

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**METIONINA E COLINA EM DIETAS PARA JUVENIS DE
TILÁPIA-DO-NILO, DESEMPENHO PRODUTIVO,
MORFOLOGIA HEPÁTICA E MUSCULAR**

Autora: Thêmis Sakaguti Graciano
Orientador: Wilson Massamitu Furuya

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**METIONINA E COLINA EM DIETAS PARA JUVENIS DE
TILÁPIA-DO-NILO, DESEMPENHO PRODUTIVO,
MORFOLOGIA HEPÁTICA E MUSCULAR**

Autora: Thêmis Sakaguti Graciano
Orientador: Wilson Massamitu Furuya

“Dissertação apresentada, como parte da exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de - Área de Concentração Produção Animal”

MARINGÁ
Estado do Paraná
Maio – 2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

G731m Graciano, Thêmis Sakaguti
Metionina e colina em dietas para juvenis de
tilápia do Nilo, desempenho produtivo, morfologia
hepática e muscular / Thêmis Sakaguti Graciano. --
Maringá : [s.n.], 2009.
58 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Área de concentração: Produção animal. 2009.

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Aminoácidos na nutrição
animal. 3. Tilápia (Peixe) - Morfologia do fígado.
4. Vitaminas na nutrição animal. I. Universidade
Esatadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. II. Título.

CDD 21.ed.597.74

“Tenho apenas duas mãos e o sentimento do mundo”.

Carlos Drummond de Andrade

A minha mãe,

Eliza Satie Sakaguti Graciano,

exemplo de vida, meu braço direito e esquerdo,
pelo amor, carinho, incentivo e formação de caráter.

Ao meu pai,

Valmir Graciano,

Meu protetor, minha fortaleza,
pelo incentivo e suporte para que eu pudesse estudar e realizar meus sonhos,
pela confiança, respeito, amor e carinho.

As minhas irmãs,

Thaís Yúrica Sakaguti Graciano e Ticiane Sakaguti Graciano,

pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos,

Michelly Vaz, Raphael Vicenzo, Odílio Poppi e Maricy Alexandrino,

que me proporcionaram muitas alegrias ao longo destes anos,
pela companhia, afeto e confiança.

O meu amor e gratidão,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, eterna gratidão.

Ao professor Dr. Wilson Massamitu Furuya, pela orientação, ensinamentos, amizade, confiança e pelo incentivo a trabalhar com afinco e dedicação.

A professora Dr^a Maria Raquel Marçal Natali, gratidão imensa, pela co-orientação, ensinamentos, ajuda, paciência e atenção.

Ao professor Dr. Celso Ivan Conegero pela ajuda e cooperação na realização da coleta e processamento do tecido muscular, pela atenção e ensinamentos.

Aos colegas de mestrado, Luiz Vitor Vidal, José Sérgio Righetti, Mariana Michelato e Tadeu Xavier, imensa gratidão pela ajuda, dedicação, amizade e trabalho em equipe

Aos estagiários Marcos Vinícius Amaral, Leonardo Dantas Gongora, Marilize Bittencourt e Débora Deboux, pela dedicação, auxílio e participação, que foram essenciais para conclusão deste trabalho

As técnicas do Laboratório de Histologia, Maria dos Anjos e Eurides, pela atenção, confiança, ajuda e carinho

Aos integrantes do Laboratório de Análise de Alimentos (LANA) por ter possibilitado a análise química das amostras coletadas.

Ao Rafael Marzall do Amaral, pela ajuda, incentivo, atenção e carinho

A todas as pessoas que auxiliaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

Thêmis Sakaguti Graciano, filha de Valmir Graciano e Eliza Satie Sakaguti Graciano, nasceu em Paranaíba, Paraná, no dia 21 de maio de 1981.

Em março de 1999, iniciou o curso de Graduação em Medicina Veterinária, no Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, concluindo-o em dezembro de 2003.

No ano de 2004 iniciou o curso de Pós-graduação em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais pela Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, Curitiba, Paraná, concluindo-o em 2006.

Em março de 2007, iniciou o curso de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Peixes.

Nesta data submete-se à banca examinadora para defesa da dissertação de mestrado, no Programa de Pós-graduação de Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELA.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.Tilápia do Nilo.....	1
2.Colina.....	2
3.Metionina.....	5
4. Interação Metionina e Colina.....	7
5.Fígado.....	8
5.1.Papel do fígado no metabolismo de lipídios.....	12
6.Tecido Muscular Esquelético.....	15
6.1.Músculo Vermelho.....	16
6.2.Músculo Branco.....	17
6.3.Crescimento Pós-Natal do Músculo.....	18

7. Literatura Citada.....	20
OBJETIVOS GERAIS.....	24
ARTIGO - Metionina e colina em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo sobre o desempenho produtivo e morfologia hepática e muscular.....	25
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	30
Resultados e Discussões.....	36
Conclusões.....	51
Literatura citada.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
ARTIGO - Metionina e Colina em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo sobre o desempenho produtivo e morfologia hepática e muscular	
Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	32
Tabela 2. Valores médios de desempenho e composição química do filé da tilápia-do-nilo alimentada com as dietas experimentais.....	36
Tabela 3. Frequência de ocorrência de lesões hepáticas na avaliação macroscópica do fígado da tilápia-do-nilo em função dos tratamentos.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	
Figura 1 Forma molecular da colina; três grupos metil.....	3
ARTIGO - Metionina e Colina em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo sobre o desempenho produtivo e morfologia hepática e muscular	
Figura 2 Morfologia hepática de tilápia-do-nilo. I: hepatopâncreas (H) associado à veia (V) e ducto (D), melano-macrófago (seta), 400X. J: espaço porta (EP) – tríade de veia (V), artéria (A) e ductos (D) associados ao hepatopâncreas (H), 200X. K: hepatopâncreas associado a ducto e veia (H ₁), hepatopâncreas associado à veia porta (H ₂), 100X. L: veias centrolobulares (VC), 400X. M: melano-macrófagos (setas) ao redor da veia centrolobular, 400X. N: melano-macrófagos (seta) no interior da veia centrolobular, 400X. HE.....	44
Figura 3. Morfometria da área glicogênica e lipídica pelas técnicas histoquímicas P.A.S. e Sudan III, respectivamente, do tecido hepático da tilápia-do-nilo alimentada com as dietas experimentais sem ou com metionina e/ou colina. Na mesma linha, médias com letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05); Teste de Tukey Dieta CL= controle; MT= DL-metionina; CL = Cloreto de colina e MT + CL = DL-metionina + Cloreto de colina.....	46

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
<p>Figura 4 Morfologia hepática de tilápia-do-nilo. A: hepatopâncreas (H) associado à veia (V) e ducto (D), melano-macrófago (seta), 400X. B: espaço porta (EP) – tríade de veia (V), artéria (A) e ductos (D) associados ao hepatopâncreas (H), 200X. C: hepatopâncreas associado a ducto e veia (H₁), hepatopâncreas associado à veia porta (H₂), 100X. D: veias centrolobulares (VC), 400X. E: melano-macrófagos (setas) ao redor da veia centrolobular, 400X. F: melano-macrófagos (seta) no interior da veia centrolobular, 400X. HE.....</p>	56
<p>Figura 5 Tecido hepático de tilápia-do-nilo. A: histoquímica P.A.S. para evidenciação de inclusões glicogênicas (cor vinho, seta). B: técnica histoquímica Sudan III para evidenciação de inclusões lipídicas (cor laranja, seta). C e D: imagem do campo microscópico avaliado para as técnicas histoquímicas P.A.S. e Sudan III, respectivamente, subtraída da área ocupada pela veia centrolobular (A).....</p>	57
<p>Figura 6 Músculo branco de tilápia-do-nilo. A: músculo dorsal. B: amostra de tecido muscular congelado em nitrogênio líquido. C: Cortes transversais das fibras musculares brancas, visão geral. D: mensuração do menor diâmetro da célula muscular pelo programa analisador de imagens Image Pro-Plus 4.5.1[®]. HE, 100X....</p>	58

RESUMO

O trabalho foi realizado para avaliar os efeitos da metionina e/ou colina sobre o desempenho produtivo, morfologia do fígado e do músculo branco da tilápia-do-nilo, da linhagem *Supreme*. Foram utilizados 160 peixes com peso vivo médio inicial de $77 \pm 0,8$ g, distribuídos em 16 tanques (1000 L cada) com 10 peixes/tanque, em sistema de recirculação, durante 87 dias. Foram utilizadas quatro rações com 33% PB e 3.000 kcal ED kg^{-1} de ração: controle (CT); com suplementação de 0,3% de metionina (MT); 0,2% de colina (CL) e, 0,3% de metionina e 0,2% de colina (MT+CL). Os peixes foram alimentados com dietas peletizadas, manualmente até consumo voluntário. Os fígados foram analisados e caracterizados macroscopicamente e microscopicamente através da coloração do parênquima hepático com Hematoxilina-Eosina e, histoquímica para evidenciação glicogênica (P.A.S.) e lipídica (Sudan III). Amostras de músculo branco da região dorsal foram utilizadas para avaliação morfológica e morfometria do menor diâmetro da célula. Não foi observado efeito do fornecimento de metionina e/ou colina na dieta sobre o ganho de peso diário, conversão alimentar, rendimento de filé, índice hepatossomático e gordura visceral. Os peixes alimentados com dietas suplementadas com colina e metionina apresentaram menor teor de gordura nos filés. Os peixes alimentados com as dietas CL e MT+CL apresentaram maior acúmulo de inclusões glicogênicas e menor de inclusões lipídicas no tecido hepático, em relação aos peixes do tratamento CT e MT. A suplementação de colina e/ou metionina não afetou o diâmetro da fibra muscular branca dos peixes. Concluiu-se que a suplementação de colina e/ou metionina não afeta o desempenho produtivo, mas a colina possui ação importante na utilização do lipídio hepático, evidenciado pela redução de inclusões lipídicas.

Palavras-chave: aminoácido, fígado, músculo, peixe, vitamina

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of methionine and / or choline on performance, morphology of liver and white muscle of Nile tilapia, *Supreme* strain. One-hundred and sixty fish with average weight of 77 ± 0.8 g were distributed in 16 tanks (1000 L each) with 10 fish/tank, in a recirculation system, during 87 days. Four diets with 33% CP and 3,000 kcal DE kg⁻¹ were used: control (CT), supplemented with 0.3% methionine (MT), 0.2% of choline (LC) or 0.3% of 0.2% of methionine and choline (MT + CL). Fish were fed were hand fed until apparent satiation. Livers were macroscopically and microscopically examined and characterized by staining of hepatic parenchyma with Hematoxilin-Eosin, and for inclusion glycogenic histochemistry (P.A.S.) and lipid (Sudan III). Samples of white muscle of dorsal region were used for morphological and morphometric evaluation of the minor diameter of the cell. No effects of methionine and/or choline on daily weight gain, feed conversion, fillet yield, hepatosomatic index, visceral fat and white muscle fiber diameter were observed. Fish fed diets supplemented with choline and methionine showed lower fat content in the fillets. Fish fed CL and CL+MT showed higher glycogenic inclusion and lower lipidic inclusion in the liver, compared to fish fed CT and MT diets. It was concluded that choline supplementation reduces lipid inclusion in the liver and fatty degeneration occurs in fish fed CT and MT diets.

Keywords: amino acid, fish, liver, muscle, vitamin

I – INTRODUÇÃO GERAL

1. Tilápia do Nilo

As tilápias pertencem à família *Cichlidae*, nativas da África. Esta espécie foi amplamente difundida pelo mundo, por vários séculos, principalmente em países de clima tropical ou subtropical, introduzidas deliberadamente ou acidentalmente. Somente na década de 20 e 50 passaram a ser criadas de forma intensiva. Encontram-se descritas 77 espécies de tilápias, sendo que 22 têm sido criadas em escala experimental e/ou comercial (Ribeiro, 2001).

No Brasil, a tilápia do Nilo foi introduzida na região nordeste em 1971, originária da Costa do Marfim no Oeste africano, e a partir daí foi distribuída em todo território, sendo cada vez mais, melhorada geneticamente. É uma das espécies que mais se adaptou ao nosso clima (El-Sayed, 2006), sendo criada desde a bacia do rio Amazonas até o Rio Grande do Sul. O interesse na criação de tilápia cresceu rapidamente na década de 90, devido à introdução da tecnologia de reversão sexual para produzir populações somente de machos. A possibilidade de produzir peixes para pesque-pague e indústrias de filetagem no Sul e Sudeste por um preço alto também contribuiu para o desenvolvimento da tilapicultura (Lovshim, 2002).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de tilápia do Nilo da América do Sul, seguido respectivamente, por Colômbia e Equador, os três, totalizando em 2006, 98,5% deste continente (FAO, 2008). Sua criação é bastante promissora devido às

características de rápido crescimento, precocidade e rusticidade e por possuir carne com boas características organolépticas e possibilidade de comercialização de filés sem espinhos intramusculares (Degani & Revach, 1991).

De hábito alimentar onívoro, consome ração logo após o início da alimentação exógena e utilizando eficientemente os carboidratos como fonte de energia (Degani & Revach, 1991; Tengjaroenkul et al., 2000), o que permite reduzir os custos com a alimentação (Pezzato et al., 2002). Utilizam eficientemente os alimentos de origem vegetal (Pezzato et al., 2001), uma vez que possuem adaptações morfológicas e fisiológicas como dentes faríngeos, pH estomacal ácido e intestino longo (Kubarik, 1997). A atividade enzimática no intestino delgado permite a assimilação de polipeptídeos de forma semelhante aos peptídeos de cadeia curta (Tengjaroenkul et al., 2000).

No Brasil, a criação de tilápias dessa espécie passou do sistema tradicional em tanques de terra para a criação intensiva, principalmente em tanques-rede, pela disponibilidade de uma extensa área alagada apropriada, uma alternativa para produção intensiva para os mercados interno e externo.

2. Colina

A colina foi isolada pela primeira vez por Strecker em 1849 a partir de bile de suínos, mas sua importância nutricional foi descoberta em 1932 por Best e colaboradores, que relataram a prevenção de fígados gordurosos em cães após pancreatemia com lecitina dietética em que o componente efetivo da lecitina era a colina. Essa vitamina atua como fator lipotrópico, presente tanto em células vegetais como animais. Sua suplementação pode melhorar a síntese de lipoproteínas (Swenson &

Reece, 1996). É um nutriente essencial em dietas de vários vertebrados, incluindo humanos, cães, gatos, suínos, ratos, coelhos, aves e peixes (Kasper et al., 2000).

A classificação da colina como vitamina é questionável, pois ela é requerida em maiores quantidades que outras vitaminas. A colina é sintetizada pelo organismo na presença de quantidades adequadas de precursores, tais como o fosfatidil-serina e metionina (Swenson & Reece, 1996; Case et al., 1997; Kasper et al., 2000), sendo necessários também, o ácido fólico e a vitamina B₁₂ (Lovell, 1989; Case et al., 1997). A biossíntese hepática de colina pode não ser suficiente para o rápido crescimento de aves ou outras espécies jovens quando alimentadas com dietas deficientes em doadores de grupo metil ou metionina. A metionina em excesso pode dispensar a necessidade dietética de colina, atuando como um doador metílico (Lovell, 1989; Swenson & Reece, 1996; Case et al., 1997).

