

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EXIGÊNCIA DE ISOLEUCINA E INTERAÇÃO ENTRE  
AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EM DIETAS PARA  
ALEVINOS DE TILÁPIAS DO NILO

Autor: Fabrício Eugênio Araújo  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Salaro

Maringá  
Estado do Paraná  
Julho – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EXIGÊNCIA DE ISOLEUCINA E INTERAÇÃO ENTRE  
AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EM DIETAS PARA  
ALEVINOS DE TILÁPIAS DO NILO

Autor: Fabrício Eugênio Araújo  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya  
Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Salaro

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração: Produção Animal.

Maringá  
Estado do Paraná  
Julho – 2018

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

Aradjo, Fabricio Eugênio  
D213o Exigência de isoleucina e interação  
entre aminoácidos aromáticos em dietas  
para alevinos de tilápias no nilo /  
Fabricio Eugênio Aradjo. -- Maringá, 2018.  
92 f.; Il.; color tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu  
Furuya.  
Coorient.: Profa. Dra. Ana Lúcia Salaro

Tese (doutorado em Zootecnia)-  
Universidade Estadual de Maringá, Programa  
de Pós-graduação em Zootecnia.

1.Tilápias no nilo. 2.Modelo Broken-  
line.3.Nutrigenômica. 4.Retenção de  
aminoácido. 5. Aquicultura. I.Furuya,  
Wilson Massamitu Furuya, orient. II.  
Universidade Estadual de Maringá. Programa  
de Pós-graduação em Zootecnia. III.  
Titulo.

21.ed. 6393774

Cicilia Conceição de Maria  
CPF9- 1066  
CC-003856



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXIGÊNCIA DE ISOLEUCINA E RELAÇÃO  
ENTRE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EM DIETAS  
PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO

Autor: Fabricio Eugênio Araújo

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção Animal

APROVADA em 10 de julho de 2018.

Prof. Dr. Wilson Rogério Buscolo

Prof. Dr. Fabio Bittencourt

Prof. Dr. Raquel Abdallah da  
Rocha Oliveira

Prof. Dr. Victor Breno Pedrosa

Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya  
Orientador

*No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade*  
**Albert Einstein**

Aos meus pais Sérgio e Lúcia, por todo o incentivo e conselho, pelo exemplo de  
humildade.

Aos meus irmãos Rafael e Rodrigo, que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus familiares, pelos momentos de alegrias.

Aos meus amigos, que sempre estiverem me fortalecendo diante das dificuldades.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar minha caminhada em todo esse processo de aprendizagem.

Aos meus pais, pelo apoio financeiro e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Doutor Wilson Massamitu Furuya, por acreditar no meu trabalho, dando as direções para realização de toda a pesquisa e o conhecimento passado.

À minha Coorientadora Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Salaro, pelo apoio no decorrer da pesquisa e pelos ensinamentos adquiridos.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, por proporcionar um ensino de excelência, com professores capacitados.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, por disponibilizar o espaço físico, indispensável para a execução do projeto de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo.

À Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, pela doação e análises dos aminoácidos.

Aos professores Marcelo Vicari e Viviane Nogaroto Vicari, por disponibilizarem estrutura necessária para as análises de expressão gênica.

Ao professor Luiz Vitor Oliveira Vidal, da Universidade Federal da Bahia, pelo ajuste da equação para determinação da exigência de isoleucina.

À Mariana Michelato, pelo treinamento na condução da pesquisa, auxílio na redação e revisão da tese

À mestrandia Bianca Letícia Richter, PhD Mariana Michelato, Dr<sup>a</sup>. Michelle Orane, Dr<sup>a</sup>. Viviane Nogaroto Vicari, Dr. Marcelo Ricardo Vicari, Dr. Ricardo Ayub e Dr<sup>a</sup>. Carolina Weigert Galvão, pelas análises da expressão de genes.

Aos colegas de curso que participaram de forma direta ou indireta na execução da pesquisa científica.

Aos meus amigos que fiz ao decorrer do curso, meu muito obrigado pelos conselhos, momentos de alegria e o conhecimento adquirido, em especial, Karla, Johnny, Bianca, Tânia, Allan, Jonathan, Dayane, Marcel, Kennyson, Thomer, Eline, Naemi, Vanessa, Alessandra e os demais.

Ao Grupo de Pesquisa em Aquicultura, pelo convívio e o excelente trabalho na formação de recursos humanos e pesquisas na área de aquicultura.



## **BIOGRAFIA**

FABRÍCIO EUGÊNIO ARAÚJO, filho de Sérgio Eugênio de Araújo e Lúcia Helena de Araújo, nasceu em Rolim de Moura, Rondônia, no dia 08 de outubro de 1986.

Em agosto de 2007, conclui o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual do Mato Grosso.

Em março de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Federal da Grande Dourados, realizando estudos na área de bem-estar e ambiência e nutrição com frangos de corte. Em novembro de 2014, submeteu-se a banca para defesa da Dissertação.

Em março de 2015, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na área de nutrição de peixes.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
I. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Tilápia do Nilo .....	3
2.2 Proteína .....	4
2.3 Aminoácidos .....	5
2.3.1 Isoleucina .....	8
2.3.2 Valina .....	10
2.3.3 Leucina .....	11
2.4 Expressão gênica .....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17
OBJETIVOS .....	23
II - Exigência de isoleucina para alevinos de tilápias do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) com base no desempenho produtivo, retenção corporal de aminoácidos e expressão de genes MyoD, MyoD e mTOR .....	24
Introdução .....	26
Material e métodos .....	27
Local de realização e instalações experimentais .....	27
Diets e manejo alimentar .....	28
Coleta de amostra e análise laboratorial .....	30
Variáveis de desempenho .....	31
Expressão gênica .....	31
Análise estatística .....	33
Resultados .....	34
Discussão .....	44
Referências .....	48
III – Desempenho produtivo e retenção corporal de aminoácidos de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com dietas com diferentes relações entre aminoácidos aromáticos .....	53
Introdução .....	55
Material e métodos .....	56
Local de realização e instalações experimentais .....	56

Dietas e manejo alimentar .....	56
Coleta de amostra e análise laboratorial.....	59
Cálculos.....	60
Análise estatística.....	60
Resultados .....	61
Discussão.....	70
Referências .....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	76

## LISTA DE TABELAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
<b>Tabela 1:</b> Aminoácidos essenciais e não essenciais para peixes .....	6
Exigência de isoleucina para alevinos de tilápias do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) com base na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e desempenho produtivo	
<b>Tabela 1:</b> Formulação e composição química das dietas experimentais ( $g\ kg^{-1}\ diet$ )	29
<b>Tabela 2:</b> Composição de aminoácido das dietas experimentais ( $g\ kg^{-1}\ dry\ diet$ ) .....	30
<b>Tabela 3:</b> Primers usados para qRT – PCR.....	33
<b>Tabela 4:</b> Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de isoleucina <sup>1</sup> .....	35
<b>Tabela 5:</b> Composição aproximada corporal ( $g\ 100\ g^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de isoleucina dietética <sup>1</sup> .....	38
<b>Tabela 6:</b> Composição de aminoácidos corporais ( $g\ 100\ g^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de isoleucina dietética <sup>1</sup> .....	39
<b>Tabela 7:</b> Retenção de aminoácido corporal ( $g\ 100\ g^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de isoleucina <sup>1</sup> .....	41
Desempenho produtivo e retenção corporal de aminoácidos de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com dietas com diferentes relações entre aminoácidos aromáticos	
<b>Tabela 1:</b> Formulação e composição química das dietas experimentais ( $g\ kg^{-1}\ diet$ )	58
<b>Tabela 2:</b> Composição de aminoácido das dietas experimentais ( $g\ kg^{-1}\ dry\ diet$ ) .....	59
<b>Tabela 3:</b> Desempenho de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos. ....	62
<b>Tabela 4:</b> Composição aproximada corporal ( $g\ 100\ g^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos .....	65
<b>Tabela 5:</b> Composição corporal de aminoácidos corporais ( $g\ 100\ g^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos .....	67
<b>Tabela 6:</b> Retenção corporal de aminoácidos ( $g\ 100\ g^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos .....	68

## LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
<b>Figura 1:</b> Conformação dos aminoácidos $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ .....	5
<b>Figura 2:</b> Função dos aminoácidos no crescimento, desenvolvimento e saúde dos peixes.....	7
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da isoleucina (Nelson e Cox, 2014).....	9
<b>Figura 4:</b> Estrutura química da valina (Nelson & Cox, 2014).....	10
<b>Figura 5:</b> Estrutura química da leucina (Nelson & Cox, 2014).....	12
<b>Figura 6:</b> Mecanismos de detecção de aminoácidos na musculatura esquelética (Moro et al., 2016). .....	12
<b>Figura 7:</b> Modelo esquemático da miogênese do peixe (Vélez et al. 2016). .....	15
<b>Figura 8:</b> Esquema representativo da via do IGFs para controlar a entrada de alimento, síntese proteica e proliferação das células musculares (Vélez et al. 2017). .....	16
Exigência de isoleucina para alevinos de tilápias do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) com base na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e desempenho produtivo	
<b>Figure 1:</b> Relação Broken-line entre o ganho de peso de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de isoleucina.....	36
<b>Figura 2:</b> Expressão dos genes MyoD, MyoG (miogenina) e mTOR da musculatura branca de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de isoleucina. Letras diferentes entre as colunas diferem entre si. NS= não significativo).....	43
Desempenho produtivo e retenção corporal de aminoácidos de alevinos de tilápias do Nilo alimentados com dietas com diferentes relações entre aminoácidos aromáticos	
<b>Figura 1:</b> Ganho de peso de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos. ....	63
<b>Figura 2:</b> Retenção de proteína em tilápias do Nilo alimentadas com dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos. ....	63
<b>Figura 3:</b> Retenção corporal de isoleucina (A), leucina (B) e valina (C) em tilápias do Nilo alimentadas com dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos. ....	69
<b>Figura 4:</b> Nitrogênio excretado por quilograma de ganho de peso por alevinos de tilápias do Nilo alimentados com dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos. ....	70

## RESUMO

Dois experimentos foram realizados para determinar a exigência de isoleucina (Experimento I) e avaliar os efeitos da interação de aminoácidos de cadeia ramificada (Experimento II) em dietas para tilápias do Nilo. Experimento I: A presente pesquisa teve como objetivo determinar a exigência de isoleucina para alevinos de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, retenção de aminoácidos e expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular Myod, miogenina e mTOR. Os Peixes ( $n = 280$ , peso corporal inicial de  $2,46 \pm 0,10$  g) foram distribuídos em 24 aquários e alimentados com seis dietas peletizadas isoproteicas ( $264,4 \text{ g kg}^{-1}$  de proteína bruta) e isoenergéticas ( $3072,77 \text{ kcal kg}^{-1}$  energia digestível), contendo 8,5; 11,0; 13,8; 17,0; 20,5 e  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina, durante oito semanas. Não foi observado efeito dos níveis de isoleucina sobre o índice hepatossomático e sobrevivência dos peixes. Peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina apresentaram maior peso corporal final, ganho de peso e melhor conversão alimentar comparados aos peixes alimentados com as demais dietas. A retenção de proteína foi melhor em peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina em relação aos peixes alimentados com  $8,5 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina. Com exceção da alanina, treonina e serina, dietas com diferentes níveis de isoleucina influenciaram a retenção de aminoácidos. Peixes alimentados com  $8,5 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina apresentaram menor retenção de histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ácido aspártico, ácido glutâmico e glicina em relação aos peixes que receberam a dieta com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina. Peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina apresentaram maior expressão do gene MyoG, mas não foi observado efeito da isoleucina sobre a MyoD. Com base na análise de regressão pelo modelo *Broken-line* dos dados de ganho de peso em relação aos níveis de isoleucina dietética foi determinada exigência de  $13,46 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina. Experimento II: Os efeitos de dietas contendo excedentes de isoleucina, leucina e valina de forma isolada ou combinada foram avaliados em dieta de alevinos de tilápia do Nilo sobre o desempenho produtivo, composição corporal e retenção de aminoácidos. Os peixes ( $n = 320$ , peso inicial médio de  $1,70 \pm 0,88$  g) foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao

acaso com cinco tratamentos e quatro repetições. Foi elaborada dieta basal contendo 281,36 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta e 4490,85 kcal kg<sup>-1</sup> de energia bruta (Controle). A partir da dieta basal foram elaboradas quatro dietas com excesso (dobro da exigência dietética) de isoleucina (+Ile), leucina (+Leu), valina (+Val) ou Ile, Leu e Val (+BCAA). Foi observado maior peso final e ganho de peso em peixes alimentados com as dietas controle e +BCAA em comparação com os peixes alimentados com as demais dietas. Foi observada menor retenção de proteína em peixes alimentados com as dietas +Ile, +Leu, +Val e +BCAA em relação ao observado com peixes alimentados com a dieta controle. Apesar de não observar diferenças no ganho de peso dos peixes alimentados com a dieta controle e +BCAA, ocorreu maior deposição de gordura corporal nos peixes alimentados com a dieta +BCAA, indicando a oxidação de aminoácidos para produzir energia ao invés da síntese de proteína. Não foi observado antagonismo entre os aminoácidos aromáticos, sendo que os excessos de isoleucina, leucina e valina afetaram negativamente apenas a retenção do próprio aminoácido suplementado em excesso. Peixes alimentados com a dieta controle excretaram menos nitrogênio em relação aos que consumiram as demais dietas. Concluiu-se que não ocorre antagonismo entre os aminoácidos aromáticos em dietas para alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas com excesso de aminoácidos aromáticos, sendo importante considerar o balanceamento de aminoácidos aromáticos para melhorar a utilização dos aminoácidos dietéticos e otimizar o desempenho produtivo e a sustentabilidade da criação de tilápias.

**Palavra-chave:** aquicultura, crescimento muscular, retenção de aminoácidos, nutrigenômica, peixe

## ABSTRACT

Two experiments were carried out to determine the dietary isoleucine requirement (Experiment I) and evaluate the effects of branched-chain amino acids (BCAA) for Nile tilapia fingerlings. Experiment I: The objective of this study was to determine the dietary isoleucine requirement for Nile tilapia fingerlings based on growth performance, amino acids retention and expression of muscle-growth related Myod and Myogenin and mTOR genes. Fish ( $n = 280$ , initial body weight of  $2.46 \pm 0.10$  g) were distributed into 24 aquariums and fed with six isoproteic diets ( $264.4 \text{ g kg}^{-1}$  crude protein) and isoenergetic ( $3072.77 \text{ kcal kg}^{-1}$  digestible energy), containing 8.5, 11.0, 13.8, 17.0, 20.5 and  $23.4 \text{ g kg}^{-1}$  of isoleucine, for eight weeks. No effects of dietary isoleucine levels on initial weight, hepatosomatic index and survival rate were observed. Fish fed  $13.8 \text{ g kg}^{-1}$  of isoleucine showed higher body weight, weight gain and improved feed conversion ratio compared to fish fed with other diets. Protein retention was higher in fish fed  $13.8 \text{ g kg}^{-1}$  isoleucine than the one fed  $8.5 \text{ g kg}^{-1}$  isoleucine. With the exception of alanine, threonine and serine, diets containing graded levels of isoleucine influenced the amino acids retention. Fish fed  $8.5 \text{ g kg}^{-1}$  of isoleucine showed lower retention of histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, aspartic acid, glutamic acid and glycine compared to those fed diet containing  $13.8 \text{ g kg}^{-1}$  of isoleucine. Fish fed  $13.8 \text{ g kg}^{-1}$  of isoleucine showed higher expression of MyoG gene, but no dietary isoleucine effect was observed on MyoD. Based on regression analysis by the Broken-line model of weight gain in relation to dietary isoleucine levels, a requirement of  $13.46 \text{ g kg}^{-1}$  of isoleucine was determined. Experiment II: The effects of diets containing isolated or combined surplus of isoleucine, leucine and valine were evaluated in Nile tilapia fingerlings on growth performance, body composition and amino acids retention. Fish ( $n = 320$ , with average initial weight of  $1.70 \pm 0.88$  g) were allotted in an entirely randomized design composed by five treatments and four replicates. A basal diet containing  $281.36 \text{ g kg}^{-1}$  of crude protein and isoenergetic diets ( $4490.85 \text{ kcal. kg}^{-1}$  of gross energy) was elaborated (Control), and four more diets with excess (two-fold the dietary requirement) of isoleucine (+Ile), leucine (+Leu), valine (+Val) and isoleucine, leucine and valine (+BCAA) were elaborated. There was higher final weight and weight gain in fish fed control and +BCAA diets compared to those fed other diets. Lower protein retention in fed +Ile, +Leu, +Val and +BCAA compared to observed in fish fed control diet was observed. Despite of no significative differences on weight gain in fish



fed control and +BCAA diet, higher body lipid was observed in fish fed +BCAA that indicated amino acids oxidation to produce energy rather than protein synthesis. No antagonism was observed between the aromatic amino acids, and the excess of isoleucine, leucine and valine adversely affect the retention of excess amino acid supplemented itself. Fish fed with control diet excreted less nitrogen than those who consumed the other diets. It was concluded that there is no antagonism between aromatic amino acids in diets for Nile tilapia fingerlings fed with excess of them, and it is important to consider the balancing of aromatic amino acids to improve the use of dietary amino acids and to optimize the productive performance and sustainability of tilapia farming.

**Key words:** aquaculture, muscle development, amino acids retention, nutrigenomics, fish

## I. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura vem se destacando não somente pela extensão de lâminas d'água, mas pelo aperfeiçoamento das técnicas empregadas em um sistema de criação, desde o manejo reprodutivo, sanitário e alimentar. No qual 50% a 70% dos custos totais de produção estão relacionados com a alimentação e nutrição dos organismos aquáticos. Dentre os principais países produtores de pescado está a China, com 2.318.046 toneladas em 2016, já o Brasil é o 13º com 225.000 toneladas (FAO, 2017).

Em 2013 a aquicultura brasileira alcançou a produção total de 476.522,00 toneladas, sendo que na piscicultura a produção foi de 392.493,00 toneladas, representando 82% da produção nacional, com destaque para as regiões Nordeste (29%), Sul (23%), Centro-oeste (22%), Norte (15%) e Sudeste (11%). É estimado que em 2030 a aquicultura será responsável por mais de 60% da produção mundial de pescado (MPA, 2015; FAO, 2017; IBGE, 2016).

