

Histologia do fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado¹

Claucia A. Honorato^{2*}, Claudinei da Cruz³, Dalton J. Carneiro⁴, Márcia R.F. Machado⁵, Camila A. Nascimento⁶ e Klaus C. Saturnino²

ABSTRACT- Honorato C.A., Cruz C., Carneiro D.J., Machado M.R.F., Nascimento C.A. & Saturnino K.S. 2014. [Histology liver in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets with fish silage.] Histologia do fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(Supl.1):64-68. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Hospital Veterinário, Centro Universitário da Grande Dourados, Dourados, MS 79824-900, Brazil. E-mail: clauciahonorato@yahoo.com.br

This study aimed to evaluate possible histopathological liver of tilapia fed diets containing fish silage and level protein. Sample of 180 fed with tilapia fingerlings fed with diets containing three protein levels (20, 24 and 28% CP), and Proportions residue fermented silage of tilapia ($\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{2}$) of were analyzed during 75 days. The tissue fragments were fixed in Bouin and included in Histosec[®]. After that, between 2 to 5 μ m slices were done in a rotation microtome. The methods used for tissue analysis were hematoxilin/eosin and PAS. The histological slices were examined under light microscope (Olympus BX-50). The disarray in the morphology of the liver of fish fed biological silage was influenced by high protein levels, and increased proportions of $\frac{1}{2}$ of animal protein diets. It was observed that the variation of hepatocytes is directly related to the type of diet for fish. In fish fed diets containing 28% CP, the liver showed disruption of the structure cordon of hepatocytes, necrosis and shifting points of the core to the periphery. Elevated levels of biological fish silage cause deleterious changes in the liver. The level of protein required to maintain the health of the associated development fish is 24% crude protein.

INDEX TERMS: Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, liver histology, fish silage, hepatocytes.

¹ Recebido em 6 de junho 2014.

Aceito para publicação em 21 de dezembro de 2014.

² Docente do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário da Grande Dourados (Unigran), Rua Balbina de Matos 2121, Jardim Universitário, Dourados, MS 79824-900, Brasil. E-mail: klaussat@unigran.br *Autor para correspondência: clauciahonorato@yahoo.com.br

³ Docente da Disciplina de Aquicultura, Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (Unifeb), Av. Prof. Roberto Frade Monte, Bairro Aeroporto, Barretos, SP 14783-226, Brasil. E-mail: cruzcl@yahoo.com

⁴ Docente do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. E-mail: daltonjcc@caunesp.unesp.br

⁵ Docente do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV-Unesp, Jaboticabal, SP. E-mail: marcia.machado@fcav.unesp.br

⁶ Médica Veterinária do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Unigran, Dourados, MS. E-mail: camila.vet@hotmail.com

RESUMO.- Este estudo teve como objetivo avaliar as possíveis alterações histopatológicas hepática de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo silagem biológica de pescado com diferentes concentrações protéicas. Foram utilizados 180 juvenis alimentados com dietas contendo três níveis de proteína (20, 24 and 28% PB), e duas proporções de silagem biológica ($\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$) durante 75 dias. Os fragmentos de fígado foram fixados em Bouin e inclusos em Histosec[®]. Posteriormente foram cortados em microtomo com espessura de 2 a 5 μ m. O método utilizado para coloração foi hematoxilina/eosina e PAS. Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz. O desarranjo na morfologia do fígado dos peixes alimentados com silagem biológica foi influenciado pelos altos níveis protéicos, e pelo aumento $\frac{1}{2}$ de proporções de proteínas de origem animal das dietas. Foi observado que a variação dos hepatócitos está diretamente ligada com o tipo da dieta fornecida para

os peixes. Nos peixes alimentados com as dietas contendo 28% PB, o fígado apresentou desarranjo da estrutura cor-donal dos hepatócitos, pontos de necrose e deslocamento do núcleo para periferia. Níveis elevados de silagem biológica de pescado provoca alterações deletérias no fígado. O nível de proteína adequado para manter o desenvolvimento associado à saúde do peixe é de 24%PB.