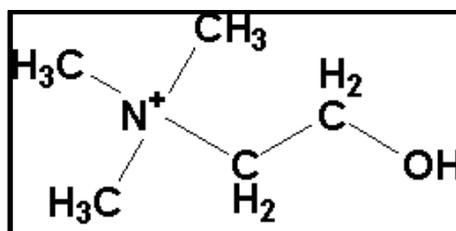


Figura 1. Forma molecular da colina; três grupos metil.

A colina pode ser encontrada de três formas: colina livre, acetilcolina ou lecitina em fosfolipídios (Vieira et al., 2001). As moléculas de colina possuem três grupos metil (-CH₃), cuja função final é como fonte de grupos metil para reações de metilação. A colina reage com a acetil coenzima A, atuando como precursor da acetilcolina, um neurotransmissor (Lovell, 1989; Shiau & Lo, 2000; Zeisel, 2000) e da fosfatidilcolina que é um elemento estrutural da membrana celular e da transmissão do impulso nervoso, atuando também na utilização de lipídios (Bender, 2003; Zeisel, 2000; Vieira

et al., 2001). A colina tem funções nos tecidos como um componente da lecitina e pode ser incorporada diretamente no 1,2-diglicerídio após a fosforilação por ATP e formação de difosfocolina de citidina (Swenson & Reece, 1996).

A colina pode ser oxidada a betaína, um doador de grupos metil para as reações de metilação, convertendo a homocisteína em metionina (Swenson & Reece, 1996; Case et al., 1997; Vieira et al., 2001; Wu & Davis, 2005). A betaína é um composto aromático encontrado naturalmente nas células animais. Atua na regulação do equilíbrio osmótico, sendo a única fonte de doação de grupos metil prontamente ativa, permitindo a síntese de metionina, carnitina, fosfatidilcolina e creatina, compostos chave para o metabolismo protéico e energético (El-Husseiny et al., 2008). Outros doadores como a colina e a metionina, necessitam passar por transformações, para serem utilizados pelos animais. A colina é convertida em betaína na mitocôndria celular e a metionina precisa ser ativada por meio da síntese de S-adenosil-metionina (SAM) (Finkelstein, 1990; Zeisel, 2000). O fígado além de ser o órgão central de síntese e degradação de SAM, é também o meio central da homeostase (Finkelstein, 1990). É absorvida por processo mediado por um carreador em baixas concentrações.

A deficiência de colina pode resultar em acúmulo de lipídios, por causa da falta de fosfolípido para transportar gordura do fígado aos tecidos (Swenson & Reece, 1996; Zeisel, 2000). Os sinais clínicos e lesões associadas com a deficiência de colina em peixes incluem redução no ganho de peso e eficiência alimentar, lipidose hepática e hemorragia nos rins, fígado e intestino (Wilson & Poe, 1988; Lovell, 1989; Chan, 1991, Griffin et al., 1994; Kasper et al., 2000). A deficiência de colina estimula o processo de apoptose, morte programada de células, portanto, um nutriente essencial as células (Ziesel, 2000).

Roem et al. (1990) determinaram que a exigência de colina para tilápia azul estão entre os níveis de 1000 a 2000 g kg⁻¹ dieta. Viera et al. (2001) avaliaram dietas purificadas, suplementadas com 0; 375; 750; 1125; 1500 e 1875 g kg⁻¹ dieta para tilápias do Nilo e concluíram que o melhor nível de suplementação para alevinos foi de 375 mg de cloreto de colina g kg⁻¹ dieta.

Há grande variação nos valores recomendados de colina para a tilápia do Nilo em função da relação com outros compostos, fase de desenvolvimento dos peixes, parâmetro utilizado para determinar a exigência, alimento e processamento utilizados para compor a dieta, e sistema de criação. No entanto, poucos são os trabalhos que associam, além do desempenho, os efeitos da colina e metionina sobre a morfologia do tecido hepático e muscular.

3. Metionina

A metionina é um aminoácido sulfurado, que atua na síntese protéica e desempenha funções fisiológicas importantes, além de ser essencial para o crescimento normal dos peixes (Lovell, 1989; Teshima et al., 2002; Alam et al., 2005). A metionina é um dos aminoácidos mais limitantes da dieta para a maioria dos peixes de clima tropical, (Lovell, 1989). É também uma fonte de enxofre, que é exigido a síntese de muitos outros compostos sulfurados (Bender, 2003).

No organismo, a metionina é utilizada para sintetizar cisteína, de modo que aproximadamente metade da exigência de metionina pode ser atendida mediante níveis adequados de cisteína. Por este motivo, é preferível considerar que os animais não têm exigência específica de metionina, mas de aminoácidos sulfurados totais (Case et al., 1997).

A principal utilização de metionina é como doador de grupos metil para as reações de metilação pela via SAM (Bender, 2003). O SAM é sintetizado a partir da metionina, que transfere o adenosil para o adenosil trifosfato pela enzima metionina adenosiltransferase, permitindo a doação de grupos metil para uma variedade de substratos, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, fosfolipídios e aminas biogênicas (Mato et al., 1997). A via SAM gera compostos como a carnitina (Swenson & Reece, 1996), cistina (Zhou et al., 2006), colina (Swenson & Reece, 1996; Kasper et al., 2000), poliaminas e outros intermediários metabólicos, como a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Bender, 2003).

Em humanos, tem se calculado que 85% das reações de metilação e 48% do metabolismo de metionina ocorrem no tecido hepático (Mato et al., 1997). Na doação de grupos metil, o SAM é convertido em S-adenosil homocisteína (SAH), um potente inibidor competitivo das reações de transmetilação. O aumento de SAH diminui o SAM, ocorrendo redução na taxa SAH/SAM, inibindo as reações de metilação no tecido hepático (Espe et al., 2008).

Poucas são as informações sobre as exigências de aminoácidos sulfurados para tilápias. A determinação de suas exigências é importante em dietas práticas, principalmente quando o farelo de soja é a principal fonte de proteína, por conter baixo nível de metionina. De acordo com o NRC (1993), em dietas para peixes onívoros, os aminoácidos sulfurados devem estar presentes na proporção de 3% da proteína, sendo que a mesma deve estar na proporção de 2,68% em dietas para a tilápia do Nilo ou 0,75% da dieta. Mais recentemente, Furuya et al. (2004) determinaram exigência de 0,6% de metionina, que correspondeu a 2% da proteína, com 1,11% de aminoácidos sulfurados totais para alevinos dessa espécie.

4. Interação Metionina e Colina

A colina e metionina são os maiores doadores de grupos metil, tendo importância vital para todos os animais terrestres e aquáticos. Eles atuam em reações de metilação de aminoácidos, em que a homocisteína é convertida em metionina e a creatina em ácido acético e fosfatidilcolina (PC), para fosfatidiletanolamina (PE) (NRC, 1993; Craig & Gatlin, 1996; Wu & Davis, 2005).

Em trabalhos realizados por Wilson & Poe (1988), Graig & Gatlin (1996), Kasper et al. (2000), Nordrum et al. (2000), Shiau & Lo (2000), Zeisel (2000), Vieira et al. (2001), Kasper et al. (2002), Michael et al. (2006), Zhou et al. (2006), Espe et al. (2008), Mai et al. (2009) entre outros, foram demonstradas a importância da metionina e/ou colina sobre o desempenho e saúde dos peixes, principalmente no aspecto relacionado ao metabolismo hepático. Kasper et al. (2000) avaliaram dietas contendo 0,28% ou 0,50% de aminoácidos sulfurados totais com 1000; 2000; 3000 e 4000 mg de cloreto de colina kg^{-1} dieta para juvenis de tilápia do Nilo. Os autores concluíram que os melhores resultados de ganho de peso e conversão alimentar com 0,5% de aminoácidos sulfurados e 3000 mg de cloreto de colina kg^{-1} dieta. Não foram observados efeitos da metionina e/ou colina sobre a composição em lipídios do fígado e histologia do fígado. Ainda, a inclusão de 4000 mg de cloreto de colina kg^{-1} dieta (aproximadamente 3000 de colina kg^{-1} dieta), resultou em piora sobre o ganho de peso e conversão alimentar.

Torna-se então, interessante à avaliação da combinação de metionina e colina na dieta, considerando que atualmente em criação intensiva, há elevada demanda dos mesmos, para o adequado metabolismo dos lipídios, o que reflete na saúde e, conseqüentemente, no desempenho produtivo dos peixes.

5. Fígado

A hepatologia dos vertebrados é amplamente baseada no conhecimento adquirido pelo estudo de fígados de mamíferos, especialmente roedores e humanos. O estudo do fígado de peixes é de grande interesse e pode ser considerado como ponto de partida para estudos comparativos e filogenéticos entre vertebrados, o qual pode ser dificultado devido à grande diversidade de espécies. Ainda que as características morfológicas comuns entre ordens tenham sido determinadas, os teleósteos são utilizados como modelo padrão para a descrição específica do fígado. Além desta variabilidade específica, alguns caracteres fisiológicos dos peixes contribuem para ampliar o polimorfismo hepático (Bruslé & Anadon, 1996).

O fígado de peixes teleósteos é um órgão denso ventral, localizado na região cranial da cavidade celomática (Bruslé & Anadon, 1996), derivado embrionariamente do intestino e, na maioria das espécies é separado por um septo transversal da cavidade pericárdica (Loures & Lima, 2001). O fígado pode estar separado na cavidade celomática ou dividido em lobos interligados ao intestino, estendendo seu comprimento ao longo da cavidade abdominal (Roberts, 2001; Ferguson, 2006). A superfície do órgão é revestida por uma membrana serosa e parte do tecido conjuntivo da cápsula se invagina para o parênquima para dar sustentação (Takashima & Hibiya, 1995).

O fígado de teleósteos pode apresentar formas variadas, com lobos pares e ímpares (Loures & Lima, 2001) ou com ausência de lobulação. O tamanho, a forma e volume são adaptados ao espaço entre outros órgãos viscerais (Bruslé & Anadon, 1996). A coloração descrita varia de escura (Loures & Lima, 2001) a avermelhado (Ostrander, 2000) ou marrom-avermelhado devido à rica vascularização, tendendo ao amarelado quando os estoques de lipídios são altos (Bruslé & Anadon, 1996). A organização vascular deste órgão consiste em dois vasos sanguíneos aferentes (artéria hepática e veia

porta) e um vaso sanguíneo eferente (veia hepática), localizados em um hilo (Takashima & Hibiya, 1995). O fígado possui como anexo a vesícula biliar, que também pode apresentar formas diversas (Loures & Lima, 2001).

O fígado da tilápia do Nilo foi descrito por Vincentine et al. (2005) como um órgão largo e dividido em dois lobos. O lobo esquerdo é maior e se estende por toda a cavidade. Na face visceral do fígado se observa a impressão intestinal. A vesícula biliar é bem desenvolvida e com formato arredondado.

Em algumas espécies de teleósteos, o fígado é um órgão compacto que se combina com o pâncreas, formando o hepatopâncreas, enquanto em algumas espécies se encontram completamente separadas (Roberts, 2001). O sistema biliar difere dos mamíferos, em que os canalículos biliares intracelulares se anastomosam para formar os ductos biliares (Roberts, 2001, Ferguson, 2006).

As funções dos hepatócitos envolvem os processos de síntese protéica, secreção biliar, armazenamento de glicogênio e gordura neutra, biotransformação e detoxificação (drogas, poluentes), metabolismo (conversão de aminoácidos e lipídios em glicose) (Takashima & Hibiya, 1995; Coelho, 2002; Samuelson, 2007), incluindo a função endócrina de produção de insulina e glucagon (Fishelson, 2006), realizando a homeostasia da glicose (Banks, 1992; Storer et al., 1996).

Em peixes o fígado pode ser considerado como um órgão chave que controla muitas funções vitais, tendo grande papel na fisiologia, tanto no anabolismo, que envolve o metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos (Bruslé & Anadon, 1996), como no catabolismo, que envolve a detoxicação de toxinas e poluentes, glicogenólise e catabolismo do nitrogênio (Bruslé & Anadon, 1996; Storer et al., 1998). A detoxificação de substâncias estranhas é uma das mais importantes funções do fígado de peixes, sendo por esta razão, considerado o órgão alvo de muitos parâmetros biológicos

e ambientais que possam causar alterações na estrutura e metabolismo, como alimentação, parasitas, microrganismos, toxinas (Bruslé & Anadon, 1996) e, como indicadores de poluição ambiental, causadas, por exemplo, por organoclorados e xenobióticos (Fredello et al., 2001).

O tecido hematopoiético do fígado é representado pelos centros melano-macrofágicos, dispostos em menor ou maior quantidade ao redor dos principais vasos (Roberts, 2001). São atribuídas ao fígado às funções de *turnover* das células sanguíneas, digestão (produção de bile), e capacidade de estoque de lipídios, carboidratos, vitamina A e ferro.

O fígado tem papel importante na reprodução, pois participa do processo de vitelogênese. A substância depositada nos ovos de peixes, rica em vitelo é sintetizado por produtos precursores (vitelogenina) através da atividade hepática. Conseqüentemente existem diferenças na estrutura hepática entre machos e fêmeas, peixes maduros e imaturos (Bruslé & Anadon, 1996). O fígado também atua nos mecanismo de defesa, representado pelo sistema retículo endotelial e pela produção imunoglobulinas (Powell, 2000).

Ultraestruturalmente os hepatócitos dos teleósteos são poligonais e fracamente basofílicos quando comparado aos de mamíferos, dispostos como cordões ao redor de sinusóides, com núcleos esféricos bem desenvolvidos e nucléolos centrais e na periferia encontram-se a cromatina, que é granular com heterocromatina condensada (Takashima & Hibiya, 1995; Bruslé & Anadon, 1996; Santos, 2003; Ferguson, 2006). Os hepatócitos de peixes são mais pobres em organelas que os mamíferos, sugerindo baixa atividade sintética e, portanto, baixa secreção protéica (Bruslé & Anadon, 1996). As mitocôndrias têm formato arredondado ou alongado e estão associadas com o retículo endoplasmático rugoso (REr), o qual está disposto paralelamente ao núcleo (Takashima

& Hibiya, 1995; Vincentine et al., 2005). O RER é abundante devido à alta atividade sintética (Takashima & Hibiya, 1995), enquanto o retículo endoplasmático liso é quase sempre ausente (REI). O aparelho de Golgi é pouco desenvolvido e localizado próximo ao núcleo e área canalicular, onde se encontram poucos lisossomos e peroxissomos. As organelas se encontram concentradas ao redor do núcleo ou na periferia da célula (Bruslé & Anadon, 1996; Ferguson, 2006).

O fígado de mamíferos é provido das células de Von Kupffer, que se encontram revestindo as regiões dos sinusóides hepáticos, cuja função está associada à fagocitose. Estas células fazem parte do sistema macrofágico e sua presença no tecido hepático caracteriza uma atividade fagocítica (Banks, 1992; Abbas et al., 1998). Na maioria dos peixes teleósteos, existe ausência de um sistema bem desenvolvido de células de Kupffer na linha dos sinusóides, portanto, possui baixa capacidade de bloquear antígenos circulantes, o que explica em parte, a falta de reconhecimento das lesões hepáticas quando comparados aos mamíferos (Bruslé & Anadon, 1996; Ferguson, 2006). Estas células estelares e polimórficas são raras e dificilmente observadas no fígado de peixes. Já os melano-macrófagos (MM), uma categoria especial de macrófagos, são comumente observadas nos peixes e se encontram concentradas no interior dos centros melano-macrofágicos (CMM) (Ferguson, 2006), localizados próximo as artérias hepáticas, veias portais, ductos biliares e hepatopâncreas. Os CMM concentram materiais heterogêneos, como lipofuscina (amarela), melanina (marrom ou preta), ceróide (PAS-positivo) ou hemossiderina (Perls-positivo) (Bruslé & Anadon, 1996; Ferguson, 2006).