Os peixes mais utilizados na aquicultura nacional são a tilápia (43%), tambaqui (23%) e o tambacu e tambatinga (15%), sendo que a tilápia contribui com 35% na produção aquícola, e representou 83% na piscicultura. O crescimento da produção de tilápias, no Brasil, é contínuo desde 1994, com taxa média anual de 70,4% (SEBRAE, 2015). Esse crescimento ocorre pela adaptação da tilápia as diferentes condições climáticas, manejo e sistemas de criação. Uma das características dessa espécie é a boa conversão alimentar, por consumir dieta comercial desde a fase larval (Meurer et al., 2008) e utilizar eficientemente os carboidratos como fonte de energia (Tengjaroenkul et al., 2000). Sua carne tem características que favorecem o seu comércio, com sabor e textura firme (FAO, 2017).

Frente a este cenário, para garantir tais características nos peixes, é importante o estudo da nutrição e alimentação das espécies aquícolas, em especial da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que é uma das espécies mais pesquisadas. Vários são os alimentos disponíveis na dieta dos peixes, contudo é preciso conhecer o seu valor nutricional, ter boas condições de alojamento do alimento, saber a idade e o tamanho do peixe e o estado fisiológico, pois esses fatores influenciam na exigência nutricional

(Boscolo et al., 2011). Conhecer o nível adequado de energia e nutrientes é importante para o sucesso na criação de peixes. Além disso, os aminoácidos essenciais, provenientes da proteína, devem estar disponíveis em quantidades e proporções adequadas para atender as exigências nutricionais dos animais (Pezzato et al., 2004).

Determinar as exigências de aminoácidos é importante para o desempenho e saúde dos peixes. Nos últimos anos, além do ganho de peso e conversão alimentar, o rendimento de filé e a qualidade da carne têm sido considerados nas pesquisas realizadas para determinar as exigências de aminoácidos em peixes (Furuya, 2013). Com a disponibilidade de aminoácidos industriais, há possibilidade de suplementação para atender as exigências quantitativas e evitar antagonismos entre aminoácidos.

Uma ferramenta eficaz nos estudos de exigência nutricional de peixes é a expressão de genes. Tal fato tem sido evidenciado em estudos com genes relacionados ao crescimento muscular, enzimas metabólicas e digestivas (Honorato et al., 2011; Zhao et al., 2012). Esses genes podem explicar como o crescimento muscular e a síntese proteica estão ocorrendo, quando uma dieta é fornecida para atender a exigência de uma espécie em estudo. No entanto, ainda faltam pesquisas sobre as exigências de isoleucina e sua relação com os aminoácidos de cadeia ramificada em rações para tilápias. Dessa forma a pesquisa teve como objetivo estimar a exigência de isoleucina e a interação entre os aminoácidos aromáticos, por meio da avaliação de desempenho e expressão de genes em tilápias do Nilo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo pertence à família *Cichlidae* e subfamília *Pseudocrenilabrinae*, sendo originária da África, introduzida na América do Sul e sul da América do Norte. Entre as espécies de tilápia temos, a *Tilapia rendalli*, *Tilapia zilli*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis niloticus* e *Oreochromis urolepis hornorum* (Stickney, 1997; Beveredge e Mcandrew, 2000; Ribeiro, 2001; Wagner et al., 2004). No Brasil, ela se concentra no sul e sudeste, tendo origem da Costa do Marfim em 1971, e criada na Bacia do Rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (Fulber et al., 2009).

A tilápia do Nilo foi a espécie escolhida para ser utilizada em um programa de melhoramento genético, em 1988, na Malásia, por pesquisadores do *World Fish Center* (Fulber et al., 2009). A aplicação da genética e dos programas de melhoramento genético tem alavancado a produção, por selecionar espécies modificadas e adaptadas a diferentes condições ambientais e de criação, surgindo dessa forma a linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), que marcou a história do melhoramento genético em peixes tropicais (Gupta e Acosta, 2004). Com o objetivo de explorar outras regiões e condições adversas, a linhagem GIFT foi introduzida no Brasil em 2005, com o intuito de avaliar o seu desempenho em outras condições de criação e manejo. Foram recebidos 600 indivíduos pelo Centro de Pesquisa em Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá, UEM/Codapar em parceria com a *World Fish Center*, com apoio da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca – SEAP, que logo depois se tornaria o Ministério da pesca e Aquicultura – MPA (MPA, 2015).

As características dessa espécie foram fundamentais para alavancar a piscicultura, como adaptação climática, potencial de criação em regiões tropicais e subtropicais, rusticidade, rápido crescimento, boa conversão alimentar, precocidade reprodutiva, obtenção rápida de larvas e tolerância às doenças (El-Sayed, 1998; Gupta e Acosta, 2004). Outra característica é a qualidade da carne como a textura e sabor, além de possuir microespinhas que facilitam a filetagem (Schmidt, 1988). Isso permitiu aprimorar novas técnicas de criação, na qual a produção passou de criação tradicional

em viveiros escavados para criação intensiva em tanques-redes, melhorando os parâmetros de desenvolvimento (Furuya, 2013).

Outra característica dessa espécie é seu hábito alimentar onívoro e a facilidade de utilizar eficientemente os carboidratos como fonte de energia (Tengjaroenkul et al., 2000), reduzindo os custos com alimentação pela possibilidade de utilização de ingredientes de origem vegetal. Como a proteína é o ingrediente mais oneroso nas dietas para peixes, o uso de ingrediente de origem vegetal é necessário para reduzir os custos da dieta. Porém é preciso verificar o perfil de aminoácidos, palatabilidade, os macros e micronutrientes, valor biológico assim como os fatores antinutricionais, permitindo ter uma dieta de baixo custo, sem prejudicar o crescimento e a síntese proteica.

Assim, a tilápia do Nilo tem potencial para alavancar a produção brasileira, associada ao bom manejo e o fornecimento de uma dieta balanceada é possível ter bons índices zootécnicos, agregando mais valor ao produto final.

## **2.2 Proteína**

Dentre os nutrientes essenciais para os peixes, a proteína é uma das macromoléculas mais importantes para o seu crescimento (Santos et al., 2010), sendo constituída por uma ou mais cadeias polipeptídicas, com estruturas tridimensionais distintas (Wu, 2013). Os produtos metabólicos de excreção da proteína são poluentes do meio aquático e o desenvolvimento de dietas balanceadas de alta digestibilidade possibilita uma alimentação adequada e, conseqüentemente, menor concentração de poluentes ao ambiente (Almeida et al., 2011; Portz e Furuya, 2013).

A proteína é um dos principais constituintes do tecido dos peixes, representando 65 a 75% da matéria seca corporal, com função de estruturação (músculo, queratina e colágeno), regulação do metabolismo (enzimas e hormônios), transporte (hemoglobina) e defesa do corpo dos peixes (anticorpos). A proteína passa por processos de digestão, para se obter os aminoácidos, estes são absorvidos pela membrana apical do enterócito, e levados pela corrente sanguínea para os órgãos dos peixes (Grosell et al., 2011; Baldisseroto, 2013; Portz e Furuya, 2013). Após absorção, as proteínas são sintetizadas e degradadas na célula pelo turnover proteico intracelular, que vai determinar o equilíbrio de proteína nos tecidos. Outras funções da proteína são, renovação celular, síntese de proteínas imunológicas, gliconeogênese, cicatrização de feridas, reparação tecidual, adaptação as alterações nutricionais e patológicas e respostas imunitárias (Wu, 2009).

Os aminoácidos originados da hidrólise da proteína estão envolvidos com a disponibilidade de proteína na dieta, que vão garantir os dez aminoácidos essenciais para os peixes, assim como para outros animais. O adequado fornecimento de um aminoácido deve atender as exigências de manutenção, reprodução e produção, sendo que a deficiência e o excesso causam efeitos negativos sobre o desempenho produtivo e saúde dos peixes (Furuya et al., 2005).

A principal fonte de proteína na dieta dos peixes é a farinha de peixe, no entanto, diferentes estudos foram realizados para substituir a farinha de peixe por ingredientes de origem vegetal, que possam suprir a necessidade de proteína ou até mesmo suplementados com aminoácidos cristalinos, para garantir a exigência de aminoácidos e o crescimento dos peixes e ajudar a reduzir os custos com alimentação (Fontainhas-Fernandes et al., 1999; Gaber, 2006; Hernández et al., 2010).

### 2.3 Aminoácidos

Os aminoácidos (AA) são substâncias orgânicas que contêm um grupo amina e um grupo ácido, se o grupo amina é ligado ao carbono  $\alpha$ , então o AA é chamado de  $\alpha$ -AA, do mesmo modo se o grupo amina é ligado ao  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -carbono (Figura 1). Em 1806 foi descoberta a asparagina pelos químicos franceses Vauquelin e Robiquet. No entanto, em 1820 a glicina foi o primeiro AA a ser isolado da proteína por hidrólise com ácido sulfúrico pelo químico francês Braconnot. Mais tarde, em 1925, a treonina foi descoberta e foi inserida na lista de 20 Aas, requeridos para a biossíntese da proteína (Wu, 2013).

$\alpha$ -aminoácido

$\beta$ -aminoácido

$\gamma$ - aminoácido

**Figura 1:** Conformação dos aminoácidos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Adaptado de Wu (2013).

Os aminoácidos são classificados em essenciais e não essenciais (Tabela 1), sendo que os AA essenciais não podem ser sintetizados novamente, devendo estar presentes na dieta, enquanto os aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados novamente (Li et al., 2009).

**Tabela 1:** Aminoácidos essenciais e não essenciais para peixes

<b>Aminoácidos essenciais</b>	<b>Aminoácidos não essenciais</b>
Arginina (Arg)	Alanina (Ala)
Fenilalanina (Phe)	Asparagina (Asn)
Histidina (His)	Aspartato (Asp)
Isoleucina (Ile)	Cisteína (Cys)
Leucina (Leu)	Glutamato (Glu)
Lisina (Lys)	Glutamina (Gln)
Metionina (Met)	Glicina (Gly)
Treonina (Thr)	Prolina (Pro)
Triptofano (Trp)	Serina (Ser)
Valina (Val)	Tirosina (Tyr)

Fonte: Adaptado de Li et al. (2009).

A digestão e absorção dos aminoácidos dietéticos dependem de diversos fatores relacionados com a dieta, qualidade da água, idade e espécie do peixe. Os AA são absorvidos na membrana apical do enterócito, a principal célula da mucosa intestinal. Essa absorção pode ocorrer por transporte passivo e transporte ativo, enquanto os grandes peptídeos e proteínas intactas podem ser absorvidas pelos enterócitos via pinocitose (NRC, 2011).

A absorção ativa ocorre conjuntamente com a absorção de sódio ( $\text{Na}^+$ ), por transportadores não dependentes de  $\text{Na}^+$ , o qual depende de um gradiente de concentração ativo e favorável a entrada de  $\text{Na}^+$  na célula, a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Desta forma os AAs livres e os pequenos peptídeos se ligam a esse transportador que acaba por carregar ambos para dentro da célula. O transporte dos pequenos peptídeos para dentro da célula é mais rápido que os AAs livres, isso pode reduzir o catabolismo dos peptídeos e melhorar o balanço dos aminoácidos para a circulação (Wu, 2013). Alguns AAs são absorvidos por mecanismos dependente de  $\text{H}^+$ , no qual o cotransporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  favorece a entrada dos AAs. Caso dois AAs sejam absorvidos pelo mesmo transportador, a presença de grande quantidade de um dos aminoácidos inibe a absorção do outro. Esse fato é minimizado, pois pode ocorrer a absorção de alguns aminoácidos por mais de um tipo de transportador. No interior dos enterócitos outros aminoácidos passam para os capilares sanguíneos por difusão facilitada, chegando até o fígado (Rotta, 2003; Baldisserotto, 2013).

No fígado, ocorre a degradação dos AAs que se inicia com a remoção dos grupos  $\alpha$ -amino, por reações enzimáticas, realizadas pelas enzimas aminotransferases ou transaminases, e o grupo  $\alpha$ -amino é transferido para o carbono  $\alpha$  do  $\alpha$ -cetoglutarato, liberando o  $\alpha$ -cetoácido, um análogo do aminoácido. As reações de transaminação só funcionam graças ao grupo prostético, o piridoxal-fosfato (PLP), um carregador intermediário de grupos amino. Essa reação tem como objetivo coletar grupos aminos de diferentes aminoácidos, na forma de L-glutamato (Nelson e Cox, 2014).

O glutamato passa por desaminação oxidativa na mitocôndria pela L-glutamato-desidrogenase. A amônia gerada nesse processo se combina com o glutamato produzindo glutamina, pela ação da glutamina-sintetase, para ser transportada até o fígado ou aos rins e então excretada na forma de amônia pelos peixes (Nelson e Cox, 2014). Além da glutamato desidrogenase, a alanina aminotransferase e a aspartato aminotransferase são fundamentais nas etapas de transaminação (Engelking, 2015).

Uma dieta que atende a exigência de todos os AA é necessária para permitir o adequado crescimento dos peixes. Além do crescimento, os AAs possuem diversas funções (Figura 2).



**Figura 2:** Função dos aminoácidos no crescimento, reprodução, qualidade do pescado e saúde dos peixes. Adaptado de Li et al. (2009).

A exigência para a maioria dos aminoácidos essenciais é disponível para um número limitado de espécies, e dentro de uma faixa de criação muito explorada (Wilson, 2002; Tibaldi e Kaushik, 2005; Furuya, 2010; NRC, 2011). Visto que o ganho de proteína nos tecidos está associado com esses AA, para ocorrer o acréscimo da proteína e manter o *pool* de proteína do animal em equilíbrio, é preciso gerar novos estudos em



busca da exigência de AA, para otimizar o uso da proteína na dieta, direcionada para as diversas fases da vida do peixe (NRC, 2011). Deficiência ou excesso de AA na dieta acarreta em baixa ingestão alimentar, perdas econômicas e poluição da água, podendo ocasionar o antagonismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) assim como os demais aminoácidos (Kaushik e Seiliez, 2010). Isso pode comprometer a absorção intestinal de AA e transporte por células extraintestinais, distúrbio do metabolismo dos aminoácidos e homeostase, redução das moléculas de sinalização e produção excessiva de substâncias tóxicas (Wu, 2013).

O antagonismo, ação oposta e adversa dos AA, também está ligado ao desbalanceamento dos nutrientes na dieta, levando a deficiência dos mesmos. Ocorre entre AAs relacionados quimicamente ou estruturalmente (isoleucina-leucina-valina, entre outros) e pode ser evitado pela adição de um AA similar quimicamente ou estruturalmente (Kaushik e Seiliez, 2010; Wu, 2013).

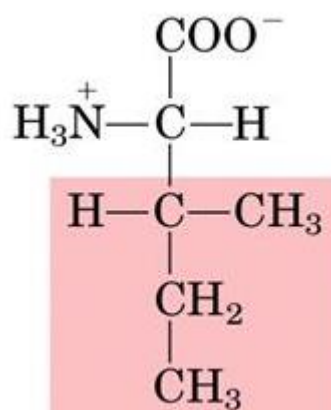
O excesso de leucina pode ocasionar efeitos antagônicos com os aminoácidos de cadeia ramificada, podendo ser aliviado pela adição de isoleucina e valina, evitando os efeitos adversos sobre o desempenho e o metabolismo dos aminoácidos (Yamamoto et al., 2004), devido aos níveis de  $\alpha$ -cetoisocaproato da leucina regular o aumento da atividade da desidrogenase de cadeia ramificada e diminuir as concentrações plasmáticas do  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerato e  $\alpha$ -cetoisovalerato da isoleucina e valina, respectivamente resultando em maior catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada e menor síntese proteica (Shinnick e Harper, 1977; Murakami et al., 2005). Esse efeito pode variar em razão da espécie, fatores fisiológicos e ambientais e estágio de desenvolvimento.

Portanto, o desenvolvimento de estratégias efetivas, como a formulação de dietas práticas e a suplementação dietética de AA leva ao equilíbrio dos nutrientes, evitando respostas indesejáveis (Wu, 2013). Como é o caso da isoleucina, leucina e valina, que precisam estar em equilíbrio, para evitar que uma destes AAs prejudiquem a absorção do outro, e assim garantir o desenvolvimento dos peixes, sendo este AAs o foco da pesquisa.

### 2.3.1 Isoleucina

A isoleucina é um aminoácido essencial (Figura 3), contribuindo para um adequado crescimento, funcionamento fisiológico, entre outras funções nos peixes. Uma de suas principais funções é a síntese de glutamina e alanina, biossíntese e secreção de

insulina e o balanço entre os aminoácidos de cadeia ramificada, constituídos pela isoleucina, leucina e valina (Kimball e Jefferson, 2006; Wu, 2009), que reduz o estresse oxidativo (Katayama e Mine, 2007; Chen et al., 2009), melhora a retenção de aminoácidos e o crescimento dos peixes (Fernstrom, 2005; Ahmed e Khan, 2006).



**Figura 3:** Estrutura química da isoleucina (Nelson e Cox, 2014).

Originada da dieta e do meio intracelular, a isoleucina passa por processos de degradação que visam a separação do grupo  $\alpha$ -amino do esqueleto de carbono e desvia-o para as vias do metabolismo do grupo amino. O catabolismo se inicia com a transaminação, pela aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada, transferindo o grupo  $\alpha$ -amino para o carbono  $\alpha$  do  $\alpha$ -cetoglutarato e liberando o  $\alpha$ -cetoácido de cadeia ramificada,  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerado (Nelson e Cox, 2014; Cole, 2015), que irá sofrer descarboxilação oxidativa pela desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada, para formar 3-metilbutiril-Coa (Wu, 2013).

A isoleucina é um aminoácido cetogênico e glicogênico e sua via catabólica converge para originar acetil-CoA ou succinil-CoA, e podem entrar no ciclo do ácido cítrico para produzir corpos cetônicos. A outra parte do carbono é usada para produção de glicose, o que contribui para atender à exigência de energia pelos peixes (Nelson e Cox, 2014), uma vez que o desbalanceamento deste aminoácido ou qualquer outro pode limitar a síntese proteica, bem como a retenção dos demais aminoácidos (Wu, 2009; NRC, 2011).