TERMO DE INDEXAÇÃO: Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, histologia do fígado, silagem biológica de peixe, hepatócitos.

INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) vem se destacando no cenário de produção de peixes de água doce, principalmente pelo ótimo desempenho e rusticidade, a facilidade de obtenção de alevinos, a aceitação no mercado e pela qualidade do seu filé. No entanto, um dos entraves no sistema de produção de organismos aquáticos são os altos custos da alimentação, por isso são constantes as buscas por fontes alternativas de proteína de menores custos e de simples processamentos, que possam substituir a farinha de peixe, a principal fonte de proteína de origem animal utilizada na dieta para peixes (Assano et al. 2011).

Dentre diversos substitutos destaca-se a silagem de peixe como fonte de proteína de origem animal produzido a partir de resíduos de pescado (Honorato et al. 2013). Considerando que o processamento de peixe produz diariamente uma grande quantidade de resíduos que geram um problema de poluição ambiental, faz-se indispensável uma alternativa de processamento destes subprodutos. O potencial da silagem de peixe como produto alternativo foi demonstrado para organismos aquáticos sem proporcionar efeitos deletérios ao crescimento (Abimorad et al. 2009). No entanto, a nível de inclusão e o teor de proteína da dieta contendo este ingrediente requer atenção devido a bio-disponibilidade do produto. Excesso ou escassez de proteína são prejudiciais ao organismo podendo resultar em aparecimento de patologias. (Honorato et al. 2013). O fígado é um órgão considerado crucial para o metabolismo de nutrientes, sendo considerado ótimo indicador para patologias nutricionais (Fujimoto et al. 2008, Rašković et al. 2011).

Entre as funções hepáticas mais importantes, destacam-se a formação de proteínas plasmáticas, a desaminação de proteínas, a formação de uréia para remoção de amônia como efeito detoxificante e a síntese de certos aminoácidos (Honorato et al. 2013). Assim, Uma disfunção hepática grave, que pode ser causada por várias etiologias, e ocorrendo por períodos considerados longos, pode propiciar um quadro irreversível (Rašković et al. 2011), com evidente diminuição da taxa de crescimento, e a morte do animal. Portanto, o conhecimento da morfo-histologia do fígado de peixes de interesse comercial é de grande importância para a compreensão de alterações neste órgão, seja patológicas, relacionadas à doenças infecciosas, seja proporcionadas por sobrecarga ou deficiência de nutrientes nas dietas administradas (Honorato et al. 2013).

Este estudo teve como objetivo descrever as alterações histopatológicas hepática de tilápias do Nilo alimentadas

com dietas contendo silagem biológica de pescado com diferentes níveis de protéicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas as alterações histopatológicas no fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo três níveis de proteína bruta (20, 24 e 28% PB) (Quadro 1), sendo que cada nível apresentou duas proporções de silagem biológica de pescado ($\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{2}$ PB). As dietas foram denominadas: D01 = 20%PB $\frac{1}{4}$ SP, D02 = 20%PB $\frac{1}{2}$ SP, D03 = 24%PB $\frac{1}{4}$ SP, D04 = 24%PB $\frac{1}{2}$ SP, D05 = 28%PB $\frac{1}{4}$ SP, D06 = 28%PB $\frac{1}{2}$ SP. O ensaio foi conduzido utilizados 180 alevinos de tilápia com o peso médio inicial de $1,17 \pm 0,05$ g, distribuídos em 18 aquários de 150L, abastecidos continuamente com água proveniente de poço artesiano, com renovação de 20 vezes ao dia e aeração constante, por um período de 75 dias. A qualidade da água apresentou as médias de oxigênio dissolvido de $5,70 \pm 0,2$ mg de O_2 L⁻¹, temperatura de $29,27 \pm 1,20$ °C, pH de $7,95 \pm 0,03$ e condutividade de $127,17 \pm 0,04$ µs/cm. A qualidade da água manteve-se dentro dos padrões para o cultivo de peixes neotropicais, relatados por Sipaubá-Tavares (1995).