O fígado é capaz de estocar tanto glicogênio como lipídios, os quais podem ser observados microscopicamente, através de técnicas histoquímicas. O glicogênio é reconhecido pela afinidade PAS-positivo, enquanto as inclusões lipídicas pela afinidade

Sudan-positivo (Bruslé & Anadon, 1996). Em algumas espécies de *Ciprinidae* e *Salmonidae* os estoques de glicogênio são abundantes, pois apresentam baixa capacidade em aproveitar carboidratos (Ferguson, 2006). As reservas de glicogênio nos hepatócitos dos peixes são consideradas um desvio metabólico, induzido por desbalanço na dieta, dimorfismo sexual ou após longo período de manutenção em aquário. Alguns autores sugerem que poucos peixes possuem habilidade de sintetizar ou quebrar glicogênio. Algumas espécies, como *Diodon SP*, *Gadus morhua*, *Lota lota* e *Scarus spp*, acumulam grandes quantidades de lipídios. Na maioria das espécies de peixes os estoques de lipídios são abundantes e representa a principal fonte de energia, sendo constituído principalmente por ácidos graxos poliinsaturados e vitamina A (Bruslé & Anadon, 1996; Ferguson, 2006).

5.1. Papel do Fígado no Metabolismo de Lipídios

O fígado é indispensável na digestão de lipídios, órgão em que a bile é produzida, ficando armazenada na vesícula biliar e liberada quando o alimento chega ao intestino. A bile contém ácido gálico que emulsifica a gordura, aumentando a superfície de contato para a ação das enzimas que digerem gordura, classificadas como lipolíticas e lipase (Silva & Anderson et al., 1995).

Os produtos hidrossolúveis da digestão lipídica, tais como os ácidos graxos de cadeia curta e média e os lipídios que circulam periféricamente estão sujeitos a ação hepática (Swenson & Reece, 1998). O fígado possui sistemas enzimáticos ativos para síntese de ácidos graxos, colesterol, fosfolipídios, triacilgliceróis, ácidos biliares e formas menos tóxicas ou mais hidrossolúveis de compostos excretados pela urina e fezes. Possui também sistemas enzimáticos para oxidação de ácidos graxos em CO₂ ou em corpos cetônicos (Reece, 2006). Somente uma pequena proporção de lipídios do

corpo permanece como ácidos graxos livres. Nos hepatócitos, os ácidos graxos livres são esterificados a triacilgliceróis (MacLachlan & Cullen, 1998).

Em teleósteos, os maiores sítios de estoque de lipídios são o fígado e o músculo vermelho, além de depósitos de lipídios, predominantemente triacilgliceróis, encontrados no tecido subcutâneo e cavidade abdominal, associado ao intestino e ceco pilórico (Mommsen, 1997).

O fígado é a maior fonte de lipoproteínas plasmáticas, além dos quilomícrons. Os ácidos graxos chegam ao fígado por via do plasma, oriundos de duas fontes: como triglicerídeos dos depósitos de gordura e como quilomícrons do intestino. Estes ácidos graxos ou são usados no fígado nos processos metabólicos ou são ligados as proteínas produzidas no retículo endoplasmático e secretadas do fígado para o plasma (Thomson, 1983). As lipoproteínas são a principal forma circulante de lipídios e são utilizadas amplamente pelo tecido adiposo e muscular. As partículas lipoproteicas incluem os quilomícrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL).

Os triacilgliceróis normalmente não se depositam no fígado, mas são envolvidos com fosfolipídios, colesterol, ésteres de colesterol e apolipoproteínas, formando o VLDL e HDL para secreção no sangue por pinocitose inversa (Reece, 2006). O VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade é prontamente liberada como fonte de energia para muitos tecidos (Mommsen, 1997; MacLachlan & Cullen, 1998).

As lipoproteínas têm tanto a função de tornar os lipídios solúveis, como de transportá-los pelo plasma, providenciando um mecanismo eficiente de distribuição de lipídios aos tecidos (Champe et al., 1994).

A síntese da parte protéica das lipoproteínas só ocorre no fígado e é uma etapa limitante de taxa para a liberação hepática de lipoproteínas. A taxa de transporte de

gordura para fora do fígado depende da capacidade do fígado para sintetizar a parte protéica das lipoproteínas. Quando a mobilização de ácidos graxos não esterificados de tecido adiposo supera a secreção de VLDL pelo fígado, acumulam-se triacilgliceróis no fígado, resultando em fígado gorduroso ou degeneração gordurosa (Reece, 2006), levando ao acúmulo visível de gotículas de gordura no citoplasma dos hepatócitos (Thomson, 1983).

Existem substâncias lipotróficas induzidas nutricionalmente que melhoram a síntese de lipoproteínas e evitam o fígado gorduroso, entre elas estão a colina, o inositol e o lipocaico, dos quais a colina é o mais efetivo (Swenson & Reece, 1996).

Os mecanismos potenciais pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado incluem: 1) a entrada excessiva de ácidos graxos para o fígado, devido à ingestão excessiva ou pelo aumento na mobilização de triglicerídios do tecido adiposo (por exemplo, jejum prolongado), 2) função anormal do hepatócito, podendo levar ao acúmulo excessivo de triglicerídios no hepatócito devido à redução da oxidação dos ácidos graxos, 3) ingestão excessiva de carboidratos na alimentação resultando na síntese aumentada de ácidos graxos, com formação excessiva de triglicerídios; 4) aumento na esterificação de ácidos graxos a triglicerídios, 5) redução na síntese de apoproteínas e subsequente decréscimo na produção e exportação de lipoproteínas pelo hepatócito (MacLachlan & Cullen, 1998).

O fígado com degeneração gordurosa é amarelado, com grau de intensidade proporcional ao acúmulo de gordura. Em alguns casos, o fígado pode apresentar-se aumentado de tamanho e uniformemente amarelo, com uma superfície gordurosa na superfície de corte (Thomson, 1983; MacLachlan & Cullen, 1998). O aspecto microscópico da gordura é o de gotas claras e bem definidas ou de inúmeras gotículas que dão uma aparência espumosa ao citoplasma. A quantidade de gordura pode ser tão

extensa que desloca o núcleo do hepatócito para periferia e, dá ao parênquima hepático a aparência de um tecido adiposo (Thomson, 1983).

6. Tecido Muscular Esquelético

A maior parte da massa corporal em quase todas as espécies de peixes é compreendida pelo músculo esquelético (Alexander, 1969), representada pelos grandes músculos do corpo e da cauda responsáveis pela locomoção ou “natação”, embora existam outros pequenos músculos associados à cabeça e nadadeiras (Moyle & Cech, 1996).

As fibras musculares de quase todas as espécies de peixes estão distribuídas em áreas ou compartimentos distintos, diferentemente da distribuição em mosaico observado em mamíferos (Close, 1992). No movimento de natação existe uma dependência de ações harmoniosas de músculos lentos e rápidos. Os músculos de movimento lento realizam contrações por períodos mais longos, enquanto os músculos de movimento rápido apresentam contrações de curta duração. Vários tipos diferentes de fibras musculares são encontrados nos músculos laterais dos peixes e, os miótomos podem ser divididos anatomicamente dentro de distintas regiões (Jobling, 1995).

A musculatura lateral é dividida verticalmente ao longo do corpo em uma série de arranjos, denominado de miomêros (miotómos), os quais são delimitados por feixes de tecido conjuntivo (Moyle & Cech, 1996). Os miomêros são divididos por um miosepto de tecido conjuntivo colagenoso, dentro dos quais as fibras musculares se inserem (Jobling, 1995). O miosepto forma uma série de cones sobrepostos que são dispostos paralelamente ao longo da linha média, conferindo uma forma de W ao miótomo quando observado em uma secção longitudinal (Jobling, 1995; Moyle & Cech, 1996). Um septo vertical separa a metade direita e esquerda dos miomêros no corpo e,

um septo horizontal separa a massa muscular em regiões epaxial (superior) e hipaxial (inferior) (Moyle & Cech, 1996).

As fibras musculares de contração são compostas por fibras musculares de contração rápida (“branco”) e de contração lenta (“vermelho”), posicionados ao lado do músculo branco (Jobling, 1995). As proporções de músculo branco e vermelho variam muito entre as espécies (Webb, 1997). Existe também uma camada de fibras musculares rosas que apresentam ação contrátil e metabólica intermediária. As fibras musculares rosas ocorrem entre as áreas do miótomo ocupadas pelas fibras brancas rápidas e fibras vermelhas lentas (Jobling, 1995). As fibras musculares de peixes contraem mais lentamente que as fibras musculares de anfíbios ou mamíferos.

6.1. Músculo Vermelho

As fibras musculares vermelhas comumente se restringem ao longo da linha lateral. Constituem menos de 10% da musculatura miotomal e apresentam diâmetro menor entre 25-45 μm (Kiessling et al., 2006). São tecidos que apresentam extenso suprimento sanguíneo (Jobling, 1995), com muitos capilares por milímetro cúbico e que possuem altas concentrações de hemoglobina (sangue) e mioglobina (músculo), suprindo adequadamente o músculo de oxigênio, que é rico em mitocôndrias. As fibras musculares vermelhas metabolizam a gordura aerobicamente, o que a torna dependente do fornecimento de oxigênio (Moyle & Cech, 1996; Sanger & Stoiber, 2001).

Os principais combustíveis do metabolismo aeróbico são os ácidos graxos derivados do tecido adiposo (reserva lipídica) e a glicose das reservas de glicogênio hepático e muscular. Estes substratos respiratórios estão usualmente presentes em grandes quantidades e apresentam alta energia (ATP) por unidade de substrato, o que os tornam ideais para providenciar a energia requerida para realização de trabalho

constante (Jobling, 1995). As fibras musculares vermelhas são também chamadas fibras lentas e são usadas principalmente como energia de sustentação para natação eficiente, como durante a migração (Sänger & Stoiber, 2001).

6.2. Músculo Branco

As fibras musculares brancas compõem em torno de 70% do músculo esquelético do peixe (Sänger & Stoiber, 2001). As fibras brancas apresentam maior diâmetro, em torno de 50-100 μm (Kiessling et al., 2006). As fibras musculares brancas são mais espessas que as vermelhas, pobres em suprimento sanguíneo e não tem alta afinidade pelos pigmentos que transportam oxigênio, como a mioglobina. Devido a estas características a contração do músculo branco não é dependente do suprimento de oxigênio, convertendo o glicogênio a ácido láctico pela via anaeróbica (Moyle & Cech, 1996; Sänger et al., 1992; Kiessling et al., 2006).

O suprimento imediato de energia para a contração é proveniente da hidrólise da fosfocreatina citosólica e ATP, presente no músculo. Os estoques de fosfocreatina são extremamente limitados, sendo necessária a suplementação da contração da fibra muscular pela ativação da glicogenólise anaeróbica (Moyle & Cech, 1996; Sänger et al., 1992; Kiessling et al., 2006). O glicogênio estocado no músculo é usado como fonte de energia e como resultado ocorre acúmulo de ácido láctico (lactato) (Jobling, 1995). Após uma intensa atividade de natação, o peixe restaura a energia pela conversão glicogênica no fígado, isto é, do ácido láctico em glicogênio à glicose, que ocorre lentamente no músculo branco. Posteriormente, o lactato pode ser utilizado como combustível do metabolismo aeróbico (Moyle & Cech, 1996).

Os estoques de glicogênio e fosfocreatina diminuem rapidamente quando os músculos contraem anaerobicamente e, desta forma, o peixe nada em alta velocidade.

Assim, o músculo branco é mais utilizado em movimentos curtos e domina a massa muscular para atividades de natação classificada como fibras musculares rápidas (Jobling, 1995).

6.3. Crescimento Pós-Natal do Músculo

Em peixes, os mecanismos de crescimento das fibras musculares esqueléticas envolvem os processos de hipertrofia e hiperplasia das fibras, partindo da proliferação dos mioblastos indiferenciados (Dal-Pai et al., 2003a,b). Na hiperplasia ocorre a formação de novas fibras musculares, enquanto a hipertrofia é a fusão dos mioblastos indiferenciados com as fibras musculares já existentes, resultando no aumento do número de núcleos para uma maior síntese de miofibrilas (Johnston et al., 2000).

Após o início das duas camadas musculares terem sido formadas durante a vida embrionária, o crescimento hiperplásico continua em duas sucessivas e distintas fases. A primeira é a continuação da miogênese embrionária e completa a formação definitiva das camadas musculares (fibras vermelhas, rosa e brancas), seguindo o segundo e completo processo de diferenciação hiperplásica, resultando no aumento do número de fibras musculares em todas as camadas musculares, especialmente a branca (Rowlerson & Vegetti, 2001).

Durante o processo hiperplásico, observa-se um mosaico de fibras de diferentes idades ou diâmetros, com predominância de fibras com diâmetro menor a 25 μm (Vegetti et al., 1993), padrão observado principalmente nas fibras brancas (Vegetti et al., 1993; Rowlerson et al., 1995). O crescimento muscular hiperplásico ocorre principalmente na fase juvenil (Rowlerson & Vegetti, 2001). A hipertrofia só ocorre após a vida embrionária, até alcançar o diâmetro máximo, que atinge a taxa de 100-300 μm para fibras brancas em peixes (Rowlerson & Vegetti, 2001) e persiste por um longo

período após o crescimento hiperplásico ter cessado (Kiessling et al., 2006). A observação de fibras com diferentes tamanhos indica o crescimento muscular tanto por hipertrofia como por hiperplasia (Veggetti et al., 1993; Johnston, 1999; Valente, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001).

7. LITERATURA CITADA

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S, **Imunologia Celular e Molecular**, 1. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter LTDA, 1998. 469 p.
- AKIYOSHI, H.; INOUE, A. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny, **Zoological Science**, v.21, p.841-850, 2004.
- ALAM, M.S.; TESHIMA, S.; ISHIKAWA, M. et al. Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein isolate diet for juvenile Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*. **Aquaculture**, v.248, p.13-19, 2005.
- ALEXANDER, R. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. **Journal Fish Biology**, London, v.67, 1969. p.263-290.
- ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, p.62-72, 1999.
- BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ed. São Paulo: Manole Ltda, 1992. 629p.
- BENDER, D.A. **Nutritional biochemistry of the vitamins**. 2.ed. Cambridge, USA: Cambridge University Press, 2003. 488p.
- BRUSLÉ, J.; ANADON, G.G. The structure and function of fish liver, In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA. H.M. **Fish Morphology- Horizon of New Research**, New Delhi, Calcutta, India, Oxford, IBH Publishing Co, Pvt, Ltd, 1996. p. 77-93.
- CASE, L.P.; CAREY, D.P.; HIRAKAWA, D.A. **Nutrición Canina y Felina**. 1.ed.Madrid – Espana: Hacourt Brace de Espana, S.A., 1997. 417p.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry**. 2 ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1994. 443p.
- CHAN, M. M.. Choline. In: MACHLIN, L. J. **Handbook of vitamins**. 1.ed. New York, NY: Marcel Decker, 1991. p.537-556.
- CLOSE, R.I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscle. **Physiology Reviews**, Bantimore, v.52, 1972. p.129-197.
- COELHO, H.E. **Patologia veterinária**. 1.ed. Barueri – São Paulo: Manole, 2002, 234p.
- CRAIG, S.R.; GATLIN, D.M. Dietary choline requirement of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Journal of Nutrition**, v.126, 1996. p.1696-1700.
- GUIMARÃES, I.G; PEZZATO, L.E; BARROS, M.M. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v.14, p.396-404, 2008 a.
- GUIMARÃES, I.G; BARROS, M.M; TACHIBANA, L. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.39, p.781-789, 2008 b.
- DAL PAI, V.; DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, F.R. Muscle growth in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: Histochemical, ultrastructural and morphometric studies. **Cell and Tissue Research**, v.291, p.1-9, 2003a.
- DAL PAI-SILVA, M; FREITAS, E.M.S.; DAL PAI, V. et al. Morphological and histochemical study of the myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) during the initial phases of growth. **Archives Of Fishery And Marine Research**, v.50, n.2, p.1-9, 2003b.
- DEGANI, G.; REVACH, A. Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* x *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1882). **Aquaculture and Fisheries Management**, v.22, p.397-403, 1991.