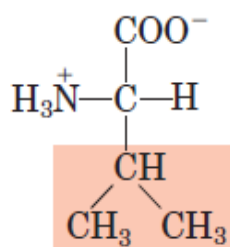
A suplementação de aminoácidos na dieta tem como objetivo atender as exigências nutricionais e reduzir a quantidade de amônia no meio aquático. Em alguns alimentos como a farinha de carne e ossos, a isoleucina se apresenta como AA limitante (Wang et al., 1997), necessitando suplementar para melhorar o ganho de peso, conversão alimentar e eficiência de utilização da proteína da dieta (Li et al., 2009).

A suplementação de isoleucina melhora o crescimento dos peixes, como observado para a tilápia mossambique (*Oreochromis mossambicus*) (Jauncey et al., 1983), carpa rohu (*Labeo rohita*) (Murthy e Varghese 1996; Khan e Abidi 2007), a catla (*Catla catla*) e blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) (Zehra e Khan, 2013; Ren et al., 2017). Sua exigência para peixes varia de 6 a 18 g kg<sup>-1</sup> (NRC, 2011) e pode ser apresentada como porcentagem da dieta, porcentagem da proteína ou g/kg da dieta (Santiago e Lovell, 1988).

A isoleucina regula vias de sinalização de genes específicos envolvidos na síntese proteica muscular (Ren et al., 2017). Em virtude da grande variação das espécies e ingredientes utilizados, é importante determinar a exigência de isoleucina para maximizar o desempenho produtivo considerando a espécie e a fase de crescimento.

### 2.3.2 Valina

A valina é um aminoácido alifático e apresenta um grupo R (Figura 4), que pode variar de apolar e hidrofóbico ao polar e hidrofílico, assim sua cadeia se agrupa no interior da proteína, estabilizando a estrutura proteica por meio de ligações hidrofóbicas. Se assemelha com a isoleucina e leucina, com relação a estrutura e função, encontradas no interior das proteínas e incorporada às enzimas, em que são catalisadas (Wilson, 2002; Nelson e Cox, 2014).



**Figura 4:** Estrutura química da valina (Nelson e Cox, 2014).

A valina melhora as características físicas e o sabor da carne, atua como antioxidante, dá suporte para as células do sistema imune, atua na renovação dos tecidos, manutenção do balanço de nitrogênio, sendo que sua deficiência pode prejudicar todo o funcionamento do metabolismo (Calder, 2006; Rahimnejad e Lee, 2013; Luo et al., 2017; Xiao et al., 2017).

A rota metabólica da valina segue por uma transaminação, na qual a aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada converte o  $\alpha$ -cetoácido de cadeia ramificada em  $\alpha$ -cetoisovalerato (Nelson e Cox, 2014; Cole, 2015). Este irá sofrer

descarboxilação oxidativa pela desitrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada, para formar isobutiril-CoA (Wu, 2013). O isobutiril-CoA é oxidado para formar os quatro carbonos restantes em propionil-CoA e, posteriormente, no intermediário succinil-CoA no ciclo do ácido cítrico, originado do metilmalonil-CoA. Posteriormente sofre epimerização e subsequente conversão em succinil-CoA, pela metilmalonil-CoA-mutase, dependente da coenzima B<sub>12</sub> (Rogerio e Tirapegui, 2008), vitamina B<sub>6</sub>, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, lipoato, biotina e vitamina B<sub>12</sub> (Letto et al., 1986).

A degradação da valina não ocorre no fígado, como nos demais aminoácidos, e sim nos tecidos muscular, adiposo, renal e cerebral. Nestes tecidos existe uma aminotransferase ausente no fígado, que atua sobre este aminoácido para produzir  $\alpha$ -cetoácido. A desidrogenase do  $\alpha$ -cetoácido catalisa a descarboxilação oxidativa do  $\alpha$ -cetoácido, liberando o grupo carboxila como CO<sub>2</sub> e produzindo o derivado acil-CoA. Ainda no músculo, dois produtos são liberados para a circulação, o 2-oxoisovalerato e o 3-hidroxiisobutirato, sendo que este último pode conservar o potencial gliconeogênico da valina (Letto et al., 1986; Nelson e Cox, 2014).

A exigência de valina varia entre 7 a 16 g kg<sup>-1</sup> (Nose, 1979; Wilson et al., 1980; Hughes et al., 1983; Santiago e Lovell, 1988; Rodehutschord et al., 1997; Abidi e Khan, 2004; Ahmed e Khan, 2006) e descrita como porcentagem da proteína dietética a exigência corresponde para 2,8% (Santiago e Lovell, 1988).

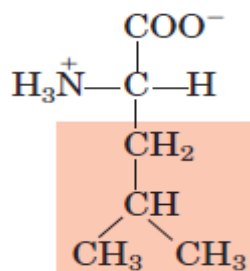
Uma dieta com níveis ideais de valina e os demais aminoácidos essenciais garantem aos peixes boa capacidade para se desenvolverem. No entanto, quando os níveis estão abaixo do exigido o crescimento é prejudicado por limitar o sistema imune dos peixes, ficando vulneráveis a diferentes doenças no meio aquático (Feng et al., 2015).

São poucas as pesquisas sobre a exigência de valina para tilápias. No entanto, devido ao melhoramento genético e mudanças no sistema de criação há necessidade de novos estudos para determinar a exigência nutricional do referido aminoácido.

### 2.3.3 Leucina

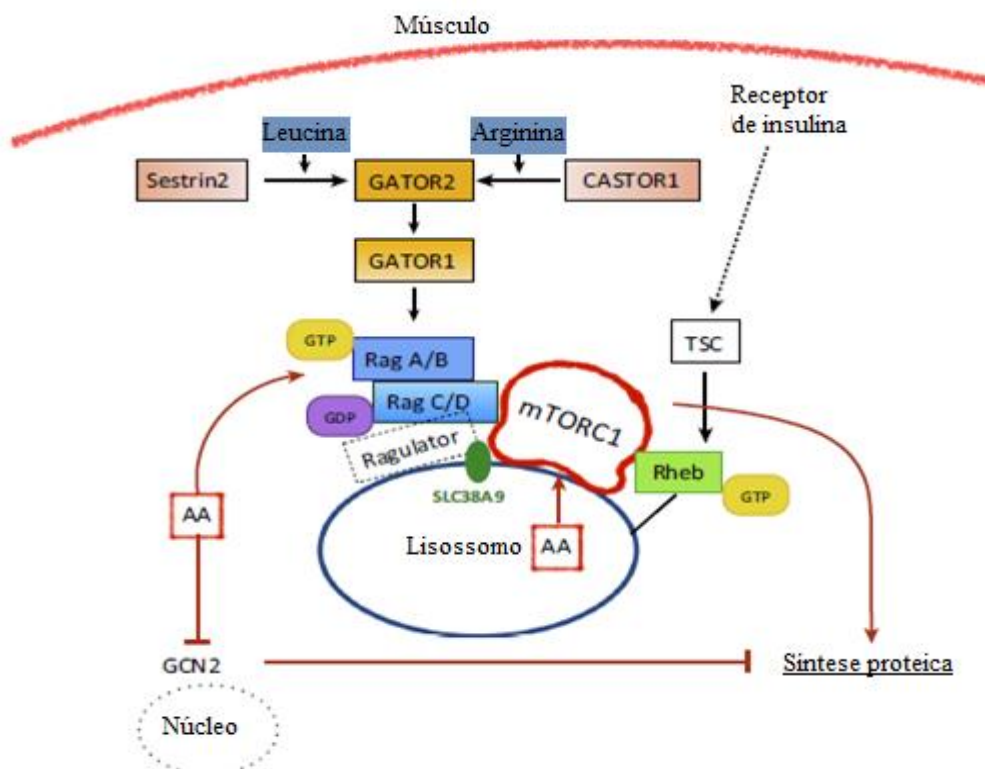
A leucina possui um grupo R apolar e alifático (Figura 5), encontrado no interior das proteínas, com massa constante para que ocorram as ligações peptídicas exigidas em uma sequência de aminoácidos (Nelson e Cox, 2014). É um aminoácido funcional,

assim como a arginina, cisteína, glutamina, prolina e triptofano, pela ação como na utilização dos nutrientes, redução da adiposidade e melhoria na saúde (Wu, 2009).



**Figura 5:** Estrutura química da leucina (Nelson e Cox, 2014)

Além disso, a leucina contribui para a manutenção do balanço de nitrogênio, metabolismo energético, concentração de glicose no sangue, crescimento hormonal, concentração de hemoglobina, tem função importante no crescimento (Norton e Layman, 2006; Deng et al., 2014), sendo um importante estimulador da síntese de proteína muscular e do mecanismo alvo de rapamicina (mTOR) no músculo esquelético (Figura 6).



**Figura 6:** Mecanismos de detecção de aminoácidos na musculatura esquelética (Moro et al., 2016).

A rota metabólica da leucina passa por processos que requerem nitrogênio para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos. O seu catabolismo pode resultar em produção de corpos cetônicos no fígado, onde a acetoacetil-CoA ou Acetil-CoA é convertido em acetoacetato e, posteriormente, em acetona e  $\beta$ -hidroxibutirato (Nelson e Cox, 2014).

O catabolismo da leucina ocorre pela sua transaminação, com a isoenzima aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada. Formando ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico, e subsequente descaboxiliação oxidativa pela desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada, para formar o isovaleri-CoA. O grupo amino é temporariamente transferido para a isoenzima, aminotransferase de cadeia ramificada, que converte o piridoxal fosfato em piridoxamina fosfato, que doa o grupo amino ao  $\alpha$ -cetoglutarado, para formar o glutamato (Cole, 2015). O glutamato formado funciona como doador de grupos amino para vias biossintéticas ou para vias de excreção, que levam a eliminação de produtos de excreção nitrogenada (Nelson e Cox, 2014).

Para que a leucina seja aproveitada pelo peixe, é preciso que sua exigência esteja adequada na dieta e em equilíbrio com os demais aminoácidos. A exigência de leucina varia de 8,0 a 19,0 g kg<sup>-1</sup> (Chance et al., 1964; Nose, 1979; Wilson et al., 1980; Hughes et al., 1983; Santiago e Lovell, 1988; Rodehutschord et al., 1997; Ahmed e Khan, 2006, Abidi e Khan, 2007), sendo melhor expressada em porcentagem da proteína, representando 3,4% para tilápias do Nilo (NRC, 2011).

A exigência de leucina é importante na dieta para a tilápia do Nilo, principalmente na resistência anabólica, estimulando a síntese proteica muscular por mais tempo em associação com os demais aminoácidos essenciais (Moro et al., 2016). Também realiza a regulação da expressão dos genes nos processos que envolvem a transferência de informação codificada em um gene no seu produto (Wu, 2009).

Recentemente a exigência de leucina foi estabelecida em 12,5 g kg<sup>-1</sup> para a tilápia do Nilo (Gan et al., 2016). No entanto, os autores não avaliaram parâmetros relacionados ao metabolismo ou crescimento muscular dos peixes, como a atividade de enzimas metabólicas e/ou expressão de genes relacionados ao crescimento muscular. A influência da leucina sobre a expressão da mTOR em peixes foi recentemente demonstrada (Ren et al., 2015), comprovando a expressão de genes como ferramenta nutricional em estudos envolvendo aminoácidos em peixes.

## 2.4 Expressão gênica

A expressão de genes se tornou ferramenta de grande importância em diversas áreas, principalmente na nutrição animal. Seus estudos iniciaram com pesquisas envolvendo a reação em cadeia de polimerase tradicional, que utilizava o gel de agarose (Paparini et al., 2007), porém não tão preciso quanto a reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), um método para quantificar a expressão dos genes, permitindo melhor interpretação dos fenômenos nutricionais (Livak e Schmittgen, 2001; Bustin et al., 2009).

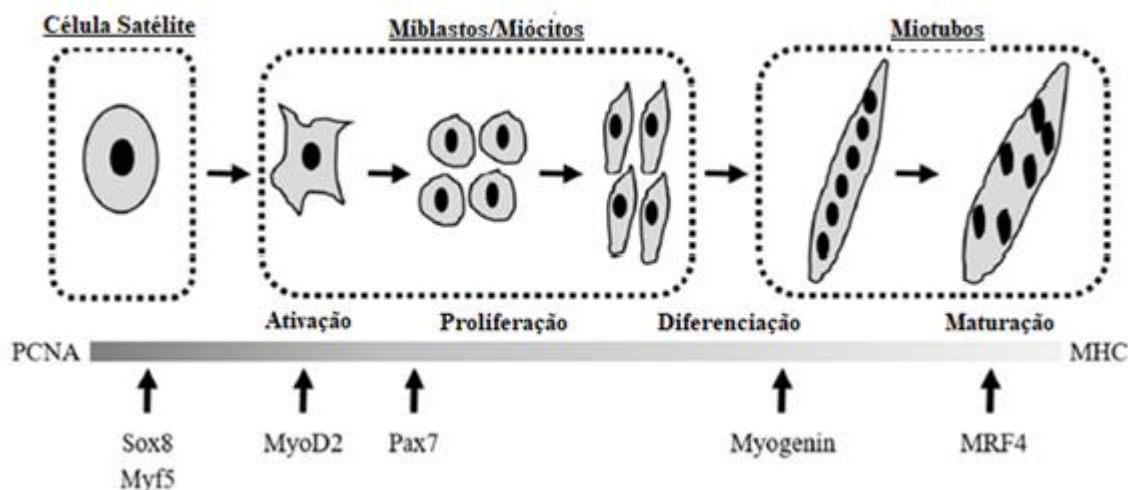
A quantificação absoluta determina o número de cópias da transcrição de interesse, que por vezes pode relacionar o sinal da PCR com uma curva padrão, enquanto a quantificação relativa muda a expressão de um gene alvo em relação a algum grupo de referência (Livak e Schmittgen, 2001). Isso permite estudar genes específicos relacionados ao controle de diversos mecanismos, como a síntese proteica, crescimento muscular, controle hormonal, atividade das enzimas, entre outros (Wu et al., 2011).

O gene então é definido como uma porção do cromossomo que modifica um fenótipo e pode alterar o DNA. O qual codifica a sequência primária de um polipeptídeo ou do RNA, com funções catalíticas, estruturais ou regulatórias, podendo alterar certa característica de um ser vivo, quando submetido a diferentes situações. Os genes podem ser expressos de diferentes maneiras para gerar vários produtos gênicos a partir de um único segmento de DNA (Nelson e Cox, 2014).

Os fatores nutricionais relacionados com a suplementação dietética podem levar a alteração na formação muscular, síntese proteica, ativação das enzimas, crescimento, imunidade, entre outros. Atualmente, a nutrigenômica é definida como a interação entre os alimentos ou nutrientes dietéticos e o genoma de um indivíduo e o efeito sobre o seu fenótipo (Barnett e Ferguson, 2017).

A suplementação pode influenciar a expressão genes relacionados ao crescimento muscular (Leitão et al., 2011), a MyoD e a miogenina que fazem parte dos fatores de regulação miogênica (MRFs), junto com a Myf5 e MRF4, podem controlar o desenvolvimento das células musculares (células satélites) (Vélez et al., 2017), e se ligam a sequências no DNA conhecidas como *E-box* (5' -CANNTG- 3'), encontrados na maioria dos genes do músculo de onde ativa a transcrição dos genes (Lassar et al., 1989; Rescan, 2001).

As células satélites são ativadas e os MRFs primários (MyoD e Myf5) atuam em sua proliferação e consequente desenvolvimento muscular, enquanto os fatores secundários (miogenina e MRF4) são envolvidos com o início e manutenção da diferenciação muscular e processo de fusão par tornar as miofibras e miotubos maduros (Figura 7)

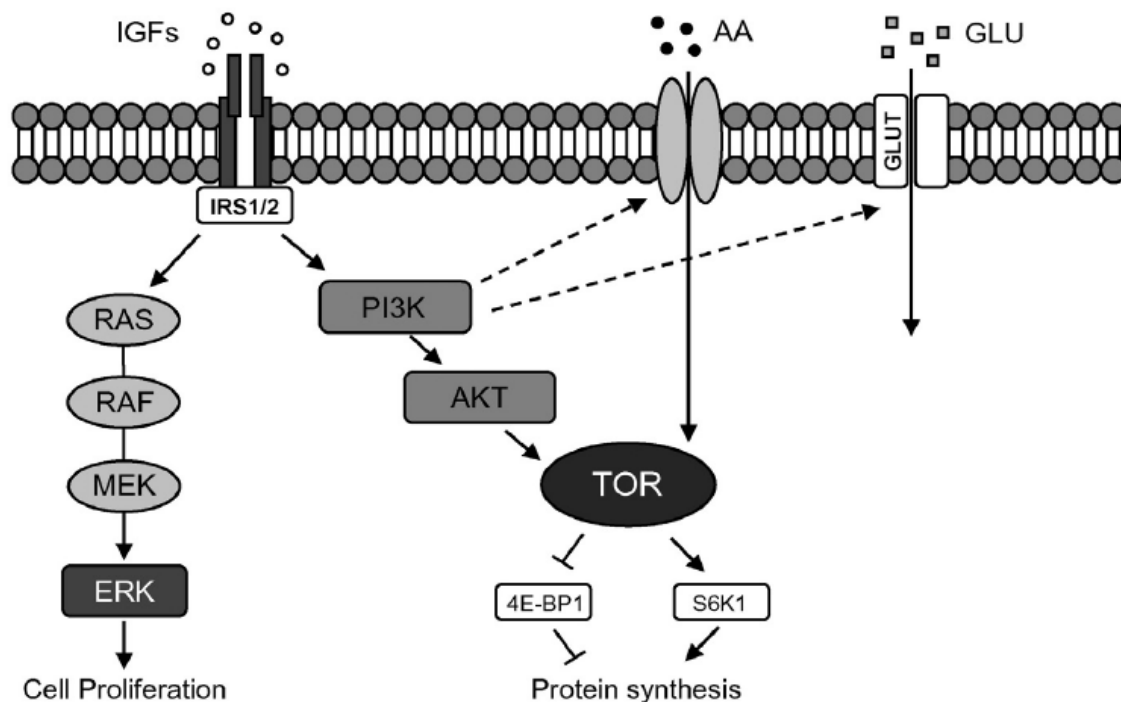


**Figura 7:** Modelo esquemático da miogênese do peixe (Vélez et al., 2016).

A sua influência é comprovada em trabalhos de Alami-Durante et al. (2010a), na qual o uso de fontes proteicas de origem vegetal resultou em mudanças na expressão da MyoD. O contrário ocorreu quando Alami-Durante et al. (2010b), utilizaram um mix de plantas como fonte proteica em substituição a farinha de peixe, e não observaram mudanças na expressão da MyoD e miogenina. Assim, pela possibilidade de antagonismo entre os aminoácidos ramificados, é importante determinar para as exigências considerando as relações entre os mesmos, objetivando melhor utilização da proteína dietética, que pode ser avaliada por meio do crescimento, retenção de aminoácidos e expressão de genes relacionados ao crescimento muscular.