Para a produção de silagem biológica de pescado foram utilizados resíduos de filetagem de tilápia (cabeça, vísceras, restos de musculatura, espinhas, pele, escamas e nadadeiras), previamente moídos, e adicionados à matéria prima, 15% (p/p) de melado de cana-de-açúcar, 5% (p/p) de *Lactobacillus plantarum* e 0,25% (v/v) de ácido sórbico (Assano et al. 2011), sendo armazenada por 30 dias. As rações foram peletizadas em máquina de moer carnes (California Pellet Mill) do Centro de Aquicultura da Unesp e posteriormente, os pellets foram secos, e conservados em freezer para o fornecimento durante o período experimental. O arçaoamento foi fornecido à vontade, duas vezes ao dia (manhã e tarde) em pequenas quantidades até a saciedade aparente.

No final do período experimental, três peixes foram pesados e anestesiados em bezocaína (100mg/L) até completa perda dos sentidos, e sacrificados por transecção medular sendo estes retirado o fígado para as avaliações hitológicas (Comitê de técnicas de biosegurança e ética: Processo 104/11).As amostras de fígado foram fixadas em solução de Bouin, por 24horas, procedeu-se à lavagem em álcool 70% para desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em série de xilóis, inclusão em Histosec e

Quadro 1. Formulação e composição das dietas experimentais

Ingredientes (%)	D ₀₁	D ₀₂	D ₀₃	D ₀₄	D ₀₅	D ₀₆
Silagem de peixe	11,1	22,1	13,3	26,5	15,5	31
Milho moído	46,9	52,2	52,5	51,7	41,4	40,8
Farelo de soja	14,7	5,0	27,7	14,1	36,4	20,6
Farelo de trigo	21,3	15,0	-	2,0	-	2,0
Quirera de arroz	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de soja	0,4	-	0,9	-	1,1	-
Suplemento vitamínico ^a	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Suplemento mineral ^b	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Composição analisada ^c						
Matéria seca (%)	93,3	94,4	93,1	94,7	93	95
Proteína bruta (%)	20	20	24	24	28	28
Extrato etéreo (%)	4,5	4,9	4,5	4,7	4,5	4,6
Energia bruta (kcal.kg ⁻¹)	4209	4184	4249	4202	4289	4230

^aComposição do suplemento mineral para 1kg de ração: Ferro = 1500mg, Cobre = 5000mg, Iodo = 500mg, Manganês = 17000mg, Zinco = 12000mg, Selênio = 70mg, veículo 1000g. ^bComposição do suplemento vitamínico para 1kg de ração: Vitamina A = 12000 UI, Vitamina D₃ = 1500 UI, Vitamina E = 50mg, Vitamina K = 4mg, Vitamina B₁₂ = 7mg, Ácido Pantotênico = 60mg, Ácido Nicotínico = 120mg, Cloreto de Colina = 600mg, Metionina = 700mg, veículo = 1000g. ^cCom base na composição analisada dos ingredientes.

cortados em espessura variando de 5 a 7µm de espessura. Para a coloração utilizada foi Hematoxilina-Eosina (HE). Os cortes histológicos foram analisados e fotomicrografados com fotomicroscópio Axioskop- Zeiss. Ao microscópio de luz (Olympus BX-50) foram observadas suas estruturas e alterações microscópicas.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos em esquema fatorial 3x2, correspondendo a três níveis de proteína bruta (20, 24 e 28%), duas proporções de silagem biológica de pescado ($\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{2}$), com três repetições. Quando a análise de variância indicou diferenças significativas entre tratamentos ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Tukey.

