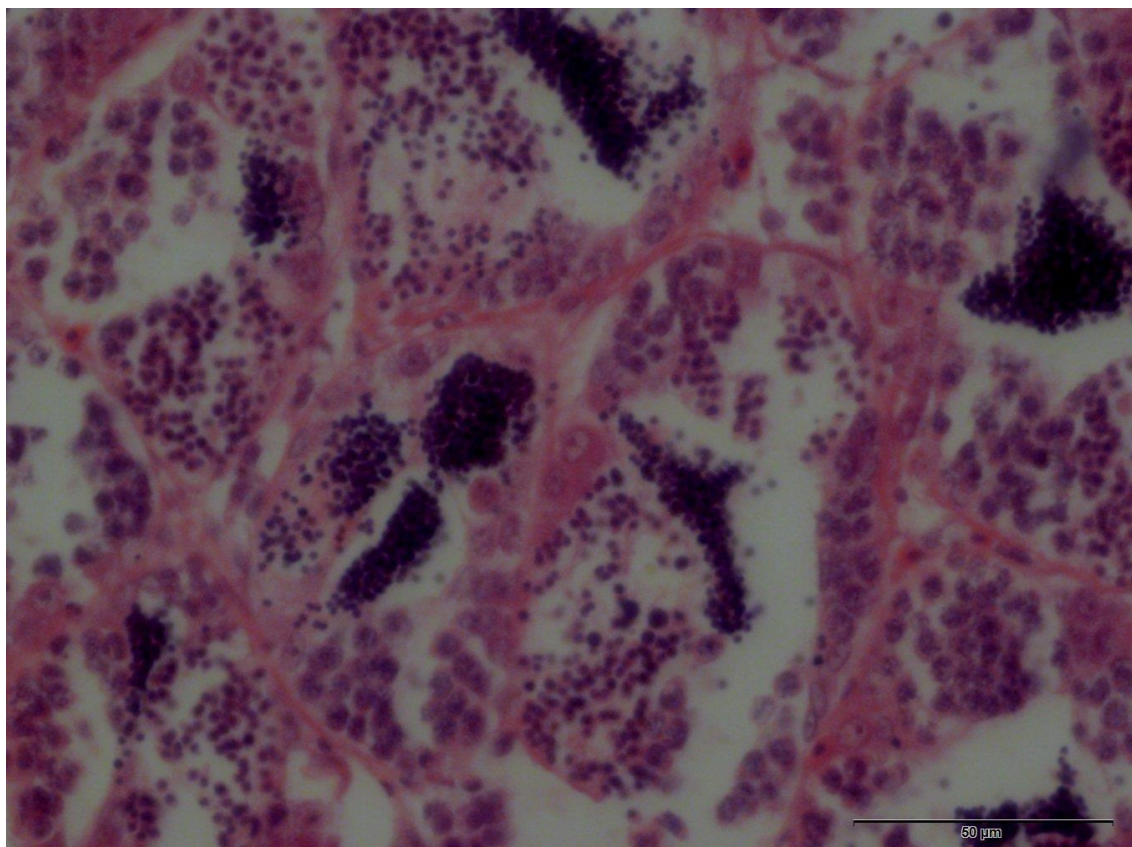


Figura 2. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 µm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas, (Tratamento 2 – DC + 4,69 mg de Cu, 9,35 mg de Mn e 23,35 mg de Zn/ kg de ração).