Outro gene que exige destaque é o mecanismo alvo de rapamicina (mTOR), que é coordenado pelos fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs). Os IGFs ativam a via da proteína quinase B (PI3K/AKT) para facilitar a entrada de aminoácidos e glicose na célula, e irá fornecer substratos e energia para a síntese proteica e proliferação das células via mTOR. Este, ativa a proteína de ligação (4E-BP1) e a proteína ribossomal quinase (S6K1), e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) respectivamente (Figura 8) (Vélez et al., 2017), também é responsável por regular o início da tradução, um limitante para síntese proteica (Thoreen et al., 2012).





**Figura 8:** Esquema representativo da via do IGFs para controlar a entrada de alimento, síntese proteica e proliferação das células musculares (Vélez et al., 2017).

A mTOR se divide em dois complexos: O mTOR1, sensível à rapamicina, tem atividade quinase, desempenhando um papel importante na síntese proteica por melhorar o início da translação e alongamento e regular o subconjunto de mRNA, atuando no crescimento celular (Moro et al., 2016; Thoreen et al., 2012). O mTOR2, insensível à rapamicina, as células do ciclo são importantes para organização do citoesqueleto de actina e promovem a sobrevivência celular (Zinzalla et al., 2011). Alguns fatores como mitógenos diversos, fatores ambientais e nutrientes estimulam a ativação desses complexos (Jiang et al., 2013), como é o caso da suplementação com aminoácidos ou hormônios (IGF-I), que aumentaram significativamente a expressão da mTOR (Vélez et al., 2014). Usando a isoleucina dietética Zhao et al. (2012), também comprovaram o seu efeito sobre o aumento na expressão do TOR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abidi, S. F.; Khan, M. A. (2004). Dietary valine requirement of Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fry. *Journal of Applied Ichthyology*; 20: 118-122.
- Abidi, S. F.; Khan, M. A. (2007). Dietary leucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Research*; 38: 478-486.
- Ahmed, I.; Khan, M. A. (2006). Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *British Journal of Nutrition*; 96: 450-460.
- Alami-Durante, H.; Wrutniak-Cabello, C.; Kaushik, S. J.; Médale, F. (2010a). Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*; 156: 561-568.
- Alami-Durante, H.; Médale, F.; Cluzeaud, M.; Kaushik, S. J. (2010b). Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. *Aquaculture*; 303: 50-58.
- Almeida, L. C de.; Avilez, I. M.; Honorato, C. A.; Hori, T. S. F. Moraes, G. (2011). Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition*; 17: 253-262.
- Baldisserotto, B. (2013). *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*, UFSM, 3ª edição, Rio Grande do Sul.
- Barnett, M .P. G.; Ferguson, L. R. (2017). Nutrigenomics: Integrating Genomic Approaches Into Nutrition Research. In: Chapter 17. *Molecular Diagnostics*. Academic press, third edition, 305-326.
- Beveridge, M. C. M.; Mcandrew, B. J. (2000). *Tilápias: biology and exploitation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. (Fish and fisheries series, 25).
- Boscolo, W. R.; Signor, A.; Freitas, J. M. A.; Bittencourt, F.; Feiden, A. (2011). Nutrição de peixes nativos. *Revista Brasileira de Zootecnia*; 40: 145-154.
- Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*; 55: 611-622.
- Calder, P. C. (2006). Branched-chain amino acids and immunity. *The Journal of Nutrition*; 136: 288S-293S.
- Castro, C.; Pérez-Jiménez, A.; Coutinho, F.; Pousão-Ferreira, P.; Brandão, T. M.; Oliveira-Teles, A.; Peres, H. (2013). Digestive enzymes of meagre (*Argyrosomus regius*) and white seabream (*Diplodus sargus*). Effects of dietary brewer's spent yeast supplementation. *Aquaculture*; 416: 322-327.
- Chance, R. E.; Mertz, E. T.; Halver, J. E. (1964). Nutrition of salmonoid fishes: XII. Isoleucine, leucine, valine and phenylalanine requirements of Chinook salmon and

- interrelations between isoleucine and leucine for growth. *Journal of Nutrition*; 83: 177-185.
- Chen, J.; Zhou, X. Q.; Feng, L.; Liu, Y.; Jiang, J. (2009). Effects of glutamine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*; 288: 285-289.
- Cole, J. T. Metabolism of BCAAs. (2015). In: *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*. Springer New York, 13-24.
- Deng, Y. P.; Jiang, W. D.; Liu, Y.; Jiang, J.; Kuang, S. Y.; Tang, L.; Zhou, X. Q. (2014). Differential growth performance, intestinal antioxidant status and relative expression of Nrf2 and its target genes in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed with graded levels of leucine. *Aquaculture*; 434: 66-73.
- El-Sayed, A.-FM. (1998). A substituição total de farinha de peixe com fontes de proteína animal em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds. *Aquaculture Research*; 29: 275-280.
- Engelking, L. R. (2015). Chapter 8 - Amino acid catabolism, textbook of veterinary physiological chemistry (3rd Edition). Academic Press, Boston, 45-51.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Estatística 2017.
- Feng, L.; Luo, J. B.; Jiang, W. D.; Liu, Y.; Wu, P.; Jiang, J.; Zhou, X. Q. (2015). Changes in barrier health status of the gill for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during valine deficiency: Regulation of tight junction protein transcript, antioxidant status and apoptosis-related gene expression. *Fish & shellfish Immunology*; 45: 239-249.
- Fernstrom, J. D. (2005). 4ht amino acids assessment workshop: Branched-chain amino acids and brain function. *Journal Nutrition*; 135: 1539-1546.
- Fontainhas-Fernandes, A.; Gomes, E.; Reis-Henriques, M. A.; Coimbra, J. (1999). Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. *Aquaculture International*; 7: 57-67.
- Fulber, V. M.; Mendez, L. D. V.; Braccini, G. L.; Barrero, N. M. L.; Digmeyer, M.; Ribeiro, R. P. (2009). Desempenho comparativo de três linhagens de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em diferentes densidades de estocagem-DOI: 10.4025/actascianimsci. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*; 31: 177-182.
- Furuya, W. M. (2013). Nutrição de tilápias no Brasil. *Revista Varia Scientia Agrárias*; 3: 133-150.
- Furuya, W. M. F. (2010). Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. GFM.
- Furuya, W. M.; Botaro, D.; Macedo, R. D.; Santos, V. D.; Silva, L. C. R.; Silva, T. D. C.; Furuya, V. R. B.; Sales, P. J. P. (2005). Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*; 34: 1433-1441.
- Gaber, M. M. (2006). Partial and complete replacement of fish meal by broad bean meal in feeds for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L., fry. *Aquaculture Research*; 37: 986-993.
- Gan, L.; Zhou, L. L.; Li, X. X.; Yue, Y. R. (2016). Dietary leucine requirement of Juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*; 22: 1040-1046.

- Grosell, M.; Farrell, A. P.; Brauner, C. J. (2011). *Fish Physiology: The Multifunctional Gut of Fish*, Academic Press.
- Gupta, M. V.; Acosta, B. O. (2004). From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project. *NAGA, WorldFish Center Quarterly*; 27: 4-14.
- Hernández, C.; Olvera- Novoa, M. A.; Hardy, R. W.; Hermosillo, A.; Reyes, C.; González, B. (2010). Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: digestibility and growth performance. *Aquaculture Nutrition*; 16: 44-53.
- Honorato, C. A.; Da Cruz, C.; Carneiro, D. J.; Machado, M. R. F. (2011). Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*; 48: 281-288.
- Hughes, Steven G.; Rumsey, Gary, L.; Nesheim, M. C. (1983). Dietary requirements for essential branched-chain amino acids by lake trout. *Transactions of the American Fisheries Society*; 112: 812-817.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2016.
- Jauncey, K., Tacon, A. G. J., Jackson, A. J. (1983). The quantitative essential amino acid requirements of *Oreochromis mossambicus*. In: Fishelson L, Yaron Z (eds) *Proceedings of first international symposium on tilapia in aquaculture*, May 8–13, pp 328–337.
- Jiang, J.; Feng, L.; Liu, Y.; Jiang, W. D.; Hu, K.; Li, S. H.; Zhou, X. Q. (2013). Mechanistic target of rapamycin in common carp: cDNA cloning, characterization, and tissue expression. *Gene*; 512: 566-572.
- Katayama, S.; Mine, Y. (2007). Antioxidative activity of amino acids on tissue oxidative stress in human intestinal epithelial cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 55: 8458-8464.
- Kaushik, S. J.; Seiliez, I. (2010). Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquaculture Research*; 41: 322-332.
- Khan, M. A.; Abidi, S. F. (2007). Dietary isoleucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*; 13: 424–430.
- Kimball, S. R.; Jefferson, L. S. (2006). New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 83: 500–507.
- Letto, Joan; Brosnan, M. E.; Brosnan, J. T. (1986). Valine metabolism Gluconeogenesis from 3-hydroxyisobutyrate. *Biochemical Journal*; 240: 909-912.
- Lassar, A.; Buskin, J. N.; Lockshon, D.; Davis, R. L.; Apone, S.; Hauschka, S. D.; Weintraub, H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*; 58: 823-831.
- Li, P.; Mai, K.; Trushenski, J.; Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*; 37: 43-53.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. *Methods*; 25: 402-408.

- Leitão, N. J.; Dal Pai-Silva, M.; Almeida, F. L. A.; Portella, M. C. (2011). The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture*; 315: 78-85.
- Luo, Jian-Bo.; Feng, L.; Jiang, W. D.; Liu, W.; Wu, P.; Jiang, J.; Zhou, X. Q. (2017). Physical and Flavor Characteristics, Fatty Acid Profile, Antioxidant Status and Nrf2-Dependent Antioxidant Enzyme Gene Expression Changes in Young Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Fillets Fed Dietary Valine. *PloS One*; 12: e0169270.
- Moro, T.; Ebert, S. M.; Adams, C. M.; Rasmussen, B. B. (2016). Amino acid sensing in skeletal muscle. *Trends in Endocrinology & Metabolism*; 27: 796-806.
- Murakami, T.; Matsuo, M.; Matsuo, A.; Shimomura, Y. (2005). Dissociation of branched-chain amino alpha-keto acid dehydrogenase kinase from branched-chain. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*; 51: 48-50.
- Murthy, H. S.; Varghese, T. J. (1996). Quantitative dietary isoleucine requirement for growth and survival of Indian major carp, *Labeo rohita*, (Hamilton) fry. *Indian Journal of Experimental Biology*; 34: 1141–1143.
- Meurer, F.; Hayashi, C.; Soares, C. M.; Boscolo, W. R. (2008). Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*; 22: 479-484.
- MPA – Ministério da pesca e aquicultura. 2015.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2014). *Principios de Bioquímica: Lehninger*. Omega, 6 edição.
- Nose, T. (1979). Summary report on the requirements of essential amino acids for carp. *Fish nutrition and fishfeed technology*, Halver, J. E.; Tiews, K, eds. Berlin, Germany: Heenemann GmbH, 145-146.
- Norton, L. E. & Layman, D. K. (2006). Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. *The Journal of Nutrition*; 136: 533–537.
- NRC - National research council. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. National academies press.
- Paparini, A.; Ripani, M.; Giordano, G. D., Santoni, D., Pigozzi, F.; Romano-Spica, V. (2007). ACTN3 genotyping by real-time PCR in the Italian population and athletes. *Medicine and science in sports and exercise*; 39: 810-815.
- Pezzato, L. E.; Barros, M. M.; Fracalossi, D. M. et al. (2004). Nutrição de peixes. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M. et al. (Eds.) *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 533p.
- Portz, L.; Furuya, W. M. (2013). Capítulo 4: Energia, proteína e aminoácidos. In: Fracalossi, D. M.; Cyrino, J. E. P. *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. Florianópolis; 375.
- Rahimnejad, S.; Lee, Kyeong-Jun. (2013). Dietary valine requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*; 416: 212-218.
- Ren, M.; Habte-Tsion, H. M.; Liu, B.; Miao, L.; Ge, X.; Xie, J.; Zhou, Q. (2017). Dietary isoleucine requirement of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture nutrition*; 23: 322-330.

- Ren, M.; Habte-Tsion, H. M.; Liu, B.; Miao, L.; Ge, X.; Xie, J.; Pan, L. (2015). Dietary leucine level affects growth performance, whole body composition, plasma parameters and relative expression of TOR and TNF- $\alpha$  in juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*; 448: 162-168.
- Rescan, P. Y. (2001). Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 130: 1-12.
- Ribeiro, R. P. (2001). Espécies exóticas. In: Moreira, H. L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R. P.; Zimmermann, S. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: Ulbra, cap. 11, 91- 121.
- Rodehutsord, M.; Becker, A.; Pack, M.; Pfeffer, E. (1997). Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. *The Journal of Nutrition*; 127: 1166-1175.
- Rogero, M. M. (2008). Tirapegui, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*; 44: 563-575.
- Rotta, M. A. (2003). Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Embrapa Pantanal, Corumbá: Série Documentos.
- Santiago, C. B.; Lovell, R. T. (1988). Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *The Journal of Nutrition*; 118: 1540-1546.
- Santos, L.; Pereira Filho, M.; Sobreira, C.; Ituassú, D.; Fonseca, F. D. (2010). Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. *Acta Amazônica*; 40: 597-604.
- SEBRAE – Serviço de apoio às Micro e Pequenas Empresas. Aquicultura no Brasil: Série estudos mercadológicos, 2015.
- Schmidt, A. A. P. (1988). Piscicultura: a fonte divertida de proteínas. São Paulo: Icone, 88p.
- Shinnick, F. L.; & Harper, A. E. (1977). Effects of branched-chain amino acid antagonism in the rat on tissue amino acid and keto acid concentrations. *The Journal of nutrition*; 107: 887-895.
- Stickney, R.R. (1997). Tilapia update 1996. *Journal of the World Aquaculture Society*; 28: 20-25.
- Tengjaroenkul, B.; Smith, B. J.; Caceci, T.; Smith, S. A. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*; 182: 317-327.
- Thoreen, C.C.; Chantranupong, L.; Keys, H.R.; Wang, T.; Gray, N.S.; Sabatini, D.M.; (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*; 485: 109–113.
- Tibaldi E. & Kaushik S. J. (2005). Amino acid requirements of Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes*; 63: 59-65.

- Vélez, E. J.; Lutfi, E.; Azizi, S.; Perelló, M.; Salmerón, C.; Riera-Codina, M.; Navarro, I. (2017). Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture*; 467: 28-40.
- Vélez, E. J.; Lutfi, E.; Azizi, Sh.; Montserrat, N.; Riera-Codina, M.; Capilla, E.; Navarro, I.; Gutiérrez, J. (2016). Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 199: 67-73.
- Vélez, E.J.; Lutfi, E.; Jiménez-Amilburu, V.; Riera-Codina, M.; Cappila, E.; Navarro, I.; Gutiérrez, J. (2014). IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *General and Comparative Endocrinology*; 205: 296-304.
- Zinzalla, V.; Stracka, D.; Oppliger, W.; Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*; 144: 757-768.
- Zhao, J.; Liu, Y.; Jiang, J.; Wu, P.; Chen, G.; Jiang, W.; Zhou, X. (2012). Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*; 368: 117-128.
- Zehra, S.; Khan, M. A. (2013). Dietary isoleucine requirement of fingerling catla, *Catla catla* (Hamilton), based on growth, protein productive value, isoleucine retention efficiency and carcass composition. *Aquaculture International*; 21: 1243-1259.
- Wagner, P. M.; Ribeiro, R. P.; Moreira, H. L. M.; Vargas, L.; Povh, J. A. (2004). Avaliação de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*; 26: 187-196.
- Wilson, R. P.; Poe, W. E.; Robinson, E. H. (1980). Leucine, isoleucine, valine and histidine requirements of fingerling channel catfish. *The Journal of Nutrition*; 110: 627-633.
- Wilson R.P. (2002). Amino acids and proteins. In: *Fish nutrition* (ed. by Halver JE, Hardy RW), Amsterdam, AM, The Netherlands.
- Wang, X.; Castanon, F.; Parsons, C. M. (1997). Order of amino acid limitation in meat and bone meal. *Poultry science*; 76: 54-58.
- Wu, G. (2013). *Amino acids: biochemistry and nutrition*, CRC Press.
- Wu, P.; Feng, L.; Kuang, S. Y.; Liu, Y.; Jiang, J.; Hu, K.; Zhou, X. Q. (2011). Effect of dietary choline on growth, intestinal enzyme activities and relative expressions of target of rapamycin and eIF4E-binding protein2 gene in muscle, hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*; 317: 107-116.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37: 1-17.
- Xiao, W; Li, D. Y.; Zhu, J. L.; Zou, Z. Y.; Yue, Y. R.; Yang, H. (2017). Dietary valine requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*; 1-9.
- Yamamoto, T.; Shima, T.; Furuita, H. (2004). Antagonistic effects of branched-chain amino acids induced by excess protein-bound leucine in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*; 232: 539-550.

## OBJETIVOS

### *Geral*

Determinar a exigência de isoleucina e avaliar as relações entre aminoácidos aromáticos em dietas para alevinos de tilápias do Nilo.

### *Específicos*

- Avaliar o crescimento corporal, conversão alimentar, retenção proteica e composição corporal de alevinos de tilápias do Nilo, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de isoleucina e diferentes relações entre aminoácidos aromáticos;
- Avaliar a retenção corporal de aminoácidos de alevinos tilápias do Nilo, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de isoleucina e diferentes relações entre aminoácidos aromáticos;
- Determinar a expressão gênica dos MRFs, MyoD e mTOR de alevinos tilápias do Nilo, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de isoleucina.