RESULTADOS

Os valores de ganho em peso de tilápia do Nilo alimentadas com dietas de diferentes níveis de proteína e inclusão de silagem de pescado estão apresentados na Figura 1. O aumento de inclusão de silagem biológica proporcionou maior crescimento dos peixes alimentadas com os níveis de 24 e 28% de PB.

O fígado de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo silagem biológica de pescado, caracterizou-se por apresentar distribuição cordonal dos hepatócitos e os sinusóides apresentaram-se revestidos com células endoteliais. Os hepatócitos apresentavam citoplasma claro com núcleo central e formato arredondado e em algumas regiões deslocado para a periferia da célula (Fig.2).

No tratamento com 20% PB as alterações histológicas hepáticas apareceram apenas no maior nível de inclusão de silagem biológica ($\frac{1}{2}$). Neste tratamento o fígado manteve arranjo cordonal dos hepatócitos normal, similar ao observado nos tratamentos com $\frac{1}{4}$ silagem biológica, porém com congestão multifocal de sinusóides (Fig.2b).

Nos tratamentos com 24%PB somente apresentaram alterações os peixes suplementados com $\frac{1}{2}$ de silagem biológica. Os peixes alimentados com essa dieta apresentaram hepatócitos de formato levemente arredondado com citoplasma claro (baixa acidofilia) e, somente em algumas regi-

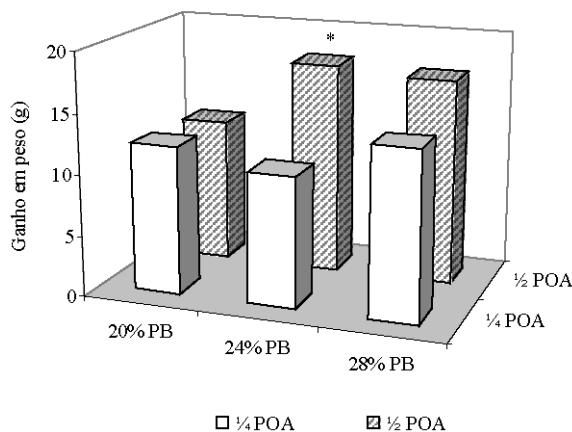


Fig.1. Ganho de peso de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo silagem de pescado com diferentes concentrações protéicas. D01 = 20%PB $\frac{1}{4}$ SP, D02 = 20%PB $\frac{1}{2}$ SP, D03 = 24%PB $\frac{1}{4}$ SP, D04 = 24%PB $\frac{1}{2}$ SP, D05 = 28%PB $\frac{1}{4}$ SP, D06 = 28%PB $\frac{1}{2}$ SP, sendo PB = proteína bruta, SP = silagem de peixe.

ões o núcleo deslocado para a periferia da célula. O arranjo cordonal dos hepatócitos normal, mas em algumas células apresentaram baixa concentração de glicogênio intracitoplasmático (Fig.2C,D).

Nos peixes alimentados com as dietas contendo 28% PB, o fígado apresentou desarranjo da estrutura cordonal dos hepatócitos, pontos de necrose e deslocamento do núcleo para periferia (Fig.2E). Os peixes alimentados com a dieta com $\frac{1}{2}$ de silagem biológica apresentaram pontos de congestão (Fig.1F).

DISCUSSÃO

O aumento da inclusão de silagem na dieta proporcionou as melhores médias de ganho em peso quando a dieta possuía 24 e 28% de PB. A inclusão de silagem de peixe na alimentação de organismos aquáticos foi reportada por Assano et al. (2011), observaram que este produto pode ser utilizado com êxito como fonte de proteína de origem animal para tilápia do Nilo o que ressalta a qualidade do produto além de representar um método alternativo de baixo custo.