- EL-HUSSEINY, O.M.; EL DIN, G.; ABDUL-AZIZ, M. et al. Effect of mixed protein schedules combined with choline and betaine on the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v.39, p.291-300, 2008.
- EL-SAYED, A. M. **Tilapia Culture**. London : Cabi. 2006. 277p.
- ESPE, M.; HEVROY, E.M.; LIASET, B. et al. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, v.274, p.132-141, 2008.
- FERGUSON, H.W. **Systemic pathology of fish**. 2 ed. London: Scotian Press, 2006. p.146-157.
- FINKELSTEIN, J.D. Methionine Metabolism in Mammals. **Journal Nutrition Biochemistry**, v.1, p.228-237, 1990.
- FISHELSON, L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (*Apogonidae, Teleostei*) as bioindicators of stress, **Journal of Morphology**, v.267, p.57-69, 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Roma, Italia 2009.
- FREDELLO, J.P.; RAQBI, A.; MATTEI, X. et al. Quantification of macrophage aggregates in the liver of *Mugil cephalus*, **Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology**, v.33, p.473-473, 2001.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M. et al. Use of ideal concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, v.35, p.1110-1116, 2004.
- GRIFFIN, M.E.; WHITE, M.R.; BROWN, P.B. Total sulfur amino acid requirement and cysteine replacement value for juvenile hybrid striped bass (*Morone saxatilis x M. chrisops*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v.108, p.423-429, 1994a.
- JOBLING, M. **Environmental biology of fish**. 1 ed. London: Chapman & Hall, 1995. 455p.
- JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potencial implication for flesh quality in fish. **Aquaculture**, v.177, p.99-115, 1999.
- JOHNSTON, I.A.; ALDERSON, R.; SANDHAM, C.; et al. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoke Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.189, p.335-349, 2000.
- KASPER, C.S.; WHITE, M.R.; BROWN, P.B. Choline is required by Tilapia when methionine is not in excess. **Journal of Nutrition**, v.130, p.238-242, 2000.
- KASPER, C.S.; WHITE, M.R.; BROWN, P.B. Betaine can replace choline in diets for juvenile Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.205, p.119-126, 2002.
- KIESSLING, A.; RUOHONEN, K.; BJORNEVIK, M. Muscle fibre growth and quality in fish. **Archiv Tierzucht**, Dummerstorf, v.49, p.137-146, 2006.
- LOURES, B.R.R.L.; LIMA, S. Anatomia de peixes. In: MOREIRA, L.M.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas, RS: ULBRA. 2001. p.17-22.
- LOVELL, R.T. **Nutrition and Feeding of Fish.**, New York, USA: Van Nostrand Reinhold, 1989, 267p.
- LOVSHIN L.L. Tilapia culture in Brazil. IN COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E., eds. **Tilapia Aquaculture in the Americas**, v.2. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States, p.113-140, 2002.
- MACLACHLAN, N.J., CULLEN, J.M.. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: CARLTON, W.W., McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998, p. 95-131.

- MATO, J.M.; ALVAREZ, L.; ORTIZ, P. et al. S-Adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. **Pharmacology & Therapeutics - Elsevier**, v.73, n.3, p.265-280, 1997.
- MICHAEL, F.R.; KOSHIO, S.; TESHIMA, S. et al. Effect of choline and methionine as methyl group donors on juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. **Aquaculture**, v.258, p.521-528, 2006.
- MOMMSEN, T.P. Growth and metabolism. In: EVANS, D.H. **The physiology of fishes**. 2 ed. Boca raton: RCR Press, Marine Science Series, 1998, p. 65-97.
- MOYLE, P.B.; CEHC, J.J. **Fishes: an introduction to ichthyology**. 3.ed. New Jersey: Prentice-Hall Press, 1996. 590p.
- NRC. **Nutrient Requirements of warmwater fishes and shellfishes**. Washington : National Academy, 1993, 102p.
- NORDRUM, S.; KROGDAHL, A.; ROSJO C. et al. Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon *Salmo salar* L. under pair-feeding regime. **Aquaculture**, v.186, p.341-360, 2000.
- OSTRANDER, G.; BULLOCK, G.; BUNTON, T, **The laboratory fish**, 1.ed. San Diego, Academic Press, 2000, 678p.
- PEZZATO, L.E. **Digestibilidade em peixes**. 2001. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- POWELL, D.B. Blood and lymphatic vessels, In: Ostrander, G, K, (Ed.) **The laboratory fish**, San Diego, USA: Academic Press, 2000, p. 441-448.
- PULLEN, A.H. The distribution and relative sized of fibre types in the extensor digitorum longus and soleus muscles of the adult rat. **Journal of Anatomy**, v.123, n.1, p.467-86, 1977.
- REECE, W.O. **DUKES: Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 12 ed, cap. 31, 2006. 942 p.
- RIBEIRO, R.P. Espécies exóticas. In: MOREIRA, L.M.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas, RS: ULBRA. 2001, 91-121.
- ROBERTS, R.J. **Fish Pathology**. 3nd.ed. London: W.B. Saunders, 2001. 495p.
- ROEM, A.J.; STICKNEY, R.R.; KOHLER, C.C. Vitamin requirements of blue tilapias in a recirculating water system. **The Progressive Fish-Culturist**, v.52, p.15-18, 1990b.
- ROWLERSON, A.; MASCARELLO, F.; RADAELLI, G. et al. Differentiation and growth of muscle in the fish *sparus aurata* (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching til adult. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.16, p.223-236, 1995.
- ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). Muscle development and growth. **Fish physiology**, San Diego: Academic Press, 2001, p. 103-140.
- SAMUELSON, D.A. **Tratato de histologia veterinária**. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, p.344-357.
- SÄNGER, A.M. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. **Environ. Biol. Fishes**, v.33, p.97-104, 1992.
- SÄNGER, A.M., STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JHONSTON, I.A. **Muscle developemnet and growth**. 1 ed. London: Academic Press, 2001, p. 187-250.
- SANTOS, N. P. **Regeneração hepática em bagre africano (*Clarias gariepinus*) após**

- hepatectomia parcial.** 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2003.
- SHIAU, S.Y.; LO, P.S. Dietary choline requirements of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Nutrient Requirements – Short Communication, Journal of Nutrition**, p.100-103, 2000.
- SILVA, S.S.; ANDERSON, T.A. **Fish nutrition in aquaculture.** 1 ed. London: Chapman & Hall, 1995. 345p.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos.** 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C. et al. **Zoologia geral.** 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p.76-103.
- SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **DUKES: Fisiologia dos animais domésticos.** 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 1996, 856p.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v.182, p.317-327, 2000.
- TESHIMA, S.; ALAM, M. S.; KOSHIO, S. et al. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicas*. **Aquaculture Research**, v.33, p.395-402, 2002.
- THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 412p.
- VALENTE, L.M.P.; ROCHA, E.; GOMES, E.F.S. et al. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. **Journal Fish Biology**, v.55, p.675-691, 1999.
- VEGGETTI, A.; MASCARELLO, F.; SCAPOLO, P.A. et al. Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish, *Poecilia reticulata* (Peters) (Atheriniformes, Poeciliidae): a histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. **Anatomy Embryology**, v.187, p.353-361, 1993.
- VIERA, I.; CYRINO, J.E.; PEZZATO, L.E. Colina e betaína em rações purificadas na nutrição da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Scientia agrícola**, v.58, n.4, p. 675-680, 2001.
- VINCENTINE, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINE, I. B.; BOMBONATO, M. T. S. et al. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Morphology**, v.23, n.3, p.211-216, 2005.
- WEBB, P.W. Swimming. In: EVANS, D.H. **The physiology of fishes.** 2.ed. Boca raton: RCR Press, Marine Science Series, 1998, p. 3-24.
- WILSON, R.P.; POE, W.E. Choline nutrition of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, v.68, p.65-71, 1988.
- WU, G.; DAVIS, A. Interrlationship among methionine, choline and betaine in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal World Aquaculture Society**, v.36, p.337-345, 2005.
- ZEISEL, S.H. Choline: an essential nutrient for humans. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.669-671, 2000.
- ZHOU, Q.C.; WU, Z.H.; TAN, B.P. et al. Optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v.258, p.551-557, 2006.

OBJETIVO

Avaliar dietas suplementadas com metionina e/ou colina em dietas para a tilápia-do-Nilo, sobre o desempenho produtivo, morfologia hepática e muscular.

ARTIGO

**Metionina e colina em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo,
desempenho produtivo, morfologia hepática e muscular**

Metionina e colina em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo, desempenho produtivo, morfologia hepática e muscular

RESUMO - O trabalho foi realizado para avaliar os efeitos da metionina e/ou colina sobre o desempenho produtivo, morfologia do fígado e do músculo branco da tilápia-do-nilo, da linhagem *Supreme*. Foram utilizados 160 peixes com peso vivo médio inicial de $77 \pm 0,8$ g, distribuídos em 16 tanques (1000 L cada) com 10 peixes/tanque, em sistema de recirculação, durante 87 dias. Foram utilizadas quatro rações com 33% PB e 3.000 kcal ED kg⁻¹ de ração: controle, sem adição de metionina e colina (CT); com suplementação de 0,3% de metionina (MT); 0,2% de colina (CL) e, 0,3% de metionina e 0,2% de colina (MT+CL). Os peixes foram alimentados com dietas peletizadas, por arraçamento manual até consumo voluntário. Os peixes foram abatidos e os fígados coletados para análise das características macroscópicas e microscópicas através da coloração do parênquima hepático com Hematoxilina-Eosina e, histoquímica para evidenciação glicogênica (PAS) e lipídica (Sudan III). Amostras de músculo branco da região dorsal foram utilizadas para avaliação morfológica e morfometria do menor diâmetro da célula. Não foi observado efeito do fornecimento de metionina e/ou colina na dieta sobre o ganho de peso diário, conversão alimentar, rendimento de filé, índice hepatossomático e gordura visceral. Os peixes alimentados com dietas suplementadas com colina e metionina apresentaram menor teor de gordura nos filés. Os peixes alimentados com as dietas CL e MT+CL apresentaram maior acúmulo de inclusões glicogênicas e menor de inclusões lipídicas no tecido hepático, em relação aos peixes do tratamento CT e MT. A suplementação de colina e/ou metionina não afetou o diâmetro da fibra muscular branca dos peixes. Concluiu-se que a suplementação de colina e/ou metionina não afeta o desempenho produtivo, mas a colina possui ação importante na utilização do lipídio hepático, evidenciado pela redução de inclusões lipídicas.

Palavras-chave: aminoácido, fígado, músculo, peixe, vitamina

Dietary methionine and choline for juvenile Nile tilapia, performance, hepatic morphology and muscular fiber morphology

ABSTRACT - This study was conducted to evaluate the effects of methionine and / or choline on performance, morphology of liver and white muscle of Nile tilapia, *Supreme* strain. One-hundred and sixty fish with average weight of 77 ± 0.8 g were distributed in 16 tanks (1000 L each) with 10 fish/tank, in a recirculation system, during 87 days. Four diets with 33% CP and 3,000 kcal DE kg⁻¹ were used: control (CT), supplemented with 0.3% methionine (MT), 0.2% of choline (LC) or 0.3% of 0.2% of methionine and choline (MT + CL). Fish were fed were hand fed until apparent satiation. Livers were macroscopically and microscopically examined and characterized by staining of hepatic parenchyma with Hematoxylin-Eosin, and for inclusion glycogenic histochemistry (P.A.S.) and lipid (Sudan III). Samples of white muscle of dorsal region were used for morphological and morphometric evaluation of the minor diameter of the cell. No effects of methionine and/or choline on daily weight gain, feed conversion, fillet yield, hepatosomatic index, visceral fat and white muscle fiber diameter were observed. Fish fed diets supplemented with choline and methionine showed lower fat content in the fillets. Fish fed CL and CL+MT showed higher glycogenic inclusion and lower lipidic inclusion in the liver, compared to fish fed CT and MT diets.

Keywords: amino acid, fish, liver, muscle, vitamin

Introdução

Atualmente a aqüicultura tem crescido mais rapidamente que qualquer outro setor de alimentos de origem animal, representando uma taxa de crescimento médio anual de 6,9%. A contribuição da aqüicultura para o fornecimento mundial de pescado, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos tem aumentado, passando de 3,9% da produção total em peso em 1970 para 36% em 2006 (FAO, 2008).

A tilápia do Nilo tem sido considerada como uma das espécies mais importantes para a piscicultura devido à rápida taxa de crescimento, adaptação a diversas condições de criação e boa aceitação pelo consumidor (Degani & Revach, 1991; MacIntosh & Little, 1995; Boscolo et al., 2001; Meurer et al., 2002). No Brasil, 37,96% do total de peixes produzidos em 2005 foi de tilápias (IBAMA, 2007). Em 2006 a tilápia foi à espécie de água doce mais produzida (27,8%), seguida de moluscos (27%) e crustáceos (9%), provenientes da pesca continental (FAO, 2008).

O organismo pode sintetizar colina na presença de quantidades adequadas de precursores, tais como o fosfatidil-serina e metionina (Case et al., 1997; Kasper et al., 2000). Nesta reação a metionina atua como doador de grupo metil, sendo necessários também, o ácido fólico e a vitamina B₁₂ (Lovell, 1989; Swenson & Reece, 1996; Case et al., 1997). A molécula de colina possui três grupos metil (-CH₃), cuja função final é como fonte de grupos metil para reações de metilação. A colina reage com a acetil coenzima A, atuando como precursor da acetilcolina, um neurotransmissor (Lovell, 1989; Shiau & Lo, 2000; Zeisel, 2000) e da fosfatidilcolina, que é um elemento estrutural da membrana celular e da transmissão do impulso nervoso, atuando também no metabolismo e transporte de lipídio-colesterol (Bender, 2003; Zeisel, 2000; Vieira et al., 2001). Atua também, como fator lipotrópico, presente tanto em células vegetais como animais, melhora a síntese de lipoproteínas e evita o fígado gorduroso (Swenson

& Reece, 1996). A colina pode ser oxidada a betaína, um doador de grupos metil para as reações de metilação, convertendo a homocisteína em metionina (Swenson & Reece, 1996; Case et al., 1997; Vieira et al., 2001; Wu & Davis, 2005).