## **II - Exigência de isoleucina para alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com base no desempenho produtivo, retenção corporal de aminoácidos e expressão de genes MyoD, MyoG e mTOR\***

*\*De acordo com normas de publicação da Aquaculture, ISSN 0044-8486, Fator de impacto = 2,570*

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi de avaliar a exigência de isoleucina em dietas para alevinos de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, retenção corporal de aminoácidos e expressão dos genes MyoD, MyoG e mTOR. Duzentos e oitenta e oito alevinos de tilápia do Nilo (2,46 g) foram distribuídos em 24 aquários e alimentados com seis dietas peletizadas isoproteicas (279,3 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta) e isoenergéticas (3072,77 kcal.kg<sup>-1</sup>), contendo 8,5; 11,0; 13,8; 17,0; 20,5 e 23,4 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina, durante oito semanas. Foram avaliados os parâmetros de desempenho produtivo, composição corporal, composição e retenção de aminoácidos e expressão gênica da MyoD, MyoG e mTOR no músculo branco. Não foi observada diferença em peso inicial, índice hepatossomático e sobrevivência entre todos os tratamentos. Peixes alimentados com 13,8 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina apresentaram maior peso corporal final, ganho de peso e melhor conversão alimentar comparados aos peixes alimentados com as demais dietas. A retenção de proteína foi melhor em peixes alimentados com 13,8 g de isoleucina kg<sup>-1</sup> do que os peixes alimentados com 8,5 g de isoleucina kg<sup>-1</sup>. Com exceção da alanina, treonina e serina, a utilização de dietas com diferentes níveis de isoleucina influenciou a retenção de aminoácidos. Peixes alimentados com 8,5 g/kg de isoleucina apresentaram menor retenção de histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ácido aspártico, ácido glutâmico e glicina em relação aos peixes que receberam a dieta com 13,8 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina. Peixes alimentados com 8,5 e 11,0 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina apresentaram diferença significativa para a expressão do gene MyoG, mas não diferiram para a MyoD e os níveis do mRNA da mTOR diferiu para peixes alimentados com 17,2 g kg<sup>-1</sup> isoleucina. Com base na análise de regressão pelo modelo *Broken-line* dos dados de ganho de peso a exigência foi de 13,46 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina.

**Palavras-chave:** aquicultura, crescimento muscular, retenção de aminoácidos, nutrigenômica, peixe

**II – Dietary isoleucine requirement of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings based on growth performance, body amino acids retention and gene expression of MyoD, MyoG and mTOR\***

**ABSTRACT:** The objective of this study was to determine the dietary isoleucine requirement for Nile tilapia fingerlings based on growth performance, body amino acids retention and gene expression of MyoD, MyoG and mTOR. Two hundred and eighty-eight Nile tilapia juveniles (2.46 g) were distributed into 24 aquariums and fed with six isoproteic diets (264.4 g kg<sup>-1</sup> crude protein) and isoenergetic (3072.77 kcal kg<sup>-1</sup>), containing 8.5, 11.0, 13.8, 17.0, 20.5 and 23.4 g kg<sup>-1</sup> of isoleucine, for eight weeks. Data of growth performance, body composition, amino acid composition and retention and gene expression of MyoD, MyoG and mTOR in white muscle were evaluated. No difference was observed in initial weight, hepatosomatic index and survival rate among all treatments. Fish fed 13.8 g kg<sup>-1</sup> of isoleucine showed higher body weight, weight gain and improved feed conversion ratio compared to fish fed other diets. Protein retention was higher in fish fed 13.8 g kg<sup>-1</sup> isoleucine than fish fed 8.5 g kg<sup>-1</sup> isoleucine. With the exception of alanine, threonine and serine, the use of diets containing graded levels of isoleucine influenced the amino acids retention. Fish fed 8.5 g kg<sup>-1</sup> of isoleucine showed lower retention of histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, aspartic acid, glutamic acid and glycine compared to the fish fed diet containing 13.8 g kg<sup>-1</sup> of isoleucine. Fish foods with 8.5 and 11.0 g kg<sup>-1</sup> of isoleucine showed significant difference for MyoG gene expression but did not differ for MyoD and mTOR mRNA levels differed for fish fed 17.2 g kg<sup>-1</sup> isoleucine. Based on the regression analysis by the Broken-line model of the weight gain data the requirement was of 13.46 g kg<sup>-1</sup> of isoleucine.

**Key words:** aquaculture, muscle development, amino acids retention, nutrigenomics, fish

## Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta elevado potencial na piscicultura pela elevada taxa de crescimento, boa conversão alimentar e carne de boa qualidade. Nos últimos anos, o conceito de nutrição de precisão tem sido aplicado para essa espécie, objetivando atender as exigências nutricionais nas diferentes fases de criação, considerando o desempenho produtivo, sustentabilidade ambiental e a resposta econômica (Furuya, 2013).

A proteína é um dos nutrientes mais onerosos em dietas para peixes, considerando seu elevado conteúdo em comparação com dietas de aves e suínos. O valor da proteína é dado pelo conteúdo e proporções de aminoácidos. Os aminoácidos devem estar presentes em quantidades adequadas para atender suas exigências, principalmente em estudos que envolvem os aminoácidos ramificados isoleucina, leucina e valina, objetivando evitar antagonismos entre os mesmos (NRC, 2011).

A isoleucina se destaca pela importância na síntese proteica e no metabolismo energético do músculo. Atua na síntese de glutamina e alanina, fontes primárias de energia para os enterócitos e células imune, na biossíntese e secreção de insulina (Kimball e Jefferson, 2006; Pohlenz et al., 2012). Além disso, tem papel importante na expressão de genes relacionados com o crescimento muscular e síntese proteica (Moro et al., 2016; Vélez et al., 2017).

O crescimento muscular é mediado pelas células satélites responsáveis pelos mecanismos de hiperplasia e hipertrofia. Na hiperplasia, ocorre a fusão entre as células satélites ativadas, levando a formação de novas fibras musculares, enquanto na hipertrofia as células satélites se fundem com fibras musculares existentes, aumentando o número de miofibrilas e conseqüente aumento na área da fibra muscular (Johnston 1999; Koumans e Akster 1995).

A nutrigenômica surgiu como uma ferramenta que tem sido cada vez mais utilizada na nutrição de peixes (NRC, 2011). Estudos recentes têm validado essa ferramenta em pesquisas envolvendo aminoácidos em peixes (Alami-Durante et al., 2010; Zhao et al., 2013; Vélez et al., 2014; Feng et al., 2017). No qual a isoleucina apresenta importante função na síntese proteica muscular (Wu, 2013).

Sendo assim, alguns genes como a MyoD e a miogenina (MyoG), que fazem parte dos fatores de regulação miogênica (MRFs), junto com a Myf5 e MRF4, podem controlar o desenvolvimento das células musculares (Vélez et al. 2017), por induzir a

diferenciação dos mioblastos em miócitos, que se fundem para originar os miotubos (Silva e Carvalho, 2007). A MyoD é responsável, por direcionar as células mesodérmicas para a linhagem muscular e a miogenina está envolvida com a iniciação e manutenção da diferenciação muscular (Johnston, 2006). O mTOR é responsável pela síntese proteica e a sobrevivência celular (Moro et al., 2016; Zinzalla et al., 2011).

O mTOR1, desempenhando um papel importante na síntese proteica por melhorar o início da translação e regular o subconjunto de mRNA, atuando no crescimento celular (Moro et al., 2016; Thoreen et al., 2012). O mTOR2, promove a sobrevivência celular, esse gene é influenciado por diversos fatores ambientais e nutricionais como a suplementação com aminoácidos (Zinzalla et al., 2011).

Deste modo, a exigência de isoleucina tenha sido determinada para algumas espécies como a carpa da Índia, *Labeo rohita* (Khan e Abidi, 2007), jian carp, *Cyprinus carpio* (Zhao et al., 2012), catla, *Catla catla* (Zehra e Khan, 2013) e blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* (Ren et al., 2015), porém ainda há poucas informações sobre as exigências destes aminoácidos para tilápias. Não existe um consenso sobre a exigência de isoleucina para tilápias do Nilo, variando de 7,8 (Neu et al., 2017) a 8,7 g kg<sup>-1</sup> (Santiago e Lovell, 1988), valores que estão abaixo dos encontrados em dietas comerciais para alevinos e juvenis de tilápias utilizadas no Brasil.

Com o crescente avanço na avaliação de linhagens de tilápias com maior potencial de crescimento, além das inovações nas áreas de manejo e nutrição de peixes, há necessidade da constante atualização das exigências nutricionais considerando não somente o crescimento e a conversão alimentar, mas também os fatores que modulam o crescimento muscular. Assim, a presente pesquisa foi delineada para determinar a exigência de isoleucina para alevinos de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, retenção corporal de aminoácidos e expressão de genes relacionados ao crescimento muscular.

## **Material e métodos**

### **Local de realização e instalações experimentais**

A presente pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo 6350/2017).

O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil no período de abril a maio de 2016, durante oito semanas. Foram utilizados

288 tilápias do Nilo da variedade SUPREME, com peso corporal inicial médio de  $2,46 \pm 0,10$  g, masculinizados durante a fase larval, provenientes da piscicultura Aquabel, Rolândia – PR. Os peixes foram distribuídos em 24 aquários com volume unitário de 70 L (35,5 x 57,0 x 35,0 cm de altura, comprimento e largura, respectivamente), em um delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições.

Os aquários foram mantidos em sistema de recirculação com biofiltro, filtro UV e dois aquários de decantação de 150 L cada. Em cada aquário, foi mantida aeração através de pedra porosa e mangueira acoplada a um soprador de 0,5 CV, de forma a manter o teor de oxigênio entre 6,0 a 6,5 mg/L. A temperatura foi controlada por aquecedor acoplado a um termostato, para manter a temperatura em  $27 \pm 1$  °C. Semanalmente, foram monitorados os parâmetros de oxigênio dissolvido (5,6) e temperatura 27,8 °C, pelo oxímetro digital portátil, pH (6,6), por meio de pH-metro de bancada digital e amônia total 0,06 mg/L, nitrito 0,01 mg/L e nitrato 0,2 mg/L através do colorímetro. A retirada das fezes foi realizada por sifonagem, realizada a cada três dias.

### **Dietas e manejo alimentar**

Foram elaboradas seis dietas com níveis crescentes de suplementação de L- isoleucina, com aproximadamente  $279,3 \text{ g kg}^{-1}$  de proteína bruta e  $3072,77 \text{ kcal kg}^{-1}$  de energia digestível, em que foram obtidas dietas com valores analisados de 8,5; 11,0; 13,8; 17,2; 20,5 e  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina (Tabela 1). Os valores de energia digestível e fósforo disponível foram estimados por meio de valores descritos por Furuya et al. (2001), Pezzato et al. (2002) e Guimarães et al. (2008ab), em estudos realizados com tilápia do Nilo. Os valores de aminoácidos essenciais e não essenciais das dietas foram confirmados por meio de análises laboratoriais (Tabela 2).

As dietas foram moídas em moinho de martelo em peneira com granulometria de 0,5 mm de diâmetro, granuladas em moinho de carne com adição de 30% de água (55 °C) e secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C durante 24 horas. Após, foram desintegradas em moinho martelo, selecionando-se os grânulos com diâmetro  $\geq 0,5$  e  $\leq 0,8$  mm para peixes até 3 g de peso corporal, diâmetro  $\geq 0,8$  e  $\leq 1,0$  mm para peixes de 3,1 a 10 g de peso corporal e grânulos com diâmetro  $\geq 1,0$  e  $\leq 2,0$  mm para peixes de 10,1 a 40,0 g de peso corporal. Para tal, seis peixes de cada caixa foram pesados semanalmente para correção do tamanho dos grânulos a serem fornecidos.

**Tabela 1** Formulação e composição química das dietas experimentais para alevinos de tilápia do Nilo ( $g\ kg^{-1}\ diet$ )

Ingredientes	Níveis de isoleucina dietética ( $g\ kg^{-1}$ )					
	Ile 1	Ile 2	Ile 3	Ile 4	Ile 5	Ile 6
	8,5	11,0	13,8	17,2	20,5	23,4
Amido <sup>1</sup>	25,40	25,40	25,40	25,40	25,40	25,40
Farinha de trigo <sup>2</sup>	616,60	616,60	616,60	616,60	616,60	616,60
Farinha de sangue <sup>2</sup>	79,40	79,40	79,40	79,40	79,40	79,40
Farinha de peixe <sup>1</sup>	99,30	99,30	99,30	99,30	99,30	99,30
Óleo de soja	49,60	49,60	49,60	49,60	49,60	49,60
L-alanina	16,40	13,10	9,80	6,60	3,30	0,00
L-ácido glutâmico	19,90	19,90	19,90	19,90	19,90	19,90
Celulose	19,90	19,90	19,90	19,90	19,90	19,90
Fosfato bicálcico	19,90	19,90	19,90	19,90	19,90	19,90
Bicarbonato de sódio	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
DL-metionina	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
L-arginina	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
L-treonina	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
L-triptopano	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-lisina	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
L-histidina	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
L-isoleucina	0,00	3,30	6,60	9,80	13,10	16,40
Cloreto de colina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Premix mineral e vitamínico <sup>3</sup>	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90
Sal	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Antioxidante <sup>5</sup>	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Antifúngico <sup>6</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Carboximetilcelulose	19,80	19,80	19,80	19,80	19,80	19,80
<i>Composição química determinada (<math>g\ kg^{-1}\ dry\ matter</math>)</i>						
Matéria seca	904,4	906,1	906,8	907,4	908,5	908,7
Proteína bruta	273,8	272,8	279,3	276,1	274,2	284,1
Lipídio bruto	71,5	70,3	73,7	71,9	73,6	70,9
Fibra bruta	18,6	18,6	18,6	18,6	18,6	18,6
Cálcio	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5
Fósforo disponível <sup>7</sup>	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5

<sup>1</sup>De acordo com Guimarães et al. (2008a), como  $g\ kg^{-1}$  da matéria seca: milho (16,9 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 72,1 proteína bruta; 42,4 lipídios totais; 20,0 fibra bruta; 12,0 cinza), arroz (15,5 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 82,1 proteína bruta; 82,6 lipídios totais; 7,50 fibra bruta; 7,80 cinza),

<sup>2</sup>De acordo com Guimarães et al. (2008b), como  $g\ kg^{-1}$  da matéria seca: farinha de soja (19,3 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 512,1 proteína bruta; 14,8 lipídios totais; 71,2 fibra bruta; 74,4 cinza), Subprodutos da avicultura (20,4 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 627,9 proteína bruta; 171,8 lipídios totais; 183,2 cinza) e farinha do glúten de milho (20,6 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 700,7 proteína bruta; 94,8 lipídio bruto; 8,3 fibra bruta; 17,0 cinza).

<sup>3</sup>Mistura vitamínica e mineral: composição por kg: vit. A - 1.200.000 IU, vit. D<sub>3</sub> - 200.000 IU, vit. E - 12.000 mg, vit. K<sub>3</sub> - 2.400 mg, vit. B<sub>1</sub> - 4.800 mg, vit. B<sub>2</sub> - 4.800 mg, vit. B<sub>6</sub> - 4.000 mg, vit. B<sub>12</sub> - 4.800 mg, ácido fólico - 1.200 mg, Pantotenato de cálcio - 12.000 mg, vit. 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.

<sup>4</sup>Vitamina C: Rovimix Stay-C 35 (DSM, São Paulo, São Paulo, Brasil).

<sup>5</sup>Banox®: Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo Brasil.

<sup>6</sup>Mold Zap Aquatica® Composição: dipropionato de amônio, ácido acético, ácido sórbico e ácido benzoico (Alltech Agroindustrial Ltda, Brasil).

<sup>7</sup>De acordo com Furuya et al. (2001b), Pezzato et al. (2002) e Guimarães et al. (2008ab).

**Tabela 2** Composição de aminoácido das dietas experimentais para alevinos de tilápia do Nillo ( $\text{g kg}^{-1}$  dry diet)

	Níveis de isoleucina dietética ( $\text{g kg}^{-1}$ )					
	Ile 1	Ile 2	Ile 3	Ile 4	Ile	Ile 6
	8,5	11,0	13,8	17,2	20,5	23,4
<i>Aminoácidos essenciais</i>						
Arginina	17,30	17,54	17,67	17,20	17,01	14,73
Histidina	8,67	8,73	8,62	8,28	8,88	8,62
Isoleucina	8,48	10,99	13,79	17,22	20,49	23,36
Leucina	17,51	17,52	17,59	17,58	17,59	17,47
Lisina	17,24	17,11	17,14	17,46	17,86	17,43
Metionina	7,29	7,37	7,39	7,49	7,27	7,28
Fenilalanina	12,01	11,92	12,23	12,34	12,46	12,16
Treonina	10,96	10,62	10,88	10,27	10,61	10,87
Triptopano	3,79	3,70	3,86	3,70	3,66	3,56
Valina	12,41	12,09	11,99	12,78	12,37	12,67
<i>Aminoácidos não essenciais</i>						
Alanina	21,49	21,61	20,79	19,46	13,93	13,15
Ácido aspártico	16,87	15,57	16,45	17,38	16,05	15,71
Cisteína	3,39	3,11	3,16	3,47	3,50	3,06
Ácido glutâmico	61,61	61,55	60,72	63,32	61,28	61,28
Glicina	13,76	13,73	13,59	13,18	13,50	13,25
Serina	10,03	9,29	9,88	10,47	9,89	9,60
Tirosina	7,23	6,99	7,03	7,25	7,29	7,28

Após secagem, as dietas foram armazenadas em refrigerador ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia, em intervalos de três horas, das 8h às 18h. O arraçoamento foi manual e o fornecimento até saciedade aparente. Ao início do experimento, todos os peixes de cada aquário foram pesados em lotes em balança de precisão ( $0,01\text{ g}$ ).

### Coleta de amostra e análise laboratorial

No início do experimento, 120 peixes permaneceram em jejum de 24 horas e foram coletados para determinação da composição corporal inicial. Ao final do experimento, de cada aquário e após jejum de 24 horas, todos os peixes foram pesados

em balança digital de precisão (0,01g), sendo que oito peixes por unidade experimental foram coletados para composição corporal. Os peixes foram abatidos por secção medular e imersos em gelo.

As amostras para a composição corporal foram moídas em multiprocessador de alimentos, até obter uma amostra homogênea. Posteriormente, foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 48 horas e moídas em moinho bola. As análises de umidade foram determinadas pela secagem em estufa a 105 °C durante 24 horas; o extrato etéreo foi determinado pelo extrator Soxhlet com éter como solvente; a cinza foi determinada em mufla a 550 °C por 24 horas, a composição corporal dos peixes e da dieta foram realizadas no laboratório aquicultura - UEPG, seguindo metodologia citada por AOAC (1995). As análises de proteína bruta e aminoácidos das rações e dos peixes foram realizadas pelo Laboratório da Ajinomoto do Brasil, Indústria e Comércio de Alimentos, em Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), modelo *Shimadzu*.