O ganho em peso foi superior para as dietas contendo maior proporção de silagem biológica o que pode ser atribuída a melhora no perfil de aminoácidos da dieta. Neste contexto de suplementação com produtos de origem animal, Boscolo et al. (2010) ressalta que estes possuem substâncias palatilizantes o que estimula o consumo do alimento. Os resíduos de filetagem de tilápia já foram testados na forma de silagem ácida para tilápia do Nilo que não encontraram diferenças para os parâmetros de desempenho produtivo (Abimorad et al.2009). Entretanto, poucos são os estudos referentes a inclusão de silagem biológica e seus efeitos na saúde do peixe.

A utilização de novos ingredientes que substitua a farinha de peixe na alimentação de organismos aquáticos faz-se indispensável, pela escassez do produto (Assano et al. 2011). Os alimentos com potencial para alimentação devem ser testados quanto ao nível de inclusão e seus efeitos na saúde dos peixes. O fígado é um órgão considerado crucial para o metabolismo de nutrientes, sendo considerado ótimo indicador para patologias nutricionais (Rašković et al. 2011).

As células hepáticas da tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo 20% de PB apresentaram hepatócitos poliedral com núcleo centralizado o que corrobora com os dados de *Piaractus brachypomus* (Palacios et al., 2006) e estão de acordo com as descrições realizadas para o pacu (Fujimoto et al. 2008). As dietas com 24 e 28% de proteína bruta a inclusão de $\frac{1}{2}$ de silagem biológica afetaram em diferentes graus a estrutura hepática da tilápia do Nilo.

A utilização de $\frac{1}{2}$ de inclusão de silagem biológica nas dietas para tilápia do Nilo, promoveu alterações sutis na estrutura hepática semelhantes às observadas por Toledo (2004), utilizando diferentes relações carboidratos e lipídios para a mesma espécie. O autor descreve que as células com citoplasma fracamente eosinofílicos, mas com núcleos centrais, são indicativos de atividade metabólica normal.

As alterações observadas no fígado de tilápia alimentadas com dieta contendo 28%PB, são indicativos de sobrecarga do órgão. As modificações observadas no fígado