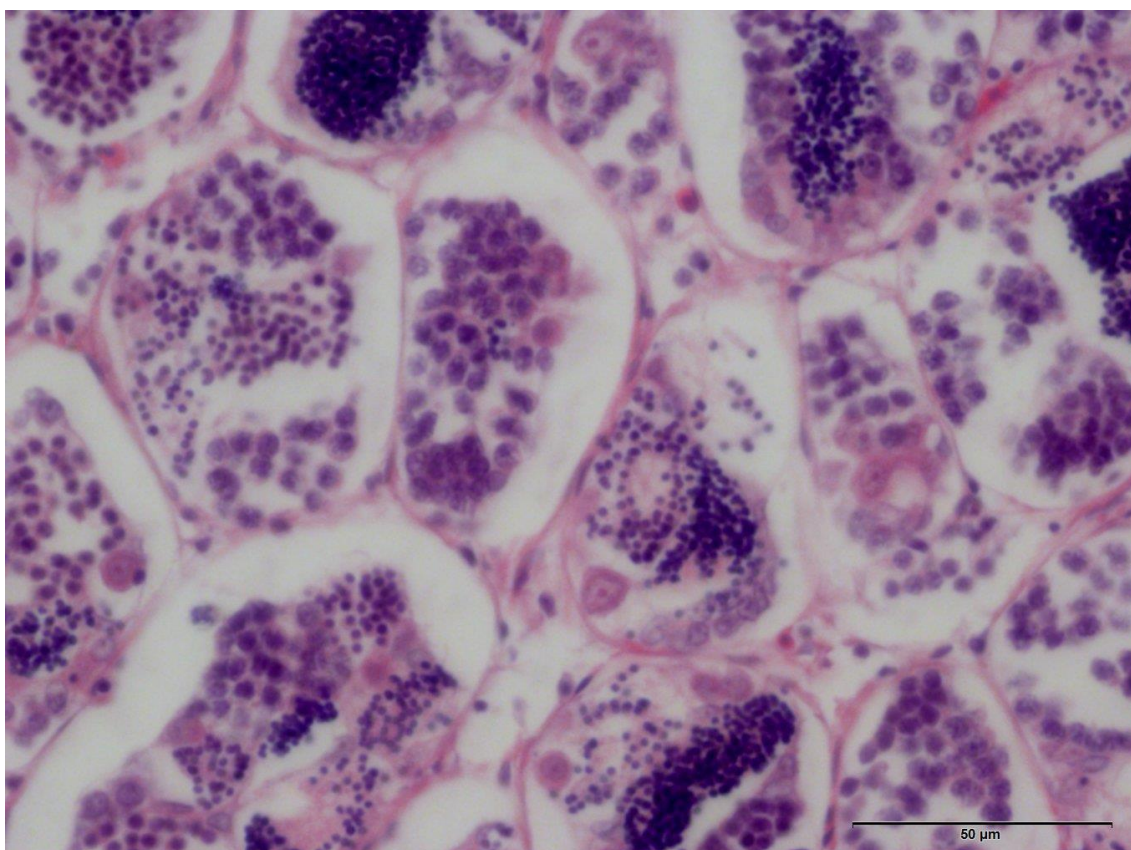


Figura 3. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas, (Tratamento 3 – DC + 9,38 mg de Cu, 18,69 mg de Mn e 46,69 mg Zn/ kg de ração).