### **Variáveis de desempenho**

Os dados de desempenho produtivo foram calculados de acordo com as equações a seguir:

- Ganho de peso (g): peso final (g) – peso inicial (g)
- Conversão alimentar: consumo de alimento (g) / ganho de peso (g)
- Retenção de proteína (%): ganho em proteína (g) / proteína consumida (g) x 100
- Índice hepatossomático (%): peso do fígado (g) / peso corporal (g) x 100
- Sobrevivência: número de peixes final / número de peixes inicial x 100

### **Expressão gênica**

Fragmentos da musculatura branca dorsal de oito peixes por tratamento (dois peixes de cada repetição), foram congelados em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído com *TRIzol<sup>TM</sup>* (*Invitrogen Life Technologies*), seguindo-se o protocolo do fabricante. As amostras congeladas foram trituradas com o homogeneizador de tecidos IKA<sup>®</sup> T-25 Digital Ultra-Turrax<sup>®</sup> (IKA, Staufen, Baden-Württemberg, Germany) em 1mL de TRIzol<sup>®</sup>/50-100 mg de tecido muscular. O homogeneizado foi transferido para um tubo de 1,5 mL e incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio e, posteriormente, os tubos foram agitados



vigorosamente e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa formada após a centrifugação, foi coletada e o RNA foi precipitado por meio da incubação com 0,5 mL de álcool isopropílico, durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4 °C, e o *pellet* de RNA resultante foi lavado com 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Após secagem, o *pellet* de RNA foi dissolvido em UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) e armazenado a -80 °C. A quantificação do RNA, em ng/μL, foi determinada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm, que forneceu a medida de absorbância a 260 nm (quantidade de RNA). Também foi realizada a medida de absorbância a 280 nm, que identifica a quantidade de proteínas e permite a análise da pureza do RNA extraído, garantida pela obtenção de uma razão 260/280 nm superior a 1.8. Foram utilizadas somente amostras com razão igual ou superior a 1.8. O RNA total foi tratado com a enzima DNase, conforme as instruções do protocolo *DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies)* e submetido à transcrição reversa, utilizando o *High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems Life Technologies)*, seguindo-se as instruções do fabricante.

Os níveis de expressão dos genes alvo MyoD, miogenina, foram detectados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR) através do sistema *Rotor Gene-Q (Qiagen)*. Os resultados de expressão, obtidos para esses genes, foram normalizados pelos valores obtidos para o gene de referência DNA ribossomal 18S. As amostras de cDNA foram amplificadas utilizando o Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o *Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen)*, seguindo-se as instruções do fabricante. Um conjunto de *primers* senso e antissenso, para cada gene analisado, foi construído através do software Primer Express 3.0 (*Applied Biosystems Life Technologies*), a partir das sequências de RNAm descritas para a tilápia e publicadas no *GenBank* (números de acesso: MyoD - FJ686692, Miogenina - FJ810421, mTOR - XM005466120.3 e 18S – JF698683) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Primers usados para análise de qRT – PCR na musculatura de tilápias do Nilo

Nome do gene	Sequência de primer (5´- 3´)
MyoD	Forward: CCACCTGTCAGACAACCAGA
	Reverse: ACTGCGTTCGCTCTTCAGAC
Miogenina	Forward: CTCAACCAGCAGGACACTGA
	Reverse: ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT
mTOR	Forward: TGTGCCGACACAAGTAGAGC
	Reverse: TGTGGCTTGAGGACACATTC
18S DNA ribossomal	Forward: GGACACGGAAAGGATTGACAG
	Reverse: GTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC

Todos os conjuntos de *primers* foram sintetizados pela Invitrogen *Life Technologies*. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas e a amplificação específica de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. O gráfico resultante da curva de dissociação possibilitou a avaliação da especificidade de amplificação de cada conjunto de primers, confirmada pela presença de um único pico de fluorescência. Após obtenção do Ct médio das duplicatas, foi calculado o valor de  $\Delta Ct$  (Ct gene alvo – Ct gene endógeno) e de  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  amostra –  $\Delta C$  amostra calibradora). A quantificação relativa dos dados de expressão foi calculada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak e Schmittgen, 2001) para normalizar os dados, expressa em *fold-change*.

### **Análise estatística**

Os valores observados de cada variável resposta foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Em caso de diferenças, foram comparados por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A determinação da exigência de isoleucina foi realizada por meio da análise de regressão *Broken-Line*. Os dados expressão de genes foram analisados por meio de Kruskal-Wallis, seguidos de teste de Dunn ( $P < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1). As análises estatísticas da expressão dos genes foram efetuadas por meio do programa computacional GraphPad Software (1998).

## **Resultados**

### *Desempenho produtivo*

O período experimental foi conduzido sem eventos inesperados, sendo observados baixa mortalidade. Nenhum sinal externo de patologia foi observado, mesmo nos peixes alimentados com a dieta com o nível menor de isoleucina (8,5 g de isoleucina kg<sup>-1</sup>).

Peixes alimentados com níveis crescentes de isoleucina apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) no peso final, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e retenção de proteína. Por outro lado, não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) dos níveis de isoleucina dietética sobre o peso inicial, índice hepatossomático e sobrevivência dos peixes (Tabela 4).

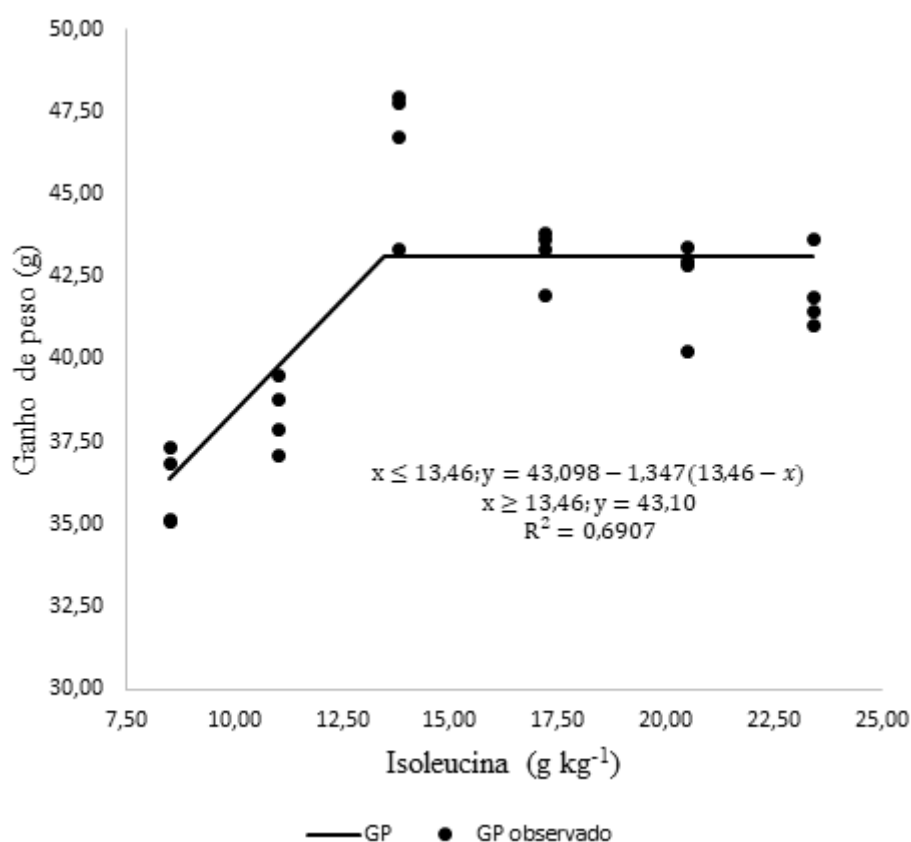
**Tabela 4:** Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de isoleucina <sup>1</sup>.

	Dietary isoleucine levels (g kg <sup>-1</sup> )						<i>P</i>
	Ile 1 8,5	Ile 2 11,0	Ile 3 13,8	Ile 4 17,2	Ile 5 20,5	Ile 6 23,4	
Peso corporal inicial (g)	2,4 ± 0,01	2,5 ± 0,02	2,5 ± 0,03	2,5 ± 0,02	2,4 ± 0,02	2,5 ± 0,02	0.817
Peso corporal final (g)	38,6 ± 0,23 <sup>c</sup>	40,8 ± 0,22 <sup>c</sup>	49,0 ± 0,42 <sup>a</sup>	45,7 ± 0,16 <sup>b</sup>	44,8 ± 0,30 <sup>b</sup>	44,5 ± 0,22 <sup>b</sup>	< 0.001
Ganho de peso (g)	36,1 ± 0,23 <sup>c</sup>	38,3 ± 0,21 <sup>c</sup>	46,5 ± 0,43 <sup>a</sup>	43,2 ± 0,17 <sup>b</sup>	42,4 ± 0,30 <sup>b</sup>	42,0 ± 0,24 <sup>b</sup>	0.002
Consumo alimentar (g)	44,9 ± 0,48 <sup>b</sup>	44,8 ± 0,82 <sup>b</sup>	53,3 ± 0,24 <sup>a</sup>	50,3 ± 0,52 <sup>ab</sup>	50,4 ± 0,45 <sup>ab</sup>	51,6 ± 0,66 <sup>a</sup>	0.001
Conversão alimentar	1,24 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,02 <sup>ab</sup>	1,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,02 <sup>ab</sup>	1,19 ± 0,01 <sup>ab</sup>	1,23 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0.0129
Retenção de proteína (%)	35,7 ± 0,49 <sup>b</sup>	38,2 ± 0,53 <sup>ab</sup>	40,5 ± 0,36 <sup>a</sup>	39,2 ± 0,25 <sup>ab</sup>	39,1 ± 0,59 <sup>ab</sup>	36,9 ± 0,18 <sup>ab</sup>	0.050
Índice hepatossomático (%)	3,4 ± 0,09	3,5 ± 0,13	3,2 ± 0,04	3,1 ± 0,05	3,1 ± 0,03	2,9 ± 0,10	0.313
Sobrevivência (%)	95,8 ± 0,98	97,9 ± 0,85	97,9 ± 0,85	97,9 ± 0,85	97,9 ± 0,85	91,7 ± 3,40	0.834

<sup>1</sup>Valores expressos como médias (± EPM) de quatro repetições (n = 4) e valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey's (*P*<0.05).

Peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina apresentaram maior peso corporal final ( $P < 0.001$ ) e ganho de peso ( $P = 0,002$ ) comparados aos peixes alimentados com as outras dietas. Não foi observada diferença em peso inicial ( $P = 0.817$ ), índice hepatossomático ( $P = 0.313$ ) e sobrevivência ( $P = 0.834$ ) entre todos os tratamentos. A conversão alimentar diferiu significativamente ( $P = 0.0129$ ) em peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina comparado com os peixes alimentados com  $8,5 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina. Em adição, a retenção de proteína diferiu significativamente ( $P = 0.050$ ) em peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina do que os peixes alimentados com  $8,5 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina.

Pela análise de regressão *Broken-line* dos dados de ganho de peso, os peixes aumentaram de peso até a dieta com  $13,46 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina (Figura 1), representado pela equação  $y = 43,098 - 1,347(13,46 - x)$ ,  $R^2 = 0,6907$ . A regressão *Broken-line* foi que interpretou melhor os resultados de ganho de peso, visto que ao usar a regressão quadrática o coeficiente de variação ( $R^2$ ) foi muito mais baixo que o encontrado. Esse  $R^2$  baixo foi devido a discrepância entre os valores obtidos, que dificultaram se obter valores maiores de  $R^2$ .



**Figura 1** Relação *Broken-line* entre o ganho de peso de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com níveis crescentes de isoleucina.

### *Composição corporal*

Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) dos níveis crescentes de isoleucina nas dietas sobre a composição corporal em umidade, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas dos peixes (Tabela 5). Não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) dos níveis de isoleucina sobre a composição corporal em aminoácidos (Tabela 6).

**Tabela 5:** Composição aproximada corporal (g 100 g<sup>-1</sup>) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas com níveis crescentes de isoleucina dietética<sup>1</sup>

	Níveis de isoleucina dietética (g 100 g <sup>-1</sup> )						<i>P</i>
	Ile 1 8,5	Ile 2 11,0	Ile 3 13,8	Ile 4 17,2	Ile 5 20,5	Ile 6 23,4	
Umidade	71,5 ± 0,03	71,4 ± 0,15	71,4 ± 0,12	71,7 ± 0,08	71,3 ± 0,12	71,6 ± 0,07	0.791
Proteína bruta	13,4 ± 0,14	13,4 ± 0,04	14,0 ± 0,12	13,7 ± 0,11	14,00 ± 0,16	13,7 ± 0,14	0.582
Lipídios totais	8,81 ± 0,08	8,72 ± 0,13	8,86 ± 0,16	8,41 ± 0,03	8,63 ± 0,17	8,66 ± 0,04	0.907
Cinzas	3,41 ± 0,04	3,26 ± 0,03	3,14 ± 0,04	3,40 ± 0,04	3,34 ± 0,01	3,47 ± 0,07	0.324

Valores médios da composição corporal inicial (g 100 g<sup>-1</sup>): 73,67 de umidade, 12,32 de proteína bruta, 5.9 de lipídios totais e 3,35 de cinzas.

<sup>1</sup>Valores expressos como médias (± EPM) de quatro repetições (n = 4) e valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey's (P > 0.05).

**Tabela 6:** Composição de aminoácidos corporais (g 100 g<sup>-1</sup>) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de isoleucina dietética<sup>1</sup>.

	Níveis de isoleucina dietética (g 100 g <sup>-1</sup> )						<i>P</i>
	Ile 1 8,5	Ile 2 11,0	Ile 3 13,8	Ile 4 17,2	Ile 5 20,5	Ile 6 23,4	
<b>Aminoácidos essenciais</b>							
Arginina	5,82 ± 0,12	5,60 ± 0,20	5,42 ± 0,15	5,52 ± 0,05	5,79 ± 0,06	5,90 ± 0,28	0.948
Histidina	2,15 ± 0,05	1,98 ± 0,06	2,04 ± 0,06	2,05 ± 0,03	2,20 ± 0,02	2,09 ± 0,03	0.741
Isoleucina	4,07 ± 0,06	3,74 ± 0,11	3,85 ± 0,09	3,81 ± 0,05	4,03 ± 0,03	3,95 ± 0,04	0.709
Leucina	6,83 ± 0,12	6,24 ± 0,20	6,36 ± 0,16	6,43 ± 0,08	6,70 ± 0,05	6,51 ± 0,09	0.777
Lisina	7,19 ± 0,17	6,44 ± 0,23	6,58 ± 0,20	6,56 ± 0,04	6,98 ± 0,06	6,51 ± 0,09	0.642
Metionina	2,44 ± 0,05	2,19 ± 0,06	2,31 ± 0,08	2,29 ± 0,03	2,41 ± 0,03	2,20 ± 0,03	0.635
Fnilalanina	3,65 ± 0,09	3,67 ± 0,09	3,73 ± 0,10	3,59 ± 0,04	3,90 ± 0,03	3,77 ± 0,07	0.887
Treonina	4,13 ± 0,07	3,74 ± 0,13	3,78 ± 0,11	3,81 ± 0,04	3,97 ± 0,04	3,89 ± 0,04	0.731
Triptofano	0,88 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,87 ± 0,004	0,86 ± 0,02	0,84 ± 0,01	0,91 ± 0,02	0.850
Valina	4,82 ± 0,11	4,46 ± 0,14	4,40 ± 0,15	4,35 ± 0,06	4,63 ± 0,05	4,68 ± 0,06	0.756
<b>Aminoácidos não essenciais</b>							
Alanina	6,48 ± 0,12	5,96 ± 0,20	6,07 ± 0,19	5,79 ± 0,07	6,20 ± 0,08	6,22 ± 0,07	0.737
Ácido aspártico	8,77 ± 0,16	7,90 ± 0,28	8,18 ± 0,23	8,05 ± 0,10	8,41 ± 0,07	8,09 ± 0,10	0.742
Cisteína	0,81 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0.274
Ácido glutâmico	12,83 ± 0,22	11,43 ± 0,41	11,91 ± 0,31	11,85 ± 0,17	12,33 ± 0,08	11,77 ± 0,14	0.665
Glicina	7,72 ± 0,05	7,32 ± 0,25	7,25 ± 0,18	6,95 ± 0,09	7,32 ± 0,04	7,22 ± 0,07	0.734
Serina	3,86 ± 0,08	3,55 ± 0,12	3,60 ± 0,11	3,56 ± 0,03	3,66 ± 0,04	3,55 ± 0,04	0.848
Tirosina	3,02 ± 0,04	3,03 ± 0,09	2,86 ± 0,08	2,84 ± 0,03	3,08 ± 0,05	3,11 ± 0,05	0.689

<sup>1</sup>Valores foram expressos como médias (± EPM) de quatro repetições (n = 4).



### *Retenção corporal dos aminoácidos*

Os valores médios da retenção corporal de aminoácidos em tilápias do Nilo são apresentados na Tabela 7. Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) sobre a retenção corporal de treonina, alanina e serina. Ocorreu maior retenção corporal de arginina ( $P = 0,018$ ) em peixes alimentados com  $11,0 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina comparados aos peixes alimentados com  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina. A retenção corporal de triptofano foi menor ( $P < 0,01$ ) em peixes alimentados com a dieta 6, com  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina. Contudo, a retenção corporal de histidina, ácido aspártico e cisteína corporal foi menor ( $P < 0,05$ ) em peixes alimentados com  $8,5$  e  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina em relação aos peixes alimentados com as dietas dos demais tratamentos. A retenção de isoleucina, metionina, ácido glutâmico e glicina corporal foi maior ( $P < 0,05$ ) em peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina em relação aos peixes que consumiram as dietas com os demais níveis de isoleucina. Foi observado menor retenção corporal de leucina ( $P < 0,01$ ) em peixes alimentados com  $8,5$ ,  $20,5$  e  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina em relação aos peixes alimentados com  $11,0$  e  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina, enquanto a retenção de fenilalanina foi menor ( $P < 0,01$ ) em peixes alimentados com  $8,5$ ,  $17,2$  e  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina em comparação ao observado nos peixes dos demais tratamentos. A retenção de lisina corporal foi menor ( $P < 0,01$ ) em peixes alimentados com  $8,5 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina e maior nos demais tratamentos. O contrário ocorreu com a retenção corporal de valina, que foi maior ( $P = 0,002$ ) para os peixes alimentados com  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina e menor para os peixes alimentados com  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina. A retenção de tirosina corporal foi menor ( $P = 0,004$ ) em peixes alimentados com  $23,4 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina em relação ao observado nos peixes dos demais tratamentos.