A metionina é um aminoácido essencial que atua na síntese protéica e desempenha funções fisiológicas importantes, além de ser essencial para o crescimento normal dos peixes (Lovell, 1989). A principal utilização de metionina é como doador de grupos metil, requeridas às reações de metilação pela via S-adenosil metionina (SAM) (Bender, 2003). O SAM é sintetizado a partir da metionina, que transfere o adenosil para o adenil trifosfato (ATP), permitindo a doação de grupos metila para uma variedade de substratos, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, fosfolipídios e aminas biogênicas (Mato et al., 1997). A via S-adenosil metionina gera compostos como a carnitina (Swenson & Reece, 1996), cistina (Zhou et al., 2006), colina (Swenson & Reece, 1996; Kasper et al., 2000), poliaminas e outros intermediários metabólicos, como a fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) (Bender, 2003).

Em trabalhos realizados por Kasper et al. (2000), Nordrum et al. (2000), Zeisel, 2000; Vieira et al. (2001), Kasper et al. (2002), Michael et al. (2006), Espe et al. (2008), Mai et al. (2009), entre outros, foram demonstradas a importância da metionina e/ou colina sobre o desempenho e saúde dos peixes.

As tilápias têm sido criadas de forma intensiva no Brasil, o que demanda a utilização de dietas que permitam além das respostas de ganho de peso e conversão alimentar, a produção de peixes adequados para consumo, quer seja em termos de rendimento de filé, bem como para sua composição química, principalmente pela redução de lipídios. A deposição de lipídio no fígado de peixes cultivados é frequentemente intensa, indicando um desbalanço nutricional das dietas artificiais (Takashima & Hibiya, 1995). Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo

de avaliar dietas sem e com metionina e/ou colina sobre o desempenho e morfologia hepática e muscular.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aqüicultura (DBI-UEM) da Universidade Estadual de Maringá, localizada na cidade de Maringá – PR, durante o período de março a maio de 2008, durante 87 dias.

Foram utilizados 160 peixes revertidos em macho durante a fase larval provenientes da Piscicultura Aquabel, Rolândia – PR, com peso inicial de $77 \pm 0,8$ g, distribuídos em 16 tanques (1m^3 cada).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (CT = sem adição de metionina e colina; MT = 0,3% de metionina; CL = 0,2% de colina e MT+CL = 0,3% de metionina e 0,2% de colina), quatro repetições e dez peixes por unidade experimental.

Todos os peixes foram pesados individualmente em balança digital (0,01 g) no início e ao final do experimento.

A dieta controle foi elaborada com base em valores de aminoácidos digestíveis do milho, farelo de soja, farelo de trigo e farinha de peixes determinados para a tilápia do Nilo por Furuya et al. (2001a). Para a farinha de carne, foram utilizados os valores de aminoácidos digestíveis determinados por Guimarães et al. (2008 a;b). À dieta controle, foi realizada a suplementação com DL-metionina 99% (MT), cloreto de colina 75% (CL) ou DL-metionina 99% + cloreto de colina 75% (MT+CL) (Tabela 1).

Todos os ingredientes foram moídos em moinho martelo até atingirem diâmetro igual ou inferior a 0,50 mm e armazenados. Para confecção das dietas, após pesagem e homogeneização dos ingredientes, foi pulverizada água (55°C) na proporção de 35% de

seu peso total e, em seguida, agregadas em moinho de carne e desidratadas em estufa de ventilação forçada (55°C), durante um período de 24 horas, obtendo grânulos com 3 mm de diâmetro. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia (8; 14 e 18 horas) por meio de arraçoamento manual, até saciedade aparente.

Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais

	Ração ¹			
	Controle	MT	CL	MT+CL
Milho grão	16,57	16,27	16,37	16,07
Farinha de carne e osso (45%)	10,00	10,00	10,00	10,00
Soja farelo (45%)	52,00	52,00	52,00	52,00
Trigo grão	8,00	8,00	8,00	8,00
Farinha de peixe (55%)	5,00	5,00	5,00	5,00
Oleo de soja	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato bicácico	2,00	2,00	2,00	2,00
L-Lisina HCl	0,20	0,20	0,20	0,20
L-treonina	0,20	0,20	0,20	0,20
DL-metionina	0,00	0,30	0,00	0,30
Colina Cloreto	0,00	0,00	0,20	0,20
Sal comum	0,20	0,20	0,20	0,20
Suplemento mineral e vitamínico ²	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamina C ³	0,20	0,20	0,20	0,20
BHT ⁴	0,03	0,03	0,03	0,03
Antifúngico	0,10	0,10	0,10	0,10
	Composição calculada (%) ^{5,6}			
Matéria seca ⁵	88,51	88,91	88,51	88,91
Proteína bruta ⁵	33,63	33,73	33,63	33,73
Energia digestível, kcal/kg ⁶	332	3307	3302	3307
Fibra bruta ⁶	3,56	3,56	3,56	3,56
Extrato etéreo ⁶	7,83	7,83	7,83	7,83
Cálcio ⁶	2,11	2,11	2,11	2,11
Fósforo disponível ⁶	0,65	0,65	0,65	0,65
Metionina + cistina total	0,99	1,23	0,99	1,23
Metionina total	0,52	0,81	0,52	0,81
Colina total	325	325	1825	1825

¹Dieta controle; MT= DL-metionina; CL = Cloreto de colina e MT + CL = DL-metionina + Cloreto de colina

²Suplemento mineral e vitamínico (Supre Mais): composição por kg: Vit. A = 1200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit. B1 = 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; ác. fólico = 1.200 mg; pantotenato de Ca = 12.000 mg; vitamina C = 48.000 mg; biotina = 48 mg; colina = 65.000 mg; niacina = 24.000 mg; Fe = 10.000 mg; Cu = 600 mg; Mg = 4.000 mg; Zn = 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg;

³Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico com (42% de princípio ativo).

⁴Hidroxitolueno butilado.

^{5,6}De acordo com Furuya et al. (2001b), Pezzato et al. (2002), Rostagno et al. (2005), respectivamente.

Uma vez por semana, foram tomadas as medidas de temperatura (8 e 16 h), pH e oxigênio dissolvido (mg/L) da água de cada tanque, obtidos por meio de "kit" digital.

Ao término do experimento, dez peixes foram abatidos, sendo sete utilizados para rendimento e composição química do filé e três utilizados para análise morfológica do fígado e músculo. Após a pesagem final, sete peixes de cada unidade experimental foram eviscerados, e os filés retirados com pele no sentido da musculatura dorsal para a ventral, procedendo-se em seguida a remoção da pele no sentido longitudinal, da cauda para a extremidade anterior, com o auxílio de alicate e faca.

As análises químicas das dietas, filés, e fígados foram analisadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, seguindo-se metodologia citada por Silva & Queiroz (2002).

As análises dos aminoácidos das dietas foram realizadas pela Ajinomoto Biolatina (Nutrição Animal) do Brasil.

Todos os fígados coletados foram submetidos a uma avaliação macroscópica, na qual foi avaliada a coloração, aspecto, consistência, morfologia geral e presença de lesões, classificadas de acordo com a forma, cor e padrão de distribuição, segundo a classificação proposta por Thomson (1983).

A análise histológica foi realizada no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual de Maringá. Foram utilizados 12 peixes por tratamento e, coletados os fígados para análise histológica. As amostras foram fixadas e armazenadas separadamente, em solução de formol tamponado a 10% por aproximadamente 24 horas e posteriormente transferidas para frascos, contendo álcool 70%, com a finalidade de conservação do material. Posteriormente, seguiu-se o processo de desidratação através de passagens em séries crescentes de alcoóis, diafanizadas em xilol e incluídas em parafinas, para obtenção de cortes transversais. A

preparação das lâminas seguiu a rotina histológica da técnica de inclusão em parafina, e realizados cortes transversais semi-seriados com espessura de 5 μm em micrótomo rotativo. Duas lâminas contendo quatro cortes histológicos/fígado foram coradas com HE e empregadas para avaliação e descrição da morfologia e integridade do tecido hepático, utilizando-se ocular micrométrica (400X).

Para as análises de inclusão de glicogênio hepático pela técnica histoquímica P.A.S. foram utilizadas 12 peixes/tratamento, e de cada amostra de fígado, confeccionado duas lâminas contendo quatro cortes, e delas capturadas 20 imagens da veia centrolobular, utilizada como referência devido a ausência de lobulação hepática.

Para as análises de inclusão de lipídio hepático pela técnica histoquímica Sudan III foram coletadas amostras de fígado e congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente transferidas para um freezer a $- 80^{\circ}\text{C}$. Para evidenciação de inclusões lipídicas no tecido hepático, os fígados foram submetidos à microtomia (criostato Leica CM 1850[®]), com cortes histológicos de 10 μm de espessura, com temperatura interna de $- 27^{\circ}\text{C}$ e associada à coloração histoquímica Sudan III e Hematoxilina para evidenciação do núcleo do hepatócitos.

Para análise morfométrica do material evidenciado pela histoquímica P.A.S. e Sudan III, foram capturadas imagens do parênquima hepático através de uma Câmera digital de alta resolução Pro - Series da Media Cybernetics[®], acoplada ao microscópio Olympus Bx 41[®], utilizando como referência a veia central. Para leitura das imagens foi utilizado o programa Image-Pro Plus 4.5.1[®]. Para avaliar o percentual da área glicogênica/lipídica presente nos hepatócitos, considerou-se como medida padrão a área total do campo microscópico ($20458.61 \mu\text{m}^2$) subtraída da área ocupada pela veia centrolobular ($2184.44 \mu\text{m}^2$), correspondendo a $18274.17 \mu\text{m}^2$. Para cada técnica

histoquímica foram capturadas vinte campos/lâmina/peixe, totalizando 240 imagens/tratamento.

Foram utilizados os mesmos peixes (12 peixes/tratamento), para as análises histológica (HE) e de histoquímica P.A.S. e Sudan III, porém amostras diferentes de fígado, já que os cortes para técnica HE e histoquímica P.A.S. foram obtidos por inclusão em parafina (bloco), enquanto para a histoquímica Sudan III, as amostras de fígado foram fixadas em nitrogênio.

Doze peixes por tratamento foram utilizados para análise de fibra muscular. As amostras do músculo foram colhidas, fixados em nitrogênio líquido e submetidos à microtomia (criostato Leica CM 1850[®]) a 10 µm de espessura (Pullen, 1977), com temperatura interna de - 27°C. Posteriormente, os cortes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) (Lillie, 1954), para avaliação da morfologia geral do tecido e mensuração do menor do diâmetro das fibras musculares (Dubowitz & Brooke, 1973). Para realização dessas etapas, foram capturadas imagens utilizando uma câmera digital de alta resolução 3CLD Pro - series da Media Cibertecnicos[®], acoplada ao microscópio Olympu's America inc Bx 50[®], utilizando para a leitura de imagens o programa Image Pro-Plus 4.5.1[®]. Esta avaliação foi realizada pela captura de dez campos microscópicos (10.913 µm²) por peixe, totalizando 120 imagens/tratamento e a mensuração realizada em 10 células/campo, totalizando 300 células/tratamento, 100X.

Os peixes foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições para os dados desempenho produtivo. Para análise da morfologia e histoquímica hepática, e morfologia muscular foi utilizado um delineamento com quatro tratamentos e nove repetições. As análises estatísticas dos dados foram realizadas de acordo com o programa SAEG (UFV, 1982) e submetidos à análise de variância (ANOVA), individualmente, para cada variável resposta a um nível

de 5% de significância, tanto para os dados de desempenho quanto para a histoquímica.

Resultados e Discussão

Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) sobre o peso final, ganho de peso diário, conversão alimentar, rendimento de filé, índice hepatossomático, sobrevivência e gordura visceral da tilápia do Nilo alimentada com metionina e/ou colina.

Foi observada menor concentração ($p<0,05$) de gordura nos filés nos peixes que receberam dieta suplementada com metionina e colina (MT+CL), não havendo diferenças entre os dados dos tratamentos controle (CT), metionina (MT) e colina (CL) (Tabela 2).

Avaliando trabalhos relacionados à suplementação de colina ou a interação da metionina e colina, pode se observar variações na resposta de desempenho produtivo, as quais podem ocorrer em função da biossíntese de colina e/ou a fonte protéica utilizada na dieta que por sua vez variam em função da espécie, fase de desenvolvimento e sistema de criação (Zhang & Wilson, 1999).

Tabela 2. Valores médios de desempenho e composição química do filé da tilápia do Nilo alimentada com as dietas experimentais

	Ração				
	CT	MT	CL	MT+CL	CV
Peso final (g)	415,80	424,72	418,97	424,15	6,12
Ganho de peso diário (g)	3,90	4,00	3,93	3,99	7,38
Conversão alimentar	1,72	1,51	1,48	1,66	15,02
Rendimento de filé (%)	34,10	34,37	33,79	34,43	1,79
Índice hepatossomático (%)	1,88	2,11	1,98	2,28	11,24
Sobrevivência (%)	97,5	97,5	97,5	96,67	4,70
Gordura visceral (%)	1,92	1,78	1,79	2,03	17,00
	Composição química dos files (%)				
Umidade	77,65	77,43	78,04	78,45	1,05
Proteína bruta	18,64	18,99	18,34	18,22	5,03
Gordura	5,03 ^a	5,51 ^a	5,09 ^a	4,72 ^b	14,22
Cinzas	3,72	3,68	3,76	3,71	7,87

Na mesma linha, médias com letras diferentes indicam diferenças significativas ($P<0,05$); Teste de Tukey
 CT= Dieta controle; MT= DL-metionina; CL = Cloreto de colina e MT + CL = DL-metionina + Cloreto de colina

Roem et al. (1990), não observaram diferenças sobre o ganho de peso, conversão alimentar e sobrevivência da tilápia áurea alimentada com rações purificadas suplementadas com 0; 250; 500; 1.000 ou 2.000 mg de colina kg^{-1} de ração. Estes autores consideram que tilápias criadas em sistemas de recirculação de água, provavelmente conseguem aproveitar a colina das bactérias presentes na água, o que reduziria o custo de alimentação com a suplementação de colina. Shiau & Lo (2000), trabalhando com a tilapia-do-nilo utilizaram níveis de suplementação de 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 2000 mg de colina kg^{-1} dieta, obtiveram em seus estudos boa resposta nos parâmetros de ganho de peso, eficiência alimentar e sobrevivência. Mai et al. (2009), avaliaram a exigência de colina para juvenis de cobia (*Rachycentron canadum*), com peso vivo médio inicial de $4,2 \pm 0,4$ g, fornecendo dietas purificadas suplementadas com 133; 350; 548; 940; 2017 e 3981 mg colina kg^{-1} . Os autores concluíram que os níveis de colina para ganho de peso, concentração de colina no fígado e no músculo de 696; 877 e 950 mg kg^{-1} , respectivamente. Ketola (1976) trabalhando com a truta do lago (*Salvelinus namaycush*), Hung (1989) com esturjão (*Acipenser transmontanus*), Rumsey (1991) com truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e Craig & Gatlin (1996) com “red drum” (*Sciaenops ocellatus*), obtiveram aumento no ganho de peso dos peixes, que responderam proporcionalmente à suplementação de colina na dieta.