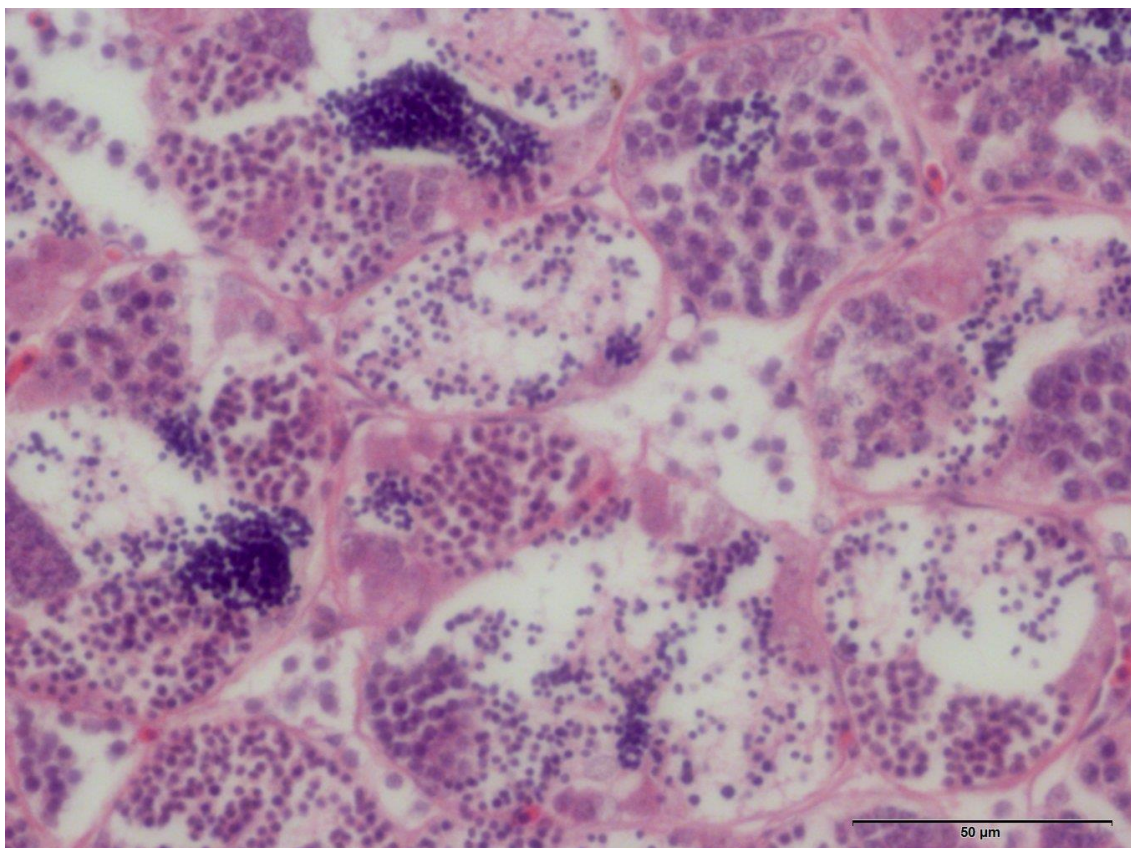


Figura 4. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas, (Tratamento 4 – DC +14,07 mg de Cu, 28,04 mg de Mn e 70,04 mg Zn/ kg de ração).

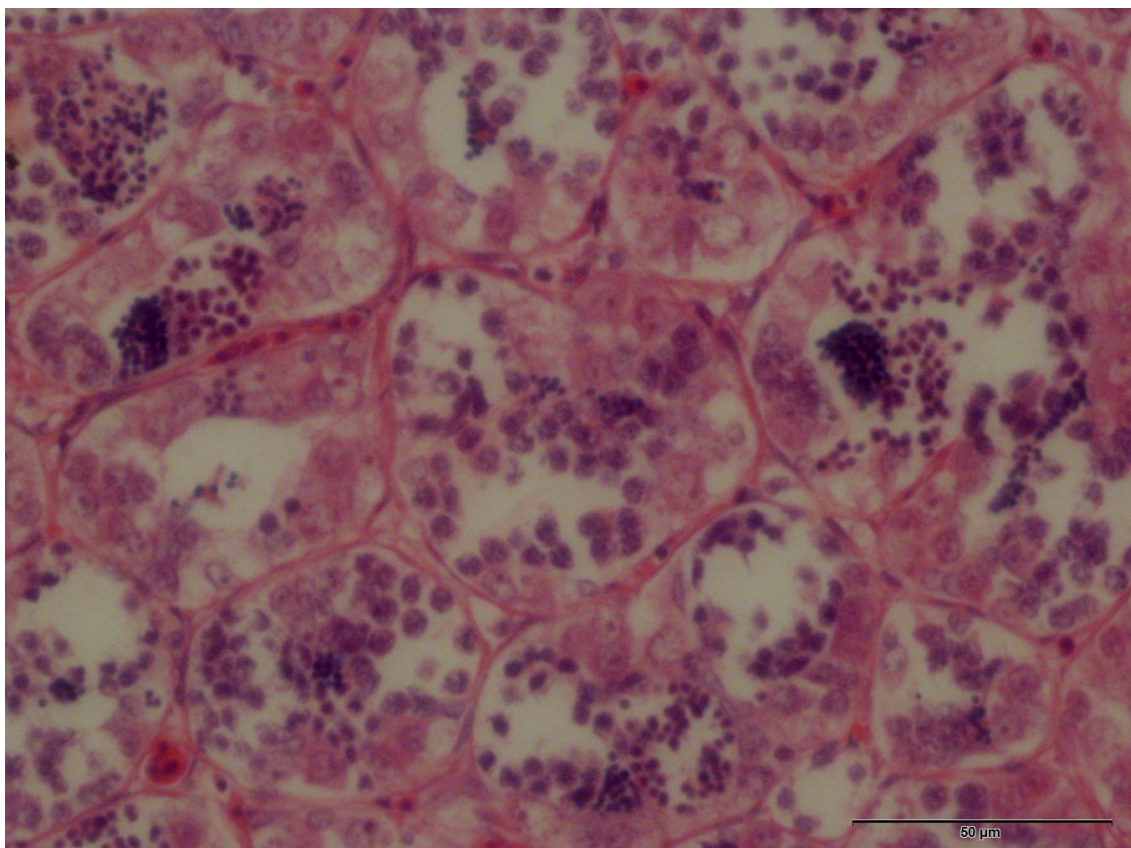


Figura 5. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas, (Tratamento 5 – DC +18,76 mg de Cu, 37,38 mg de Mn e 93,38 mg Zn/ kg de ração).