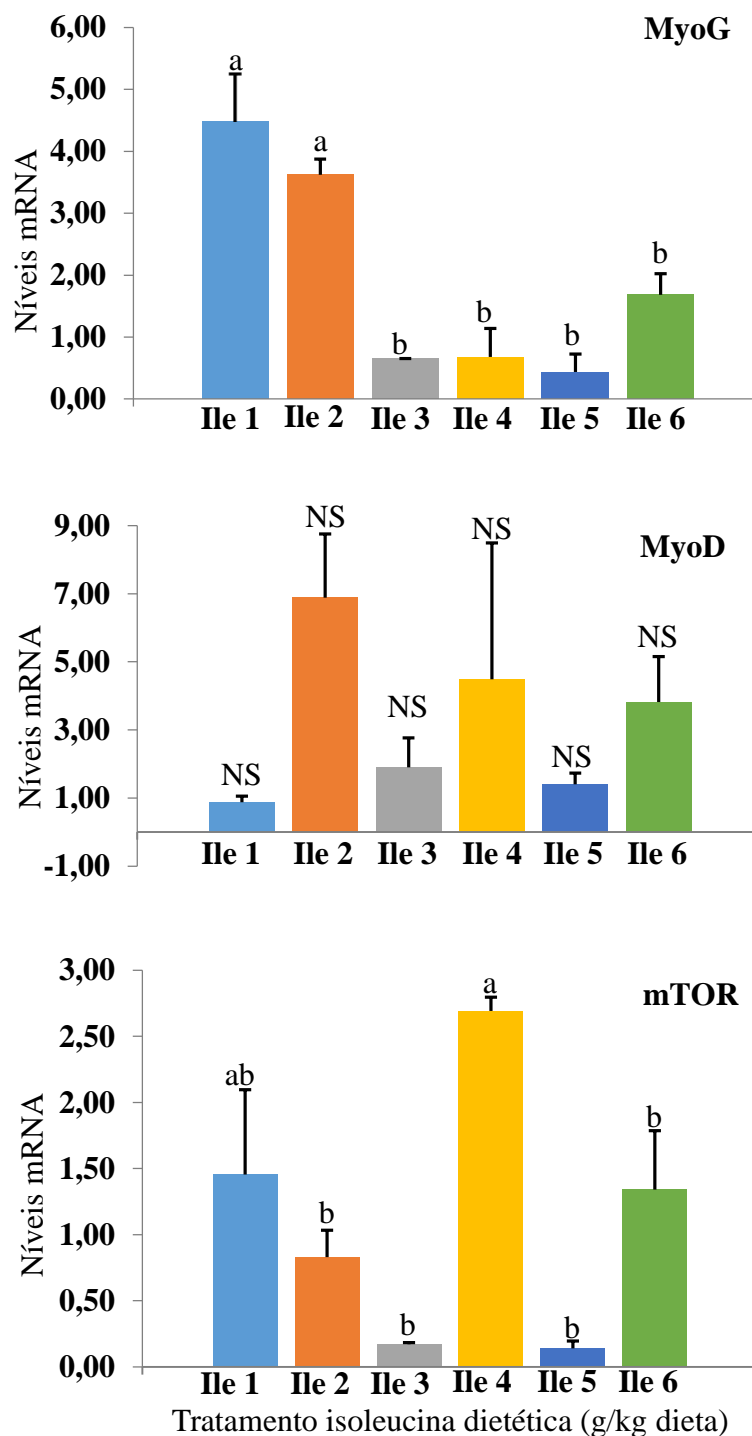
**Tabela 7:** Retenção corporal de aminoácidos (g 100 g<sup>-1</sup>) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de isoleucina<sup>1</sup>

	Níveis de isoleucina dietética (g 100 g <sup>-1</sup> )						<i>P</i>
	Ile 1 8,5	Ile 2 11,0	Ile 3 13,8	Ile 4 17,2	Ile 5 20,5	Ile 6 23,4	
<b>Aminoácidos essenciais</b>							
Arginina	37,3 ± 0,50 <sup>ab</sup>	43,8 ± 1,17 <sup>a</sup>	41,5 ± 0,94 <sup>ab</sup>	41,1 ± 0,46 <sup>ab</sup>	40,7 ± 0,57 <sup>ab</sup>	34,2 ± 0,48 <sup>b</sup>	0.018
Histidina	22,4 ± 0,21 <sup>c</sup>	32,0 ± 0,27 <sup>ab</sup>	34,1 ± 0,37 <sup>ab</sup>	33,4 ± 0,96 <sup>ab</sup>	33,1 ± 0,40 <sup>ab</sup>	27,4 ± 0,69 <sup>c</sup>	<0.001
Isoleucina	26,5 ± 0,76 <sup>b</sup>	31,3 ± 0,26 <sup>b</sup>	38,3 ± 0,70 <sup>a</sup>	29,7 ± 0,33 <sup>b</sup>	31,3 ± 0,29 <sup>b</sup>	26,6 ± 0,77 <sup>b</sup>	<0.001
Leucina	35,8 ± 0,40 <sup>cd</sup>	47,7 ± 0,40 <sup>a</sup>	47,7 ± 0,51 <sup>a</sup>	44,4 ± 0,46 <sup>ab</sup>	38,9 ± 0,61 <sup>bc</sup>	32,6 ± 0,59 <sup>d</sup>	<0.001
Lisina	43,4 ± 0,33 <sup>b</sup>	56,0 ± 0,53 <sup>a</sup>	56,5 ± 0,57 <sup>a</sup>	52,4 ± 0,28 <sup>a</sup>	54,5 ± 0,71 <sup>a</sup>	39,2 ± 0,76 <sup>a</sup>	<0.001
Metionina	29,4 ± 0,32 <sup>c</sup>	37,7 ± 0,58 <sup>b</sup>	43,5 ± 0,61 <sup>a</sup>	37,2 ± 0,36 <sup>b</sup>	39,1 ± 0,47 <sup>ab</sup>	33,9 ± 0,46 <sup>c</sup>	<0.001
Fenilalanina	35,4 ± 1,04 <sup>b</sup>	40,9 ± 0,51 <sup>ab</sup>	45,5 ± 0,38 <sup>ab</sup>	38,0 ± 0,30 <sup>b</sup>	41,1 ± 0,33 <sup>ab</sup>	35,2 ± 0,61 <sup>b</sup>	<0.001
Treonina	41,9 ± 0,91	40,9 ± 1,85	42,9 ± 1,02	42,1 ± 0,30	43,8 ± 0,61	33,2 ± 0,57	0.076
Triptofano	49,6 ± 0,09 <sup>a</sup>	57,5 ± 0,20 <sup>a</sup>	55,6 ± 0,55 <sup>a</sup>	53,3 ± 1,05 <sup>a</sup>	52,1 ± 1,44 <sup>a</sup>	35,9 ± 0,76 <sup>b</sup>	<0.001
Valina	42,8 ± 0,66 <sup>b</sup>	47,6 ± 1,00 <sup>ab</sup>	53,7 ± 0,68 <sup>ab</sup>	44,5 ± 0,57 <sup>b</sup>	47,2 ± 0,65 <sup>ab</sup>	40,4 ± 0,97 <sup>b</sup>	0.002
<b>Aminoácidos não essenciais</b>							
Alanina	40,0 ± 0,80	39,7 ± 1,78	44,5 ± 0,38	38,9 ± 0,38	41,6 ± 0,58	37,1 ± 0,58	0.296
Ácido aspártico	53,6 ± 0,64 <sup>b</sup>	66,9 ± 0,52 <sup>a</sup>	66,4 ± 0,56 <sup>a</sup>	61,1 ± 0,54 <sup>a</sup>	63,7 ± 0,79 <sup>a</sup>	35,7 ± 0,55 <sup>c</sup>	<0.001
Cisteína	25,4 ± 0,66 <sup>b</sup>	31,2 ± 0,57 <sup>a</sup>	35,7 ± 0,60 <sup>a</sup>	36,1 ± 0,27 <sup>a</sup>	36,4 ± 0,58 <sup>a</sup>	23,3 ± 0,30 <sup>b</sup>	<0.001
Ácido glutâmico	24,7 ± 0,10 <sup>b</sup>	25,7 ± 0,15 <sup>b</sup>	35,1 ± 0,52 <sup>a</sup>	26,8 ± 0,42 <sup>b</sup>	26,8 ± 0,28 <sup>b</sup>	24,1 ± 0,50 <sup>b</sup>	<0.001
Glicina	47,4 ± 0,12 <sup>d</sup>	54,0 ± 0,50 <sup>c</sup>	68,4 ± 0,32 <sup>a</sup>	63,7 ± 0,70 <sup>ab</sup>	59,5 ± 0,42 <sup>b</sup>	45,2 ± 0,36 <sup>d</sup>	<0.001
Serina	49,4 ± 1,98	44,0 ± 1,95	48,7 ± 0,36	44,5 ± 0,28	45,8 ± 0,97	37,0 ± 0,82	0.117
Tirosina	39,9 ± 0,95 <sup>ab</sup>	44,0 ± 0,49 <sup>ab</sup>	44,4 ± 0,49 <sup>ab</sup>	39,5 ± 0,28 <sup>ab</sup>	41,9 ± 0,59 <sup>ab</sup>	35,3 ± 0,61 <sup>b</sup>	0.004

<sup>1</sup>Valores médias sobrescritos na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey's ( $P > 0.05$ ). <sup>1</sup>Valores foram expressos como médias (± EPM) de quatro repetições (n = 4).

*Expressão gênica da musculatura branca*

A expressão do mRNA da MyoD não foi influenciada ( $P > 0.05$ ) pelos níveis de isoleucina. Diferentemente, a expressão do mRNA da miogenina e da mTOR na musculatura branca dos peixes foi influenciada ( $P = 0.05$ ) com os níveis de isoleucina dietética (Figura 2).



**Figura 2.** Expressão dos genes MyoD, MyoG (miogenina) e mTOR da musculatura branca de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de isoleucina. Letras diferentes entre as colunas diferem entre si. (NS= não significativo). Valores foram expressos como médias ( $\pm$  EPM) de quatro repetições (n = 4).

Os níveis de expressão do mRNA da miogenina em peixes alimentados com 8,5 e 11,0 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina foram maiores ( $P < 0.05$ ) comparado ao observado em peixes alimentados com 20,5 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina. Por outro lado, os níveis do mRNA da mTOR foram maiores para peixes alimentados com a dieta 4 com 17,2 g kg<sup>-1</sup> isoleucina ( $P < 0.05$ ) comparado com os peixes alimentados com 20,5 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina.

## Discussão

Os peixes não apresentaram sinais de patologias, o que refletiu na melhor utilização da dieta. O mesmo foi observado em juvenis de *Catla catla* (Zehra e Khan, 2013) e juvenis de *Megalobrama amblycephala* (Ren et al., 2017), alimentados com 11,8 e 13,8 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina, respectivamente. Foi demonstrado que a isoleucina é um aminoácido potencialmente limitante para tilápias. A taxa de ganho de peso foi similar ao obtido em criação comercial nas condições brasileiras em tanques-rede (Schulter e Vieira Filho, 2017). Foi utilizada elevada densidade de peixes na presente pesquisa, equivalente a 200 peixes/m<sup>3</sup>, para simular condições de criação comercial de tilápias.

A exigência para tilápias foi de 13,46 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina por meio da regressão *Broken-Line*, com base na resposta do ganho de peso. Esse valor é superior ao determinado anteriormente por Santiago e Lovell (1988) para alevinos de tilápia do Nilo (8,70 g kg<sup>-1</sup>), que também usaram 28 % de proteína em dietas purificadas, para assegurar a máxima utilização dos aminoácidos limitantes. Esse maior valor na exigência de isoleucina é devido as mudanças no manejo empregado, genética dos peixes e a técnica empregada na formulação das dietas, usando o conceito da nutrição de precisão.

Tal valor aproximou-se dos obtidos por outros autores como Ahmed e Khan (2006) para juvenis de *Cirrhinus mrigala* (12,6 g kg<sup>-1</sup>), Zhao et al. (2012) para juvenis de *Cyprinus carpio* (12,9 g kg<sup>-1</sup>), Zehra e Khan (2013) para juvenis de *Catla catla* (11,3 g kg<sup>-1</sup>), sendo inferior ao descrito por Khan e Abidi (2007) para juvenis de *Labeo rohita* (15,2 a 15,9 g kg<sup>-1</sup>), Shang et al. (2009) para juvenis de *cenopharyngodon idellus* (14,6 g kg<sup>-1</sup>), e próximo ao valor descrito por Ren et al. (2017) para juvenis de *Megalobrama amblycephala* (13,8 g kg<sup>-1</sup>).

No presente trabalho, o melhor peso final e ganho de peso foi obtido pelos peixes que consumiram dieta com 13,46 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina, proporcionando uma relação leucina:isoleucina de ~1,30, sugerindo ser a melhor relação para evitar

antagonismo entre esses aminoácidos. Essa relação entre leucina:isoleucina é superior à obtida com alevinos de tilápia do Nilo por Santiago e Lovell (1988), de 1,09. Sendo assim, dietas deficientes em um determinado aminoácido ocasiona redução da ingestão alimentar, como é o caso da isoleucina, causando desaminação de outros aminoácidos no fígado, menor peso final e ganho de peso e dificulta a realização da síntese proteica (Wu, 2013; Yaghoubi et al., 2017).

A isoleucina é um aminoácido limitante e participa na síntese proteica, produção de energia e pode ocorrer antagonismo com os aminoácidos de cadeia ramificada, a isoleucina, leucina e valina (NRC, 2011; Wu, 2013), que juntamente com os demais aminoácidos, são responsáveis pelo desenvolvimento do tecido muscular dos peixes (Khan e Abidi, 2007). Em caso de antagonismo, ocorre menor desenvolvimento do tecido muscular, atribuído ao efeito antagonista com a leucina, limitando o uso da isoleucina e valina (Feng et al., 2017).

Os aminoácidos de cadeia ramificada devem estar em equilíbrio para evitar antagonismo, que pode comprometer o transporte pelas células e disfunção de moléculas de sinalização (NRC, 2011; Wu, 2009). O antagonismo ocorre entre aminoácidos relacionados quimicamente ou estruturalmente, como é o caso da leucina-isoleucina-valina, sendo corrigido pela adição de um aminoácido semelhante quimicamente ou estruturalmente (Wu, 2013), evitando o efeito negativo causado pelo desbalanceamento de aminoácidos e que prejudica o desempenho dos peixes.

No presente estudo, o maior consumo e conversão alimentar em peixes que receberam a dieta contendo  $13,8 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina provavelmente ocorreu em função do melhor balanceamento de aminoácidos na dieta. Não foi observado efeito da utilização de dietas com níveis crescentes de isoleucina sobre o índice hepatossomático dos peixes. Por outro lado, diferiu dos resultados de Zerha e Khan (2013) e Zhao et al. (2012), que encontraram diferenças para os níveis de  $0,5$  e  $9,5 \text{ g kg}^{-1}$  de isoleucina em *Catla catla* e *Cyprinus carpio*, respectivamente alimentados com diferentes níveis de isoleucina, essa diferença pode ser atribuída ao acúmulo excessivo de gordura no fígado (Zerha e Khan, 2013).

O fornecimento de dietas balanceadas em aminoácidos é indispensável para a saúde dos peixes, como para a regulação das suas funções fisiológicas, garantindo a digestão e absorção das dietas fornecidas, que influenciam no desempenho dos mesmos e menor excreção de produtos nitrogenados, sendo assim melhor aproveitamento das dietas (Oliva-Teles, 2012). Peixes alimentados com dietas deficientes em aminoácidos

apresentaram disfunções fisiológicas e metabólicas, e refletiu na piora do desempenho (Yaghoubi et al., 2017).

Os níveis de isoleucina dietética influenciaram a retenção de proteína, sendo mais elevada em peixes alimentados com 13,8 g kg<sup>-1</sup> de isoleucina em relação aos demais tratamentos, indicando melhor balanceamento quantitativo e ou proporção de aminoácidos na dieta. A piora na retenção de proteína, em peixe alimentado com deficiência ou excesso de isoleucina também foi observada em blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* (Ren et al., 2017).

A composição corporal dos peixes não foi influenciada pelos níveis de isoleucina nas dietas. No entanto, Ahmed e Khan (2006), Khan e Abidi (2007) e Ren et al. (2017) verificaram diferenças sobre a composição corporal em juvenis de *Cirrhinus mrigala*, *Labeo rohita* e *Megalobrama amblycephala*, respectivamente, alimentados com isoleucina dietética. As dietas foram elaboradas para atender as exigências nutricionais de energia e nutrientes, mantendo a relação energia:proteína e o balanceamento dos aminoácidos (com exceção da isoleucina). No entanto, mesmo em dietas com excesso de isoleucina, não foi observada maior deposição de gordura corporal. Fenômeno esperado em função da desaminação dos aminoácidos para a síntese de lípidios (Ren et al., 2017). As dietas formuladas foram adequadas para encontrar a exigência de aminoácidos, por isso os níveis de isoleucina não apresentaram diferença na composição corporal.

Não foi encontrado diferença em relação a composição corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais e da proteína, uma vez que ocorre pequena variação quantitativa na composição corporal de aminoácidos dos peixes, independentemente da espécie ou idade dos mesmos (NRC, 2011). Neste estudo, dietas com níveis crescentes de isoleucina na dieta afetaram significativamente a retenção corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais, com exceção da treonina, alanina e serina. O mesmo foi observado em tilápias alimentadas com níveis crescentes de lisina dietética (Michelato et al., 2016a).

Avaliando a inclusão de níveis crescente de treonina na alimentação de tilápias, Michelato et al. (2016b) também encontraram efeito sobre a retenção corporal de arginina, histidina, treonina, valina, serina e tirosina. Isso é ocasionado pela deficiência ou excesso de aminoácidos, que causa alteração nos processos de transaminação ou deaminação, tendo um gasto energético maior e assim prejudica a utilização e retenção

dos aminoácidos (NRC, 2011). No entanto, ainda faltam estudos a respeito do efeito da isoleucina dietética sobre a retenção corporal de aminoácidos.