Kasper et al. (2000), avaliaram para tilápia do Nilo rações com valores crescentes de colina (1000, 2000, 3000 ou 4000 mg kg^{-1}) com 0,28 ou 0,5% de aminoácidos sulfurados totais (matéria seca) e concluíram que os peixes alimentados com a ração com 3000 mg kg^{-1} de colina e 0,5% de aminoácidos sulfurados obtiveram melhores resultados de ganho de peso e eficiência alimentar.

Ainda que a metionina seja um aminoácido limitante e essencial para o crescimento normal dos peixes (Lovell, 1989) não foram observados seus efeitos positivos sobre o desempenho, indicando que a exigência de metionina é inferior ao recomendado pelo NRC (1993), de 0,75% de metionina ou 0,9% de aminoácidos sulfurados totais, ou seja, 0,15% de cistina. No presente trabalho, a menor exigência de metionina pode estar relacionada com os maiores valores de cistina da dieta, pois enquanto os valores recomendados de cistina pelo NRC (1993) são de 0,15%, no presente trabalho a dieta controle possuía 0,47% de cistina. Considerando que a cistina é obtida a partir da metionina (transulfuração), é possível que a metionina tenha sido “poupada” para a produção de cistina. Assim, Furuya et al. (2004) determinaram exigência de 0,54% de metionina em dieta com 1,13% de aminoácidos sulfurados totais (0,6% de cistina) para alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dieta prática.

A exigência de colina para peixes varia de 50 a 3400 mg colina kg⁻¹ de dieta (NRC, 1993; Kasper et al., 2000), sendo determinada a exigência de 500 mg kg⁻¹ dieta para híbrido de striped bass (Griffin et al., 1994), 588 mg kg⁻¹ dieta para red drum (Craig & Gatlin, 1996), 400 mg kg⁻¹ dieta para bagre do canal (Zhang & Wilson, 1999), 596-634 mg kg⁻¹ dieta para “yellow perch” (Twibell & Brown, 2000) e 696 mg kg⁻¹ dieta para o cobia (Mai et al., 2009). Para salmonídeos, Ketola (1976) e Rumsey (1991) determinaram exigência de 1030 e 850 mg kg⁻¹ de colina para a truta do lago e truta arco-íris, respectivamente. Mais especificamente com tilápias, Roem et al. (1990) observaram crescimento máximo da tilápia azul (*Oreochromis aureus*) alimentada com dieta contendo 500 mg kg⁻¹, inferior ao valor descrito por Shiau & Lo (2000), para a tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*), de 1000 mg kg⁻¹ de dieta, superior ao valor determinado por Vieira et al. (2001) para alevinos de tilápia do Nilo, de 375 mg kg⁻¹ dieta.

No presente trabalho, foi utilizada adição de 2000 mg cloreto de colina kg^{-1} na dieta, nível superior ao recomendado por diversos autores. Considerando os valores de colina dos alimentos, foi obtido valor final de colina próximo de 3000 mg kg^{-1} . Este nível de colina baseou-se no estudo realizado por Kasper et al. (2000), que obtiveram melhores resultados no desempenho produtivo da tilápia do Nilo, suplementando a dieta com 3000 mg de colina kg^{-1} dieta.

A redução de gordura no filé, obtida nos peixes suplementados com 0,3% de metionina 99% e 0,2% de colina, pode ter ocorrido devido à conversão da metionina em carnitina. A L-carnitina pode promover a redução do lipídio muscular e hepático (Dias et al., 2001). Por outro lado, Mai et al. (2009) observaram aumento na quantidade de lipídio muscular do cobia suplementadas com níveis crescentes de colina, o que pode ter ocorrido em função do maior peso final dos peixes que receberam dietas com valores mais elevados de colina.

Ketola (1976) trabalhando com truta do lago, Wilson & Poe (1988) com catfish, Griffin et al. (1994) com híbrido de “striped bass”, Mai et al. (2009) com cobia observaram que a concentração de lipídio hepático foi responsiva à suplementação com colina e, que a deficiência deste nutriente resultou em acúmulo de lipídios no fígado. Shiau & Lo (2000), não observaram acúmulo de lipídios no fígado de tilápias não suplementadas com colina, no entanto, observaram que a concentração de lipídio hepático foi menor nos peixes alimentados com a dieta controle, intermediária nos peixes suplementados com 100-600 mg kg^{-1} e alta nos peixes suplementados com $> 800 \text{ mg kg}^{-1}$. Esta observação foi semelhante ao encontrado por Craig & Gatlin (1991) com “red drum” (*Sciaenops ocellatus*), em que a adição gradual de colina na dieta resultou em acúmulo de lipídios no fígado. Em outros estudos, como o de Rumsey (1991) com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Kasper et al. (2000) com

tilápia, Twibell & Brown com yellow perch (2000), Vieira et al. (2001) e Kasper et al. (2002), ambos com tilápia nilótica, a concentração de lipídios no fígado não foi afetada.

Pela avaliação macroscópica, foram observados fígados bem desenvolvidos, localizados ventralmente na cavidade celomática, separada da cavidade pericárdica por um septo transversal. Observou-se que são divididos em dois lobos, direito e esquerdo, sendo o último maior, estendendo-se por toda cavidade. A maioria dos fígados analisados apresentou superfície lisa e brilhante, consistência firme e coloração vermelho vivo amarronzada. A análise macroscópica do fígado descrita anteriormente está de acordo com o relatado por Vicentine (2005) para a tilápia do Nilo.

No tratamento com a MT, foi observado que dois peixes apresentaram fígados de coloração acinzentada, que pode ser interpretada como uma alteração *post-mortem*, e, um peixe apresentou fígado com coloração amarelada, sugerindo fígado gorduroso. De acordo com Thomson (1983); Bruslé & Anadon (1996) o fígado tende a coloração amarelada quando os estoques de lipídios são altos.

Lesões circulares esbranquiçadas na superfície hepática com aproximadamente 0,2 a 0,3 mm de diâmetro com distribuição focal (uma lesão) ou multifocal (mais de uma lesão), além de estrias esbranquiçadas entremeadas no parênquima hepático com distribuição focal, difusa ou generalizadas, foram achados macroscópicos evidentes (Tabela 3).

As lesões esbranquiçadas circulares foram classificadas em grau 1 (leve, uma lesão, focal), grau 2 (moderada, uma a três lesões, multifocal), grau 3 (severa, acima de três lesões, multifocal). As estriações de coloração esbranquiçada foram observadas distribuídas pelo parênquima hepático de forma focal, difusa ou generalizada. Estas estrias ocorreram associadas ou não as manchas circulares arredondadas. Alguns fígados não apresentaram nenhuma das lesões.

Tabela 3. Frequência de ocorrência de lesões hepáticas na avaliação macroscópica do fígado da tilápia do Nilo em função dos tratamentos.

	Tratamento			
	CT	MT	CL	MT+CL
	Mancha(s) esbranquiçada (%)			
Grau 1	5,13	15,79	20,51	27,02
Grau 2	38,46	36,84	23,08	16,21
Grau 3	23,08	15,79	7,69	10,81
Sem alterações	33,33	31,58	48,72	45,94
	Estrias esbranquiçadas (%)			
Grau 1	5,13	2,63	25,64	32,43
Grau 2	30,77	47,37	17,95	10,81
Grau 3	41,03	31,58	12,82	10,81
Sem alterações	23,08	18,42	43,59	45,95
Número peixes	39	38	39	37

CT = controle; MT = DL-metionina; CL = Cloreto de colina e MT + CL = DL-metionina + Cloreto de colina

Na avaliação microscópica das lâminas coradas com HE, observou-se que a maior parte do parênquima hepático era constituída por hepatócitos poligonais, com núcleos grandes, centrais e arredondados, sendo comum a visualização de hepatócitos com dois núcleos em todos os tratamentos, devida a sua intensa atividade metabólica. Notou-se, hepatócitos dispostos no parênquima em forma de cordões contínuos e entre dois cordões se encontrava um pequeno vaso, o sinusóide, que se comunica a vasos maiores. Em alguns sinusóides hepáticos foram observadas as células endoteliais, que são mais alongadas e compõem a parede dos vasos. Também foi observada dilatação dos sinusóides hepáticos compatíveis a congestão. No citoplasma dos hepatócitos foi observada a presença de gotículas de coloração marrom, supostamente ferritina, indicando uma intensa atividade metabólica. Nenhuma lobulação foi observada no parênquima dos fígados analisados. Em um estudo recente realizado por Akyoshi & Inoue (2004) com 200 espécies de peixes teleósteos, em que a tilápia está incluída, foi demonstrado predominantemente ausência dos lóbulos hepáticos, unidades estruturais do fígado.

Dispersos no parênquima, foram evidenciadas numerosas veias centrais, as quais foram encontradas isoladas ou associadas a ductos, a veia porta e artéria hepática (sempre em pares) e, a formação do espaço porta, representado por uma tríade de veia, artéria e ducto. Foi observado com frequência tecido pancreático exócrino, conhecido como hepatopâncreas, composto por células ácino serosas com concentrações de grânulos de zimogênio eosinofílicos no citoplasma apical, enquanto que o citoplasma basal apresenta coloração basófila devido à concentração de retículo endoplasmático rugoso. O hepatopâncreas distribui-se por todo parênquima, associado a vasos e/ou artérias e canalículos. Foi comum a observação do hepatopâncreas associado à maior veia porta, formando uma estrutura isolada, de acordo com o observado por Roberts (2001) e Ferguson (2006) em peixes teleósteos.

Centros melano-macrófagos (CMM) foram observados em número e tamanhos variados. São centros grandes, de coloração castanha escura devido ao armazenamento de substâncias como a melanina, lipofuscina e ceróides. Os CMM foram observados aleatoriamente no parênquima hepático, principalmente próximo as células pancreáticas exócrinas e vasos. Segundo Ferguson (2006), centros CMM podem se encontrar dispersos no tecido pancreático. Os CMM fazem parte do tecido hematopoiético, cujas funções estão associadas à degradação de eritrócitos e a defesa, por meio de atividade fagocítica.

A descrição da histomorfologia dos fígados analisados no presente trabalho foi semelhante ao padrão geral de outros teleósteos, descrito por Bruslé & Anadon (1996), Santos (2003), Ferguson (2006), Costa (2007), Lopes & Malbarba (2007) e para a tilápia do Nilo, por Vicentine (2005). Estudos anteriores demonstram que há grande variedade na estrutura do órgão em várias espécies de peixes (Schär et al., 1985), que se

devem as diferenças entre as espécies e que é influenciado pela estação, status nutricional, idade, sexo e exposição a poluentes (Ferguson, 2006).

A presença de vacúolos claros no citoplasma de hepatócitos foi observada em graus variados. No tratamento CL e MT + CL foi observada moderada vacuolização do citoplasma, enquanto no tratamento CT e MT a vacuolização foi intensa. Em algumas lâminas, a vacuolização citoplasmática foi intensa, a ponto de deslocar os núcleos para a periferia (Figura 1), aspecto compatível com o de degeneração gordurosa. Segundo Thomson (1983), o aspecto microscópico da degeneração gordurosa é o de gotas grandes, claras e bem definidas ou de inúmeras gotículas, que quando em grande quantidade, deslocam o núcleo do hepatócito, dando ao parênquima hepático o aspecto de tecido adiposo.

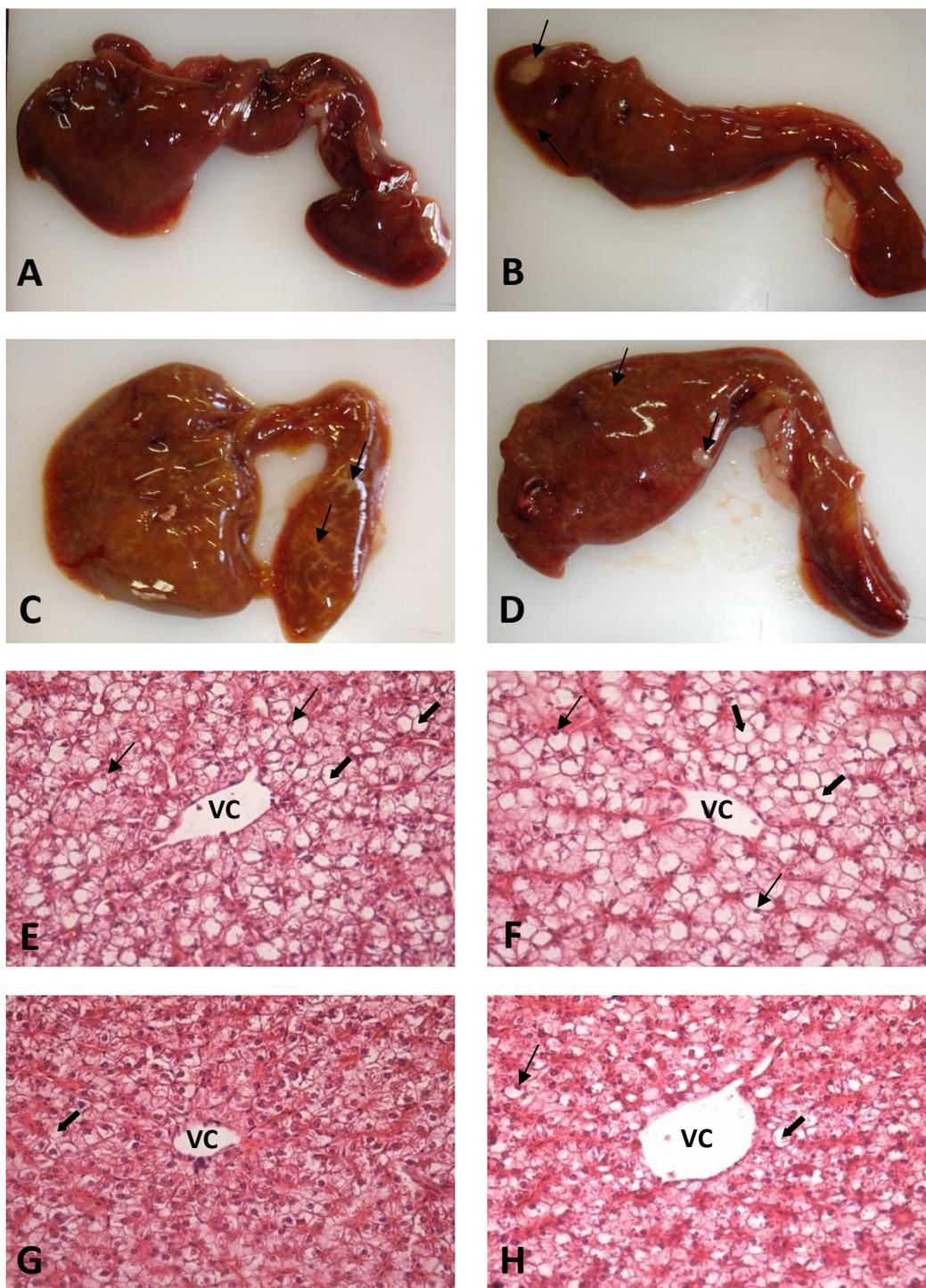


Figura 2. Fígado. **A:** sem lesões, tratamento CL (Colina). **B:** lesões circulares esbranquiçadas (setas), tratamento Colina + Metionina. **C:** estrias esbranquiçadas (setas), tratamento Controle. **D:** lesões circulares esbranquiçadas associadas a estrias esbranquiçadas (setas), tratamento Metionina. Tecido hepático de tilápia-do-nylo. **E** e **F:** visão geral, veia centrolobular (VC), cordões de hepatócitos, área de intensa vacuolização citoplasmática (setas largas), núcleos deslocados para periferia (setas finas), tratamento Controle e Metionina, 400X; **G** e **H:** área de leve e moderada vacuolização, tratamento Colina e Metionina+Colina. HE, 400X.