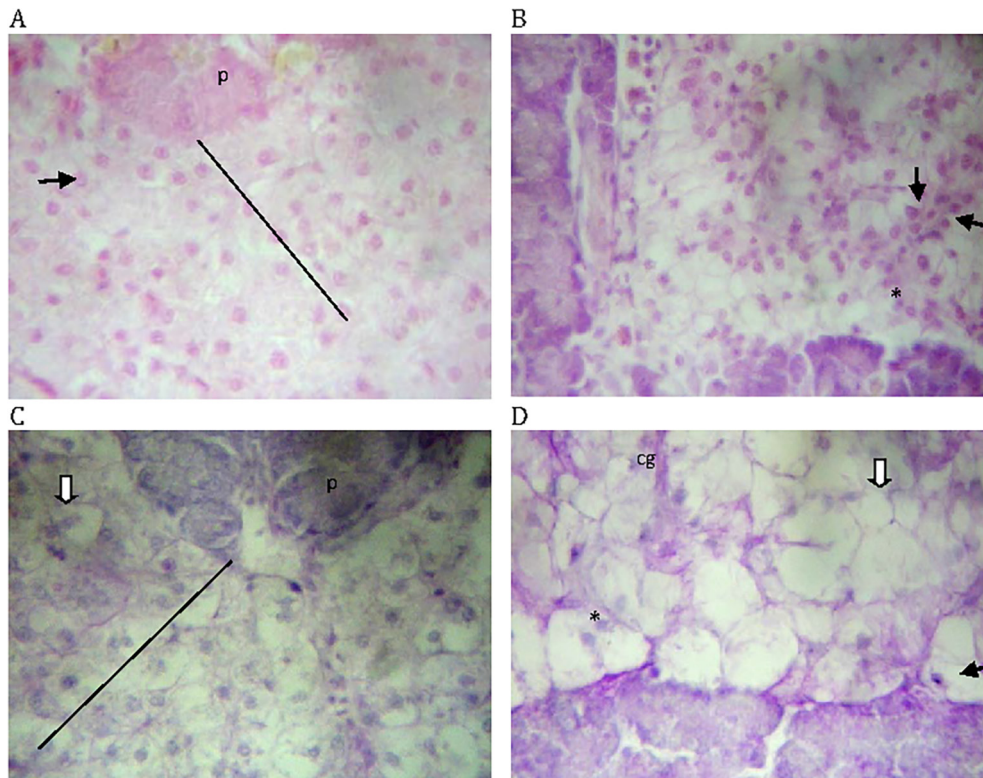


Fig.2. Fígado de tilápia. (A) Tratamento D01 = 20%PB e $\frac{1}{4}$ silagem biológica. Detalhe do fígado sem alterações histopatológicas com pâncreas difuso no tecido hepático(p), Arranjo cordonal dos hepatócitos (traço fino), núcleo centralizado (seta). HE, obj.20x. (B) Tratamento (D04) com 24% PB $\frac{1}{2}$ silagem biológica. Aumento do volume celular com deslocamento do núcleo para periferia (seta), fusão celular dos hepatócitos (*).HE, obj.20x. (C) Tratamento com 28%PB $\frac{1}{4}$ silagem biológica. Desarranjo da estrutura cordonal (traço fino), hiperplasia (seta grossa). PAS, obj.20x, (D) Tratamento com 28%PB $\frac{1}{2}$ silagem biológica. Presença congestão sanguínea (cg), hiperplasia (seta grossa), deslocamento do núcleo para periferia (seta) no fígado. HE, obj.20x.

como esteatose hepática, fígado pálido e deposição de glicogênio em excesso podem ser atribuídas ao metabolismo de degradação das proteínas (transaminação) (Honorato et al. 2013). O excesso de proteína ofertada na dieta pode proporcionar diminuição do consumo e do crescimento devido sua utilização para fins energéticos, aumentando a excreção de amônia (Almeida et al. 2011).

Entre as principais estratégias para otimizar a nutrição de organismos aquáticos está a inclusão cuidadosa de fontes energéticas como os carboidratos e os lipídeos nas dietas, que podem promover o efeito poupador de proteína (Honorato, Almeida e Moraes, 2013). Níveis inadequados de proteína na dieta demandam aumento no nível de energia para metabolizá-las, sendo o excesso armazenado como gordura após desaminação, promovendo sobrecarga as funções do fígado (Almeida et al. 2011).

Diferenças no formato e tamanho dos hepatócitos assim como no núcleo estão associados a patologias hepáticas e a atividade metabólica das células do fígado (Rašković et al. 2011). A migração do núcleo do hepatócito foi reportada para peixes alimentados com níveis crescentes de lipídeos na dieta (Wassef et al. 2007) sendo esta atribuída ao processo de lesão das células hepáticas pelo acúmulo de gordura. Por outro lado Caballero et al. (2004) também obser-

vou migração do núcleo do hepatócitos em *Spaurus aurata* alimentados com 22% de lipídeos, porém ressaltou que estas não apresentavam implicações patológicas por serem reversíveis. A variação no tamanho do hepatócito e do seu núcleo em resposta à variação ocorrida na dieta também foi evidenciada por Ostaszewska et al. (2005) em *Piaractus mesopotamicus* submetido a dietas com diferentes fontes de proteína.

Alterações morfológicas no fígado podem ser provocadas por substâncias químicas, drogas e até mesmo pela alimentação desbalanceada, as quais são importantes causas de adaptações, lesão e até morte celular. O fígado é um órgão altamente suscetível às mudanças no estado nutricional de peixes, e a qualidade da dieta interfere diretamente na sua estrutura histo-morfo funcional (Bruslé & Anadon 1996). Em suma o exame histológico do tecido hepático de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de proteína e inclusões de silagem biológica demonstraram algumas mudanças importantes que podem ser atribuídas a dieta ofertada. Ressalta-se a importância desta avaliação no estudo de alimentos e níveis de nutrientes para espécies de peixes devido as mudanças histológicas que são detectada precocemente aos efeitos deletérios de sobrevivência e crescimento. Sendo assim as patologias hepáticas passíveis

de ser utilizadas como critério preliminar de avaliação de alimentação (Rašković et al. 2011).