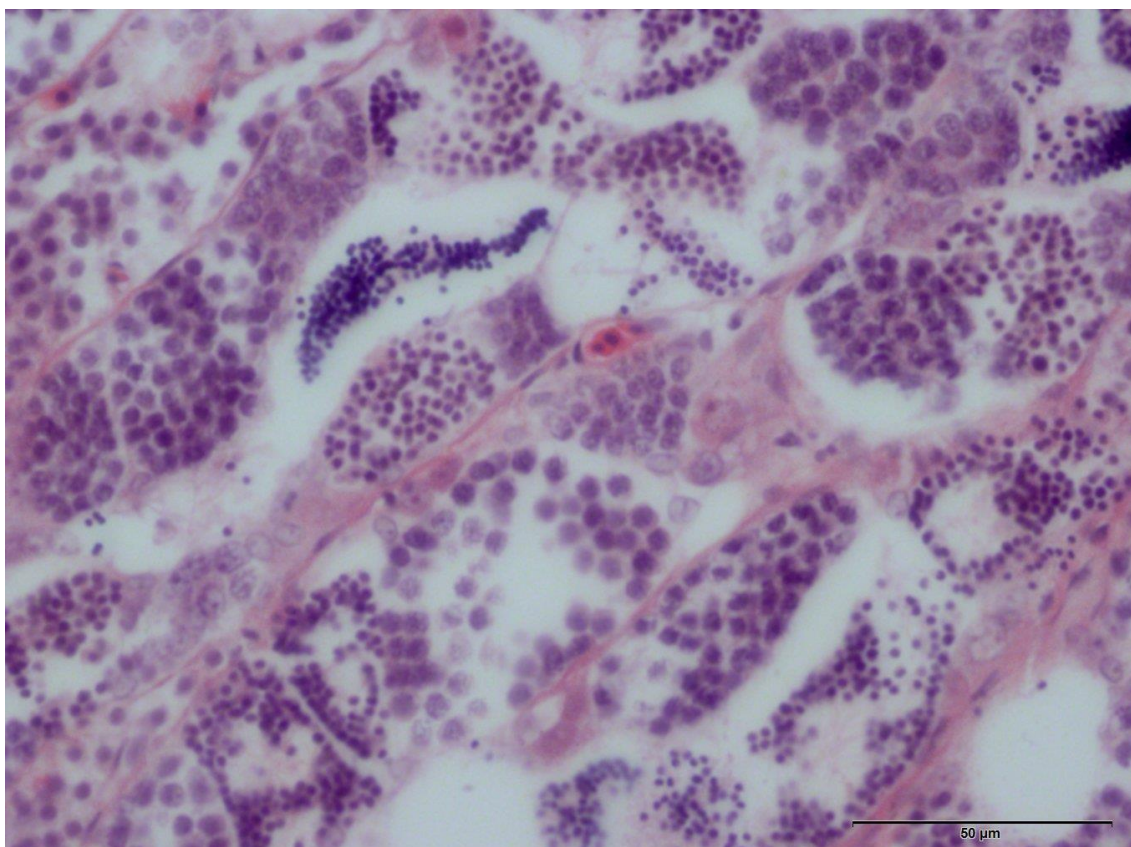


Figura 6. Fotomicrografias das lâminas histológicas, corte de gônada masculina de Tilápia, seções de 6 μm coradas com hematoxilina e eosina, aumento de 40X, coletadas com 32 semanas, (Tratamento 6 – DC + 23,45 mg de Cu, 46,73 mg de Mn e 116,73 mg de Zn/ kg de ração).

VITA

Paula Graziela Lassen, nascida no dia 28 de outubro de 1987, na cidade de Ijuí, filha de Hervê Edebrando Lassen e Rosa Maria Dezordi Lassen. Coursou ensino fundamental e médio no Colégio Estadual de Primeiro e Segundo Graus Antônio Mastella, em Jóia, concluindo seus estudos em 2004. Ingressou no curso de Agronomia, da Universidade Regional do Noroeste do Estado – Unijuí no ano de 2005, interrompendo o curso em 2007 para ingressar no curso de Zootecnia, na Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, onde estagiou nas áreas de nutrição de ruminantes, produção avícola e desenvolvimento de máquinas agrícolas, vindo a graduar em Janeiro de 2012. No mesmo ano ingressou no Programa Especial de Graduação para a Formação de Professores para a Educação Profissional, recebendo o Diploma de licenciatura no ano de 2013. Trabalhou como professora, na rede estadual do Rio Grande do Sul, ministrando as disciplinas de Bovinocultura, Avicultura e Legislação Rural, no ano letivo correspondente á 2013. Ingressou em Abril de 2014 no curso de Mestrado em Produção Animal pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, obtendo bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.