Kasper et al. (2000), realizaram dois experimentos estudando a interação metionina/colina em dietas para tilápia do Nilo, revelando na avaliação da histopatologia hepática, quantidades variáveis de degeneração macrovesicular e microvesicular de todos os grupos, indicando acúmulo intracelular de lipídio e glicogênio respectivamente, sem diferenças discerníveis entre os tratamentos. Porém, não realizaram colorações específicas para identificação de glicogênio ou de inclusões lipídicas.

O acúmulo de glicogênio e gordura é observado nas lâminas coradas com HE como estruturas vacuolizadas nos hepatócitos (Takashima & Hibiya, 1995). O glicogênio pode acumular-se de forma anormal no citoplasma e aparecer como vacúolos claros, no entanto, é mais comum que a vacuolização do citoplasma dos hepatócitos se deva as inclusões lipídicas (Thomson, 1983).

Desta forma no presente trabalho, foram aplicadas as técnicas histoquímicas, método que origina substâncias insolúveis coloridas que permite a localização de moléculas por microscopia de luz, como o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) para evidenciação do glicogênio hepático e Sudan III para evidenciação de inclusões lipídicas. Os resultados são apresentados na Figura 2.

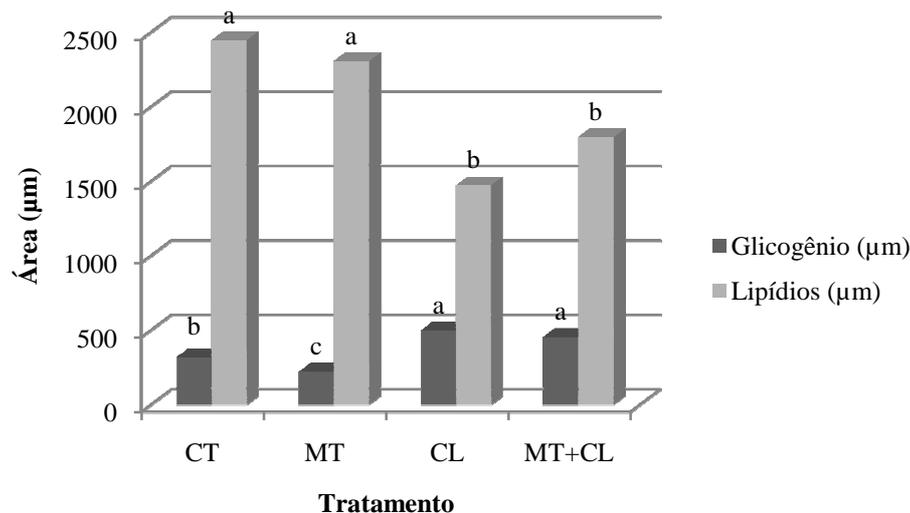


Figura 2. Morfometria da área glicogênica e lipídica pelas técnicas histoquímicas P.A.S. e Sudan III, respectivamente, do tecido hepático da tilápia do Nilo alimentada com as dietas experimentais sem ou com metionina e/ou colina. Médias com letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$); Teste de Tukey Dieta CL= controle; MT= DL-metionina; CL = Cloreto de colina e MT + CL = DL-metionina + Cloreto de colina.

Pela morfometria do glicogênio hepático e de inclusões lipídicas pelas técnicas de P.A.S. e Sudan III, respectivamente, foi observado que os peixes alimentados com dietas suplementadas com colina (CL) e, metionina + colina (MT+CL) apresentaram uma maior área do fígado ocupada por glicogênio e menor área ocupada por lipídios, que os peixes alimentados com a dieta controle (CT) e dieta suplementada com metionina (MT). Não houve diferenças entre o tratamento CL e CL + MT ($p > 0,05$) tanto na mensuração do glicogênio hepático como na mensuração de lipídios, indicando que não houve efeito da metionina e/ou colina sobre as inclusões glicogênicas e que somente a colina foi efetiva na redução de inclusões lipídicas. O tratamento CT diferiu do tratamento MT ($p < 0,05$) em relação á técnica de P.A.S., apresentando uma maior área ocupada por glicogênio, no entanto, não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) quanto à mensuração das inclusões lipídicas.

Foi observado que as lâminas coradas com Sudan III, dos peixes dos tratamentos CT e MT, apresentaram gota de gordura, enquanto o fígado dos peixes dos tratamentos

CL e MT+CL apresentaram gotículas. Em humanos, grandes gotas de gordura, livres e que podem fundir-se, estão associadas à deficiência de colina, enquanto que pequenas gotículas envoltas por membrana e que não se fundem estão associadas à ingestão excessiva de gordura (Thomson, 1983).

Dentre uma série de funções do fígado, destaca-se sua capacidade de acumular substâncias de reserva, especialmente sob a forma de glicogênio e lipídios (Storer et al., 1996; Ferguson, 2006), sendo as variações no armazenamento de substâncias dependentes da espécie, idade, sexo, condição nutricional, maturação gonadal e de aclimação térmica. As espécies *Salmonidae* e *Ciprinidae* apresentam baixa capacidade de aproveitar carboidratos e em decorrência as inclusões glicogênicas no fígado podem ser abundantes. Outras espécies apresentam grandes estoques de lipídio hepático, sendo a principal fonte de energia (Bruslé & Anadon, 1996; Ferguson, 2006).

Não foi observado acúmulo excessivo de glicogênio nos hepatócitos em nenhum dos tratamentos, embora nos tratamentos CL e MT+CL o acúmulo de glicogênio tenha sido superior aos tratamentos CT e MT. O fígado de mamíferos normalmente contém glicogênio em pequenas quantidades, no entanto, distúrbios metabólicos associados à diminuição na produção de insulina ou de seus receptores ou em doenças do armazenamento do glicogênio, as inclusões glicogênicas podem estar aumentadas (Thomson, 1983; Carlton & McGavin, 1998). Nos peixes as partículas de glicogênio podem se encontrar dispersas no citoplasma ou agregadas, formando grandes concentrações (Takashima & Hibiya, 1995). No tratamento CL e MT+CL observou-se uma importante redução de inclusões lipídicas quando comparado aos peixes que receberam a dieta controle e a suplementada somente com metionina, afirmando os efeitos benéficos da colina sobre o metabolismo hepático. Nos trabalhos realizados com

colina e/ou metionina existem poucas informações sobre os efeitos dos mesmos sobre a histologia do fígado, dificultando a comparação de dados.

A colina é considerada uma substância lipotrópica e um fator anti-hemorrágico que, quando suplementada na dieta, pode melhorar a síntese de lipoproteína, evitando o fígado gorduroso (Halver, 2002). A deficiência de colina está associada à redução no ganho de peso e eficiência alimentar, hemorragia nos rins, fígado e intestino (Wilson & Poe, 1988; Chan, 1991, Griffin et al. 1994; Kasper et al., 2000; Zeisel, 2000).

O fígado desempenha um papel essencial no metabolismo lipídico, sendo o único sítio que realiza a síntese da fração protéica das lipoproteínas. A única forma de exportar os lipídeos do fígado é sob a forma de lipoproteínas (Reece, 2006), principal forma circulante de lipídios, sendo amplamente utilizado no tecido adiposo e muscular, por ser mais solúvel (Champe et al., 1994). O fígado gorduroso ocorre porque a colina é requerida para síntese de uma porção da fosfatidilcolina, porção da partícula VLDL. Na ausência de colina o VLDL não é secretado e o triacilglicerol se acumula no citosol hepático (Zeisel, 2000). A capacidade do fígado em sintetizar a parte protéica das lipoproteínas determina a taxa de transporte de gordura para fora do fígado (Thomson, 1983).

Embora o organismo seja capaz de sintetizar colina, a biossíntese hepática pode não ser suficiente para peixes em fase de crescimento, principalmente quando é alimentada com dietas deficientes em doadores de grupo metil ou metionina, o que torna a suplementação de colina indispensável. A metionina em excesso, pode dispensar a suplementação dietética de colina, atuando como um doador metílico (Lovell, 1989; Swenson & Reece, 1996; Case et al., 1997). No entanto, humanos alimentados com nutrição parenteral total suplementada com níveis adequados de metionina e ácido fólico e deficiente em colina, desenvolveram fígado gorduroso e danos hepáticos, que

foram resolvidos após a inclusão de colina na dieta. A deficiência de colina causa morte das células hepáticas porque os hepatócitos iniciam a apoptose. A suplementação com doadores de grupo metil, como a betaína, metionina, ácido fólico ou vitamina B₁₂ não previnem a apoptose causada pela deficiência de colina na dieta (Zeisel, 2000).

No presente trabalho ficaram evidente os efeitos positivos da colina na redução de inclusões lipídicas no tecido hepático, o que pode ser evidenciado nos peixes que receberam as dietas CL e MT+CL. No tratamento MT+CL não foi observada ação da metionina como doador de grupos metil na síntese colina, provavelmente porque o nível de metionina utilizado atendeu as exigências de metionina para a tilápia do Nilo.

Não foi observado efeito ($p>0,05$) dos tratamentos sobre a morfometria (menor diâmetro) do músculo branco. Para os tratamentos CT; MT; CL e MT + CL foram obtidos valores de 63,28; 63,54; 62,83 e 64,73 μm , respectivamente. Quanto à morfologia, observou-se que o tecido conjuntivo (perimísio) que envolve cada uma das fibras apresentou-se pouco desenvolvido, conferindo aspecto compacto às mesmas.

As fibras musculares apresentaram acentuado grau de hipertrofia, observando-se que as de menor diâmetro apresentaram aspecto mais hipertrófico tiveram contorno poligonal. Foi observada a ocorrência de células com diâmetro médio próximo de 60 μm , caracterizando crescimento muscular hipertrófico. No entanto, a presença de poucas células musculares com diâmetro menor que 25 μm entre as fibras maiores indicam que a hiperplasia das fibras ainda está ocorrendo (Aguar, 2005).

Durante o processo hiperplásico, observa-se um mosaico de fibras de diferentes idades ou diâmetros, com predominância de fibras com diâmetro menor a 25 μm (Veggetti et al., 1993), padrão observada principalmente nas fibras brancas (Veggetti et al., 1993; Rowleron et al., 1995), fato demonstrado em larvas de tilápias por Aguiar et al. (2005).

Em peixes, os mecanismos de crescimento das fibras musculares esqueléticas envolvem os processos de hipertrofia e hiperplasia das fibras, partindo da proliferação dos mioblastos indiferenciados (Dal-Pai et al., 2003 a, b). Na hiperplasia ocorre a formação de novas fibras musculares, enquanto a hipertrofia é a fusão dos mioblastos indiferenciados com as fibras musculares já existentes, resultando no aumento do número de núcleos para uma maior síntese de miofibrilas (Johnston et al., 2000).

Assim, é importante a determinação do período de intenso crescimento hiperplásico que poderão ser estimuladas nutricionalmente para crescimento hipertrófico na fase de terminação, objetivando maior rendimento de filés. Nesse sentido, a suplementação de metionina e/ou colina não afetou o crescimento do tecido muscular.

Conclusões

Concluiu-se que a suplementação de colina e/ou metionina não afeta o desempenho produtivo, mas a colina possui ação importante na utilização do lipídio hepático, evidenciado pela redução de inclusões lipídicas, nos peixes suplementados com colina (CL) e metionina + colina (MT+CL), enquanto os fígados dos peixes dos tratamentos controle (CT) e suplementados somente com metionina (MT) apresentaram aspecto característico de degeneração gordurosa.

A suplementação de colina e/ou metionina não afeta o diâmetro da fibra muscular branca dos peixes.

LITERATURA CITADA

- AGUIAR, D.H.; BARROS, M.M.; PADOVANI, C.R. et al. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal of fish Biology**, v.67, p.1287-1298, 2005.
- AKIYOSHI, H.; INOUE, A. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. **Zoological Science**, v.21, p.841-850, 2004.
- BENDER, D.A. **Nutritional biochemistry of the vitamins**. 2.ed. Cambridge, USA: Cambridge University Press, 2003, 488p.
- BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; SOARES C.M. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos da tilápia do Nilo, linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n.5, p.1391-1396, 2001.
- BRUSLÉ, J.; ANADON, G.G. The structure and function of fish liver, In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA. H.M. **Fish Morphology- Horizon of New Research**, New Delhi, Calcutta, India, Oxford, IBH Publishing Co, Pvt, Ltd, 1996. p. 77-93.
- CASE, L.P.; CAREY, D.P.; HIRAKAWA, D.A. **Nutrición Canina y Felina**. 1.ed.Madrid – Espana: Hacourt Brace de Espana, S.A., 1997. 417p.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Biochemistry**, 5 ed, Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1994, p. 205-226.
- COSTA, G.M. **Estudo histomorfológico e análise dos perfis celulares do rim cefálico, fígado, baço e timo do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Teleosteo, Characidae), pacu**. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada a USP– SP, 2007, 133 p.
- CRAIG, S.R.; GATLIN, D.M. Dietary choline requirement of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Journal of Nutrition**, v.126, p.1696-1700, 1996.
- DAL PAI, V.; DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, F.R. Muscle growth in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: Histochemical, ultrastructural and morphometric studies. **Cell and Tissue Research**, v.291, p.1-9, 2003a.
- DAL PAI-SILVA, M; FREITAS, E.M.S.; DAL PAI, V. et al. Morphological and histochemical study of the myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) during the initial phases of growth. **Archives of Fishery And Marine Research**, v.50, n.2, p.1-9, 2003b.
- DEGANI, G.; REVACH, A. Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* x *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1882). **Aquaculture and Fisheries Management**, v.22, p.397-403, 1991.
- DIAS, J.; CORRAZE, J.; KAUSHIK, J. Effects of dietary L-carnitine supplementation on growth and lipid metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Research**, v.32, p.206-215, 2001.
- DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H. **Muscle biopsy: a modern approach**. London: Sunders, 1973. 220p.
- ESPE, M., HEVROY, E.M., LIASET, B., LEMME, A., EL-MOWAFI, A. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, v.274, p.132-141, 2008.
- CRAIG, S.R.; GATLIN, D.M. Dietary choline requirement of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Journal of Nutrition**, v.126, p.1696-1700, 1996.
- FLORES-LOPES, F; MALABARBA, L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambarí *Astyanax jacuhiensis* (cope, 1894) (teleostei, characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. **BIOCIÊNCIAS**, v.15, n.2, p.166-172, 2007.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Roma, Italia 2009.
- FURUYA, W.M.; HAYASHI, C.; FURUYA, V.R.B.; BOTARO, D.; SILVA, D.C.R.; NEVES, P.R. Exigências de metionina+cistina total e digestível para alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* (L.)), baseadas no conceito de proteína ideal. **Acta Scientiarum**, v.23, n.4 p.885-889, 2001a.
- FURUYA, W.M. et al. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, 2001b.
- HUNG, S.S.O. Choline requirement of hatchery-produced juvenile White sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Aquaculture**, v.78, p.183-194, 1989.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Estatística da pesca 2005, Brasil – Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Brasília: IBAMA, 2007. 108p.
- GRIFFIN, M.E.; WHITE, M.R.; BROWN, P.B. Total sulfur amino acid requirement and cysteine replacement value for juvenile hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrisops*). **Comp. Biochem. Physiol**, v.108, p. 423-429, 1994a.
- JOHNSTON, I.A.; ALDERSON, R.; SANDHAM, C.; DINGWALL, A.R.L.; MITCHELL, D.; SELKIRK, C.; NICKELL, D.; BAKER, R.; ROBERTSON, B.; WHYTE, D.; SPRINGATE, J. Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoke Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.189, p.335-349, 2000.
- KASPER, C.S.; WHITE, M.R.; BROWN, P.B. Choline is required by Tilapia when metionine is not in excess. **Journal of Nutrition**, v.130, p.238-242, 2000.
- KASPER, C.S.; WHITE, M.R.; BROWN, P.B. Betaine can replace choline in diets for juvenile Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.205, p.119-126, 2002.
- KETOLA, H.G. Choline metabolism and nutrition requirement of lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Journal Animal Science**, v.43, p.475-477, 1976.
- LILLIE, R.D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 2 ed. New York: Blakiston, 1954. 501p.
- LOVELL, R.T. **Nutrition and Feeding of Fish**. Van Nostrand Reinhold, New York, NY, USA, 1989. 267p.
- MACLACHLAN, N.J., CULLEN, J.M.. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. IN: CARLTON, W.W., McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p.101-104, 1998P. 95-131.
- MATO, J.M.; ALVAREZ, L.; ORTIZ, P.; PAJARES, M.A. S-Adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. **Pharmacology & Therapeutics - Elsevier**, v. 73, n.3, p.265-280, 1997.
- MEURER, F.H.; SOARES, C.M. et al. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia/Brazilian Journal of Animal Science**, v.31, n2, p. 566-573, 2002.
- MICHAEL, F.R., KOSHIO, S., TESHIMA, S., ISHIKAWA, M., UYAN, O. Effect of choline and methionine as methyl group donors on juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. **Aquaculture**, v. 258, p. 521-528, 2006.
- MACINTOSCH, D.J. LITTLE, C.D. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: BROMAGE, N.R.; ROBERTS, R.J. **Broodstock management and egg and larval quality**. London: Blackwell Science Ltd, 1995, p. 1-20.
- MAI, K. et al. Dietary choline requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v.289, p.124-128, 2009.