CONCLUSÕES

Níveis elevados de silagem biológica de pescado ($\frac{1}{2}$) provocam alterações deletérias no fígado de tilápia do Nilo, sendo seu uso recomendado de $\frac{1}{4}$ da proteína da dieta.

O nível de proteína adequado para manter o desenvolvimento e à saúde do peixe é de 24%PB.

REFERÊNCIAS

- Abimorad E.G., Strada W.L., Schalch S.H.C., Garcia F., Castellani D. & Manzatto M.D.R. 2009. Silagem de peixe em ração artesanal para tilápia-do-Nilo. *Pesq. Agropec. Bras.* 44(5):519-525.
- Almeida L.C., Avilez I.M., Honorato C.A. & Moraes G. 2011. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed diets level of protein and lipid. *Aqua. Nutr.* 17:283-262.
- Assano M., Muñoz Ramirez A.P., Stech M.R., Honorato C.A., Malheiros E.B. & Carneiro D.J. 2011. Desempenho de tilápia-do-Nilo cultivadas em viveiros alimentadas com diferentes fontes e níveis protéicos. *Ensaios e Ciência* 15(5):81-90.
- Boscolo W.R., Signor A.A., Coldebella A., Bueno G.W. & Feiden A. 2010. Rações orgânicas suplementadas com farinha de resíduos de peixe para juvenis da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revta Ciênc. Agron.* 41(4):686-692.
- Bruslé J. & Anadon G.G. 1996. The structure and function of fish liver, p.77-93. In: Munshi J.S.D. & Dutta H.M. (Eds.), *Fish Morphology*. Oxford and IBH Publishing Co., PVT Ltd, New Delhi.
- Caballero M.J., Izquierdo M.S., Kjorsvik E., Fernandez A.J. & Rosenlund G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *J. Fish Dis.* 27:531-541.
- Fujimoto R.Y., Cruz C. & Moraes F.R. 2008. Análise de efluente e histologia da pele, fígado e rim de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente. *Bolm Inst. Pesca, São Paulo*, 34(1): 117-124.
- Honorato C.A., Assano M., Cruz C., Carneiro D.J. & Machado M.R.F. 2013. Histologia do intestino de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína. *Nucleus Animalium* 5(1):85-92.
- Honorato C.A., Almeida L.C. & Moraes G. 2013. Processamento de dieta: seus efeitos no aproveitamento de carboidrato para peixes. *Revta Eletrôn. Nutritime* 10(5):2700-2715.
- Ostaszewska T., Dabrowski K., Czumińska K., Olech W. & Olejniczak M. 2005. Rearing of pike-perch larvae using formulated diets-first success with starter feeds. *Aquacult. Res.* 36(12):1167-1176.
- Palacios M.E., Dabrowski K., Abiado M.A.G., Lee K.J. & Kohler C.C. 2006. Effect of diets formulated with native Peruvian plants on growth and feeding efficiency of red pacu (*Piaractus brachypomus*) juveniles. *J. World Aquacult. Soc.* 37(3):246-255.
- Rašković B.S., Stanković M.B., Marković Z.Z. & Poleksić V.D. 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *J. Agricult. Sci.* 56(1):87-100.
- Toledo M.P. 2004. Processamentos de dietas práticas com diferentes fontes de energia para o crescimento e a digestibilidade da tilápia do Nilo. Tese de Doutorado em Aquicultura, Centro de Aquicultura da Unesp, São Paulo, SP. 98p.
- Wassef E.A., Wahby O.M. & Sakr E.M. 2007. Effect of dietary vegetable oils on health and liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*) growers. *Aquacult. Res.* 38(8):852-861.