- NORDRUM, S.; KROGDAHL, A.; ROSJO C.; OLLI, J.J.; HOLM, H. Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon *Salmo salar* L. under pair-feeding regime. **Aquaculture**, v.186, p.341–360, 2000.
- NRC. **Nutrient Requirements of warmwater fishes and shellfishes**. Washington : National Academy, 102p, 1993.
- NOSE, T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus*) L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). **Bull. Freshwater Fish. Res Lab.**, v.10, p.11-22. 1960.
- ROBERTS, R.J. **Fish Pathology**. 3rd.ed. London: W.B. Saunders, 2001. 495p.
- ROEM, A.J.; STICKNEY, R.R.; KOHLER, C.C. Vitamin requirements of blue tilapias in a recirculating water system. **The Progressive Fish-Culturist**, v.52, p.15-18, 1990b.
- ROWLERSON, A.; MASCARELLO, F.; RADAELLI, G. et al. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching til adult. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.16, p.223-236, 1995.
- RUMSEY, G.L. Choline-betaine requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.95, p.107-116, 1991.
- SANTOS, N. P. **Regeneração hepática em bagre africano (*Clarias gariepinus*) após hepatectomia parcial**. 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2003.
- SHIAU, S. Y.; LO, P. S.. Dietary choline requirements of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Nutrient Requirements – Short Communication, Journal of Nutrition**, p.100-103, 2000.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C. et al. **Zoologia geral**. 6.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p.76-103
- SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **DUKES: Fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 1996, 856p.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology. Normal and Pathological Features**. 2nd.ed. New York: Fisher, 1995. 195p..
- THOMSON, R. G. **Patologia geral veterinária**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 412p.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B.J.; CACECI, T. et al. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v.182, p.317-327, 2000.
- TWIBELL, R.G.; BROWN, P.B. Dietary choline requirement of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). **Journal Nutrition**, v.130, p.95-99, 2000.
- VEGGETTI, A.; MASCARELLO, F.; SCAPOLO, P.A. et al. Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish, *Poecilia reticulata* (Peters) (Atheriniformes, Poeciliidae): a histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. **Anatomy Embryology**, v.187, p.353-361, 1993.
- VINCENTINE, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINE, I. B.; BOMBONATO, M. T. S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA, S. G.; SANTOS, A. S. Morphological study of the

- liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Morphology**, v. 23, n.3, p.211-216, 2005.
- VIEIRA, I.; CYRINO, J.E.P.; PEZZATO, L.E. Colina e betaína em Rações Purificadas na Nutrição da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada a USP/ESALQ – Piracicaba – SP. **Scientia Agrícola**, v.58, n.4, p. 675-680, 2001.
- WILSON, R.P.; POE, W.E. Choline nutrition of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, v.68, p.65-71, 1988.
- WU, G., DAVIS, A. Interrelationship among methionine, choline, and betaine in *Channel catfish*, *Ictalurus punctatus*. **Journal of World Aquaculture Society**, v.36, p.337–345, 2005.
- ZEISEL, S.H. Choline: an essential nutrient for humans. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.669-671, 2000.
- ZHANG, Z.; WILSON, R.P. Reevaluation of the choline requirement of fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and determination of the availability of choline in common feed ingredients. **Aquaculture**, v.180, p.89-98, 1999.
- ZHOU, Q.C., WU, Z.H., TAN, B.P., CHI, S.Y., YANG, Q.H. Optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v.258, p.551-557, 2006.

APÊNDICE

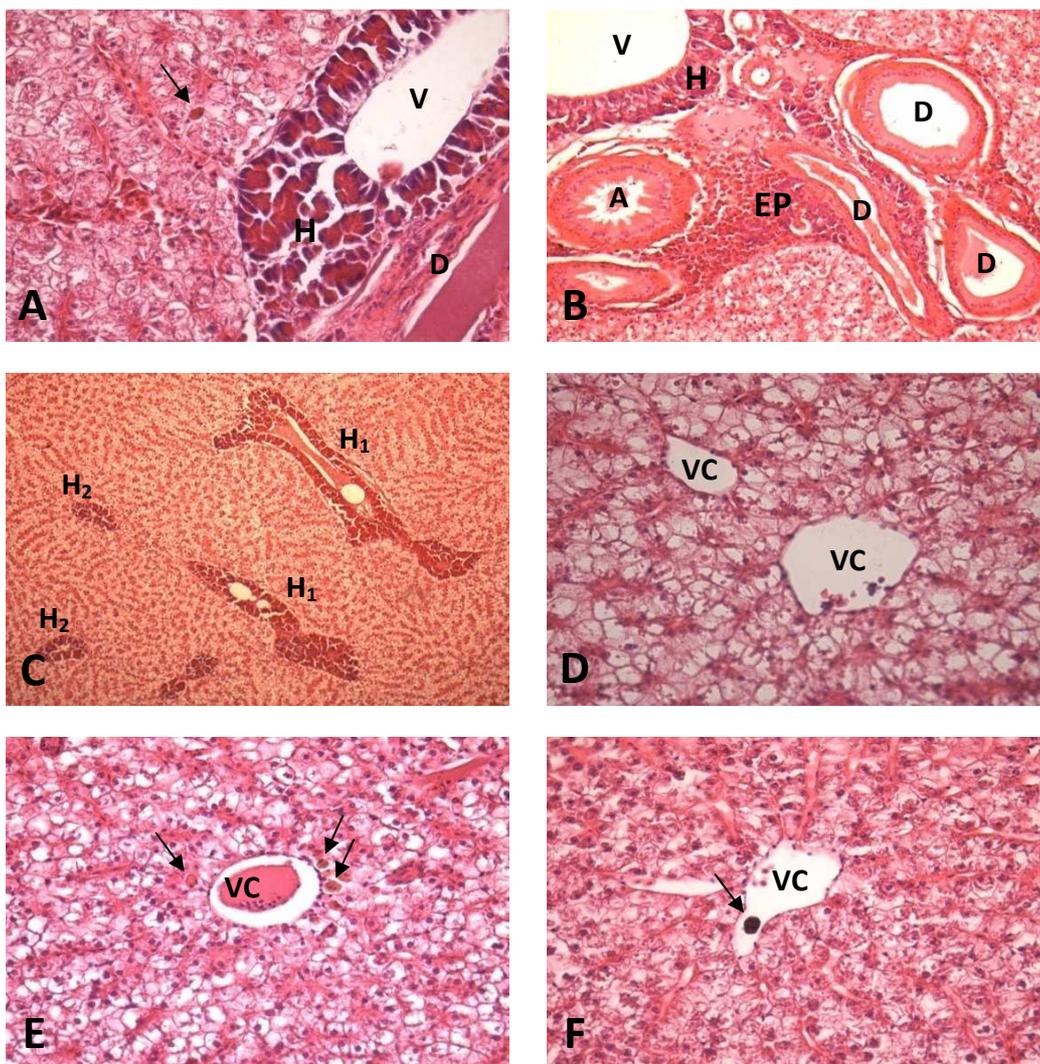


Figura 4 Morfologia hepática de tilápia-do-nylo. **A:** hepatopâncreas (H) associado à veia (V) e ducto (D), melano-macrófago (seta), 400X. **B:** espaço porta (EP) – tríade de veia (V), artéria (A) e ductos (D) associados ao hepatopâncreas (H), 200X. **C:** hepatopâncreas associado a ducto e veia (H₁), hepatopâncreas associado à veia porta (H₂), 100X. **D:** veias centrolobulares (VC), 400X. **E:** melano-macrófagos (setas) ao redor da veia centrolobular, 400X. **F:** melano-macrófagos (seta) no interior da veia centrolobular, 400X. HE.

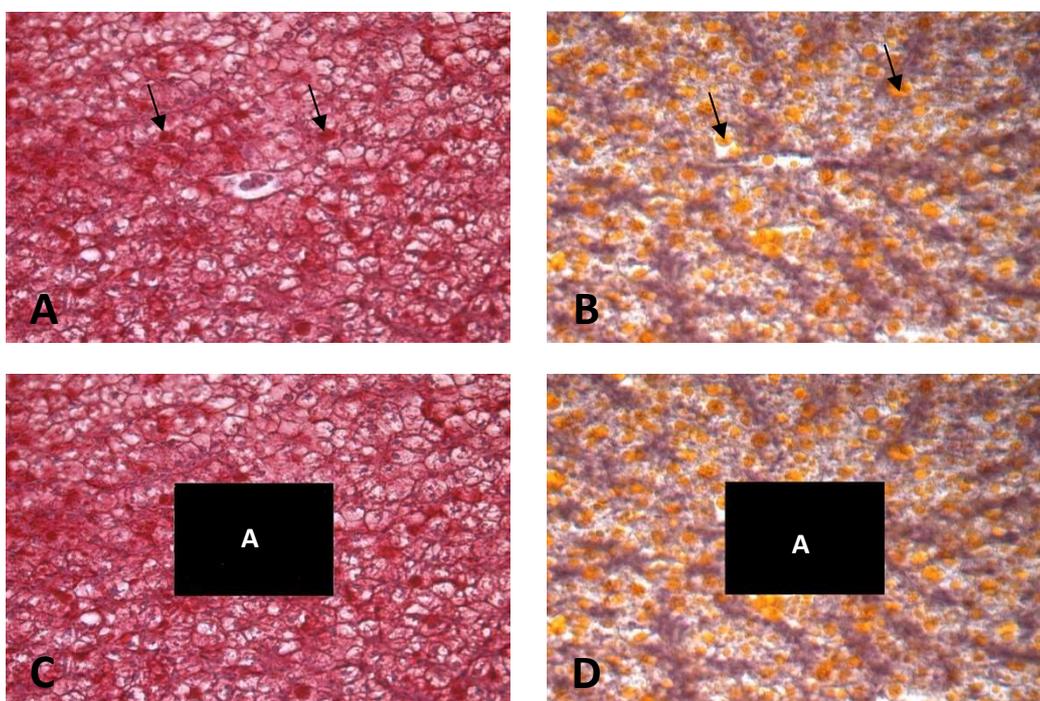


Figura 5 Tecido hepático de tilápia-do-nilo. **A:** histoquímica P.A.S. para evidenciação de inclusões glicogênicas (cor vinho, seta). **B:** técnica histoquímica Sudan III para evidenciação de inclusões lipídicas (cor laranja, seta). **C e D:** imagem do campo microscópico avaliado para as técnicas histoquímicas P.A.S. e Sudan III, respectivamente, subtraída da área ocupada pela veia centrolobular (A).

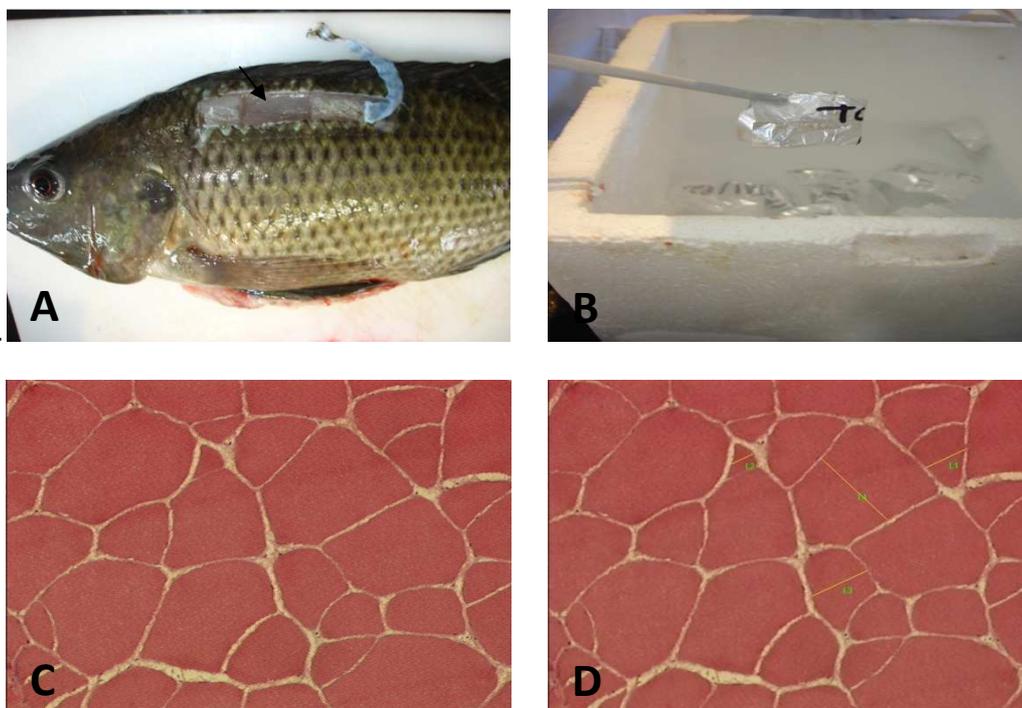


Figura 6 Músculo branco de tilápia-do-nylo. **A:** músculo dorsal. **B:** amostra de tecido muscular congelado em nitrogênio líquido. **C:** cortes transversais das fibras musculares brancas, visão geral. **D:** mensuração do menor diâmetro da célula muscular pelo programa analisador de imagens Image Pro-Plus 4.5.1[®]. HE, 100X.