Os peixes responderam às dietas com níveis crescentes de isoleucina em relação à expressão dos mRNA da miogenina. Entre os fatores de regulação miogênica (MRF), a MyoD se caracteriza pela proliferação das células satélites, ligada ao fenômeno de hiperplasia, formação de novas fibras musculares (Rescan, 2001; Watabe, 2001), enquanto a miogenina é responsável por determinar a diferenciação das células satélites, ou seja, coordena o aumento das fibras musculares, processo chamado de hipertrofia (Watabe, 2001).

A expressão da MyoD não variou entre os tratamentos. A hiperplasia ocorre predominantemente nos estágios pós-embriônico, em alevinos e juvenis de tilápia (Aguiar et al., 2008), mas pode ocorrer ao longo de toda a vida (Johnston, 2006; Leitão et al., 2011; Valente et al., 2013), sendo modulada pela MyoD. Assim, como a avaliação da expressão de genes foi realizada em peixes com peso corporal de 38,6 a 49,0 g, era esperado menor efeito dos níveis de isoleucina dietética sobre a expressão da MyoD, uma vez que o crescimento dos peixes ocorria predominantemente por hiperplasia. Enquanto a expressão da MyoG foi modificada pelos níveis crescentes de isoleucina, ocasionando o maior ganho de peso dos peixes, representado pelo processo de hipertrofia, que é mediado pela MyoG.

Diversos fatores influenciam os MRFs, mas destaca-se a nutrição (Alami-Durante et al., 2010; Johnston, 2006; Leitão et al., 2011; Mcqueen et al., 2007), podendo modificar a taxa de miogênese, a via de expressão dos genes, síntese e degradação de proteína e a regulação da via de sinalização da proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas (Johnston, 2006). A determinação da exigência de aminoácidos é importante para modular a expressão dos genes envolvidos no crescimento muscular (Valente et al., 2013).

A isoleucina têm papel importante nos mecanismos de crescimento muscular (Rescan, 2001), porém não existem pesquisas relacionando a expressão dos genes MyoD e miogenina em peixes alimentados com diferentes níveis desse aminoácido. Em trabalhos realizados com histidina dietética para tilápias, Michelato et al. (2017) observaram aumento significativo na expressão da MyoD e miogenina. Similarmente, Alami-Durante et al. (2010) ao utilizarem diferentes fontes proteicas na alimentação de truta arco-íris, observaram que a expressão da MyoD diferiu na musculatura branca, enquanto a miogenina não diferiu.



As dietas com níveis crescentes de isoleucina dietética influenciaram a expressão do mRNA da mTOR (alvo de rapamicina). A mTOR desempenha papel importante em regular a via de sinalização da síntese proteica, responsáveis em controlar a massa muscular, translação do mRNA, regula o crescimento celular e proliferação e o metabolismo celular, por meio dos ingredientes e nutrientes presentes na dieta, principalmente a proteína e seus constituintes, os aminoácidos (Valente et al., 2013; Zhao et al., 2012; Zhou et al., 2016).

A isoleucina mostrou efeito em regular as moléculas da via de sinalização da mTOR (Feng et al., 2017; Ren et al., 2015), melhorando o crescimento muscular e o desenvolvimento dos peixes (Zhao et al., 2012), podendo ser influenciado por outros fatores como a glutamina e a insulina, que são sintetizados pela isoleucina e tem efeito sobre a via da mTOR (Wu, 2009). É visto que a isoleucina, leucina e valina, os aminoácidos de cadeia ramificada, também têm influência sobre a expressão do gene mTOR, em que a leucina é encontrada em maximizar a taxa de síntese da proteína muscular (Kawanago et al., 2015; Moro et al., 2016), mais estudos são necessários em enfatizar o efeito da isoleucina sobre a via da mTOR.

A expressão dos genes MyoD, miogenina e mTOR são importantes para estudos com nutrição de organismos aquáticos relacionados ao crescimento muscular dos peixes. A contínua determinação das exigências de aminoácidos é necessária para atualizar as tabelas de nutrição, considerando que a atual criação de tilápias tem como base a aplicação do conceito de nutrição de precisão. Considerando que a isoleucina é um aminoácido potencialmente limitante em dietas para tilápias do Nilo, sua exigência foi superior ao estimado anteriormente para a tilápia do Nilo, sendo mais condizente com os atuais valores aplicados em dietas comerciais. Isso se deve também aos avanços no melhoramento genético, melhoras no sistema de criação e a formulação de dietas práticas, onde a tilápia se tornou mais exigente para atingir o rápido crescimento.

Concluiu-se que a exigência de isoleucina para o máximo ganho de peso de juvenis de tilápia do Nilo foi determinado em 13,46 g kg<sup>-1</sup>, que possibilita melhor crescimento, retenção de aminoácidos e maior expressão de genes.

## **Referências**

Aguiar, D.H., Bock, C., Padovani, C.R., Pai-Silva, M.D. 2008. MyoD, myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture research*, 39, 1673-1679.

- Ahmed, I.; Khan, M.A. 2006. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *British Journal of Nutrition*. 96, 450-460.
- Alami-Durante, H., Wrutniak-Cabello, C., Kaushik, S.J., Médale, F. 2010. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 156, 561-568.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International (16th edn). Arlington, Virginia, 1995.
- Feng, L., Gan, L., Jiang, W.D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Zhou, X.Q. 2017. Gill structural integrity changes in fish deficient or excessive in dietary isoleucine: Towards the modulation of tight junction protein, inflammation, apoptosis and antioxidant defense via NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signaling pathways. *Fish & Shellfish Immunology*. 63, 127-138.
- Furuya, W. M. 2013. Nutrição de tilápias no Brasil. *Revista Varia Scientia Agrárias*; 3: 133-150.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Pezzato, A.C., Barros, M.M., Miranda, E.C. 2001. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30, 1143-1149.
- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E. Barros, M.M. 2008a. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*. 14, 396-404.
- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Barros, M.M. Tachibana, L. 2008b. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia. *Journal of the World Aquaculture Society*. 39, 781-789.
- Johnston, I. A. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*. 209, 2249-2264.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*. 177, 99-115.
- Kawanago, M., Takemura, S., Ishizuka, R., Shioya, I. 2015. Dietary branched- chain amino acid supplementation affects growth and hepatic insulin- like growth factor gene expression in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, *Aquaculture Nutrition*, 21: 63-72,
- Khan, M.A., Abidi, S.F. 2007. Dietary isoleucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*. 13, 424-430.
- Kimball, S.R., Jefferson, L.S. 2006. New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *The American journal of clinical nutrition*. 83, 500–507.

- Koumans, J.T.M., Akster, H.A. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 110, 3-20.
- Leitão, N.J., Dal Pai-Silva, M., de Almeida, F.L. A., Portella, M.C. 2011. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture*. 315, 78-85.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. *Methods*. 25, 402-408.
- Macqueen, D.J., Robb, D., Johnston, I.A. 2007. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Experimental Biology*. 210, 2781-2794.
- Michelato, M., Zaminhan, M., Boscolo, W.R., Nogaroto, V., Vicari, M., Artoni, R.F., Furuya, W.M. 2017. Dietary histidine requirement of Nile tilapia juveniles based on growth performance, expression of muscle-growth-related genes and haematological responses. *Aquaculture*. 467, 63-70.
- Michelato, M., de Oliveira Vidal, L.V., Xavier, T.O., de Moura, L.B., de Almeida, F.L. A., Pedrosa, V.B., Furuya, W.M. 2016a. Dietary lysine requirement to enhance muscle development and fillet yield of finishing Nile tilapia. *Aquaculture*. 457, 124-130.
- Michelato, M., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Graciano, T.S., De Moura, L.B., Furuya, V.R.B., Furuya, W.M. 2016b. Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast- growing Nile tilapia. *Aquaculture Nutrition*. 22, 759-766.
- Moro, T., Ebert, S.M., Adams, C.M., Rasmussen, B.B. 2016. Amino acid sensing in skeletal muscle. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 27, 796-806.
- Neu, D.H., Boscolo, W.R., Almeida, F.L.A., Zaminhan Hassemer, M., Dallagnol, J.M., Furuya, W.M. 2017. Growth performance, hematology, and muscle growth in isoleucine fed Nile tilapia. *Boletim do Instituto de Pesca*. 87020, 900.
- NRC - National Research Council. 2011. *Nutrient requirements of fish and shrimp*. Washington: National academies press. 330p.
- Oliva- Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of fish diseases*. 35, 83-108.
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M., Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M., Pezzato A.C. 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 31, 1595-1604.
- Pohlenz, C., Buentello, A., Mwangi, W., Gatlin III, D.M. 2012. Arginine and glutamine supplementation to culture media improves the performance of various channel catfish immune cells. *Fish Shellfish Immunology*. 32, 762-768.
- Ren, M., Habte- Tsion, H.M., Liu, B., Miao, L., Ge, X., Xie, J., Zhou, Q. 2017. Dietary isoleucine requirement of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture Nutrition*. 23, 322-330.

- Ren, M., Habte-Tsion, H.M., Liu, B., Miao, L., Ge, X., Xie, J., Pan, L. 2015. Dietary leucine level affects growth performance, whole body composition, plasma parameters and relative expression of TOR and TNF- $\alpha$  in juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*. 448, 162-168.
- Rescan, P. Y. 2001. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 130, 1-12.
- Santiago, C.B., Lovell, R.T. 1988. Amino acid requirement for growth of Nile tilapia. *Journal Nutrition*. 118, 1540-1546.
- Schulter, E. P., Vieira Filho, J. E. R. 2017. Evolução da Piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia.
- Silva, M.D.P., Carvalho, R.F. 2007. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 21-31.
- Shang, X., Luo, L., Wen, H., Gao, W., Wang, Q., Xu, H. 2009. Study on isoleucine requirement for juvenile grass carp, *cenopharyngodon idellus*. *Journal of Fisheries of China*. 33, 813-822.
- Thoreen, C.C., Chantranupong, L., Keys, H.R., Wang, T., Gray, N.S., Sabatini, D.M., 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*; 485: 109–113.
- Valente, L.M., Moutou, K.A., Conceição, L.E., Engrola, S., Fernandes, J.M., Johnston, I.A. 2013. What determines growth potential and juvenile quality of farmed fish species. *Reviews in Aquaculture* 5, s1.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Azizi, S., Perelló, M., Salmerón, C., Riera-Codina, M., Navarro, I. 2017. Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture*. 467, 28-40.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Jiménez-Amilburu, V., Riera-Codina, M., Cappila, E., Navarro, I., Gutiérrez, J. 2014. IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *General and Comparative Endocrinology*. 205, 296-304.
- Watabe, S. 2001. Myogenic regulatory factors. In: JOHNSTON, I.A. *Muscle Development and Growth*. London: Academic Press, 19-41.
- Wu, G. 2013. *Amino acids: biochemistry and nutrition*, CRC Press.
- Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*. 37 1-17.
- Yaghoubi, M., Torfi Mozanzadeh, M., Marammazi, J. G., Safari, O., Gisbert, E. 2017. Effects of dietary essential amino acid deficiencies on the growth performance and humoral immune response in silvery- black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles. *Aquaculture Research*; 48: 5311-5323.
- Zhao, J., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Jiang, W., Li, S., Zhou, X. 2013. Effects of dietary isoleucine on the immune response, antioxidant status and gene expression in the

head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish & shellfish immunology*. 35, 572-580.

Zhao, J., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Chen, G., Jiang, W., Zhou, X. 2012. Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*. 368, 117-128.

Zehra, S., Khan, M. A. 2013. Dietary isoleucine requirement of fingerling catla, *Catla catla* (Hamilton), based on growth, protein productive value, isoleucine retention efficiency and carcass composition. *Aquaculture international*. 21, 1243-1259.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., Hall, M.N. 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*; 144: 757–768.

Zhou, Q.L., Habte- Tsion, H.M., Ge, X., Liu, B., Xie, J., Ren, M., Pan, L. 2016. Growth performance and TOR pathway gene expression of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*, fed with diets replacing fish meal with cottonseed meal. *Aquaculture Research*; 48: 3693-3704.

### **III – Efeito da interação dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) sobre o desempenho e retenção de aminoácidos de alevinos de tilápia do Nilo\***

*\*De acordo com normas de publicação da Aquaculture, ISSN 0044-8486, Fator de impacto = 2,570*

#### **RESUMO:**

Os efeitos de dietas contendo excedentes de isoleucina, leucina e valina de forma isolada ou combinada foram estudados em um ensaio de crescimento com alevinos de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, composição corporal e retenção de aminoácidos. Os peixes (n = 320, peso inicial médio de  $1,70 \pm 0,88$  g) foram distribuídos em cinco grupos. Uma dieta basal contendo  $281,36 \text{ g kg}^{-1}$  de proteína bruta e  $4490,85 \text{ kcal kg}^{-1}$  de energia bruta foi elaborada (Controle), e mais quatro dietas com excesso de isoleucina (+Ile), leucina (+Leu), valina (+Val) e Ile, Leu e Val (+BCAA) foram elaboradas. Peixes alimentados com a dieta controle e +BCAA apresentaram maior peso final e ganho de peso em comparação com os peixes alimentados com as demais dietas. Peixes alimentados com as dietas +Ile, +Leu, + Val e +BCAA apresentaram redução na retenção de proteína em comparação com os observados em peixes alimentados com dieta controle. Apesar da semelhança no ganho de peso em peixes alimentados com a dieta controle e +BCAA, foi observado maior deposição de gordura corporal nos peixes alimentados com a dieta +BCAA, indicando a oxidação de aminoácidos para produzir energia ao invés da síntese de proteína. Não foi observado antagonismo entre os aminoácidos aromáticos, sendo que o excesso de isoleucina, leucina e valina afetou negativamente apenas a retenção do próprio aminoácido suplementado em excesso. Foi observada menor excreção de nitrogênio em peixes que consumiram a dieta controle em relação aos peixes que consumiram as demais dietas. Concluiu-se que não ocorre antagonismo entre os aminoácidos aromáticos em dietas para alevinos de tilápia do Nilo alimentados e que é importante considerar o balanceamento de aminoácidos aromáticos para otimizar a utilização de aminoácidos dietéticos para síntese proteica e conseqüentemente melhorias no crescimento e eficiência alimentar de peixes.

**Palavras-chaves:** expressão de genes, nutrição, peixe, síntese proteica

**The effects of branched amino acids interactions on growth performance and amino acids retention of Nile tilapia fingerlings**

**ABSTRACT:**

The effects of diets containing excess of isolated or combined isoleucine, leucine and valine were studied in growth assays with Nile tilapia fingerlings based on growth performance, body composition and amino acids retention. Fish (n = 320, with an average initial weight of  $1.70 \pm 0.88$  g) were allotted to one of the five dietary groups. A basal diet containing  $281.36 \text{ g kg}^{-1}$  of crude protein) and isoenergetic diets ( $4490.85 \text{ kcal. kg}^{-1}$  of gross energy) was elaborated (Control), and four more diets with excess of isoleucine (+Ile), leucine (+Leu), valine (+Val) and isoleucine, leucine and valine (+BCAA) were elaborated. Fish fed control and +BCAA diets showed higher final weight and weight gain compared to those fed with other diets. Fish fed +Ile, +Leu, +Val and +BCAA showed reduced protein retention compared to observed in fish fed control diet. Despite of comparable weight gain of fish fed control and +BCAA diet, higher body lipid was observed in fish fed +BCAA, indicating amino acids oxidation to produce energy rather than protein synthesis. No antagonism was observed between the aromatic amino acids, and the excess of isoleucine, leucine and valine adversely affect the retention of excess amino acid supplemented itself. Fish fed with control diet excreted less nitrogen than those who consumed the other diets. It was concluded that there is no antagonism between aromatic amino acids in diets fed Nile tilapia fingerlings and that it is important to consider the balancing of aromatic amino acids to optimize the use of dietary amino acids for protein synthesis and consequently improvements in fish feed growth and efficiency.

**Key words:** gene expression, nutrition, fish, protein synthesis

## Introdução

A proteína é um nutriente importante em dietas para peixes e o balanceamento dietético de aminoácidos influencia o crescimento e a saúde dos mesmos. Entre os aminoácidos, após a lisina, metionina, treonina e histidina, destacaram-se os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), isoleucina, leucina e valina, que são metabolizados principalmente no músculo esquelético e compartilham as mesmas enzimas nos processos de transaminação e descarboxilação oxidativa para gerar seus respectivos cetoácidos (Cole, 2015), importantes para a realização da síntese proteica muscular (Wu, 2013).

O antagonismo entre BCAA pode ocorrer principalmente pelo excesso de leucina, na qual seu cetoácido, o  $\alpha$ -cetoisocaproato, regula o aumento da atividade da desidrogenase de cadeia ramificada e diminui as concentrações do  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvalerato e  $\alpha$ -cetoisovalerato da isoleucina e valina, respectivamente, resultando em maior catabolismo dos mesmos e menor síntese proteica (Shinnick e Harper, 1977; Murakami et al., 2005), levando a mudanças em suas concentrações plasmáticas e tecidual (Zhen et al., 2015). Tal efeito, pode ser evitado com a suplementação de isoleucina e valina, para manter o equilíbrio na dieta.

A constatação do antagonismo foi verificada em ratos (Harper et al., 1954) posteriormente foi demonstrado em frangos e suínos (Smith e Austic, 1978; Wiltafsky e Roth, 2008). Em peixes existe evidências para poucas espécies (Hughes et al., 1984; Robinson et al., 1984; Choo et al., 1991; Yamamoto et al., 2004; Ahmed e Khan, 2006) e os quais os resultados são inconsistentes, necessitando mais estudos com outras espécies, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A suplementação de leucina ativa o gene alvo da rapamicina (mTOR) (Jiang et al., 2015; Manifava et al., 2016) e a isoleucina melhora o crescimento dos peixes e a capacidade digestiva e absorptiva de nutrientes (Zhao et al., 2012), sendo que a valina melhora as características físicas e o sabor da carne e possui atividade antioxidante (Luo et al., 2017), responsáveis também, pela síntese proteica e crescimento muscular (Wu, 2013; Vélez et al., 2017).

A tilápia do Nilo é umas das espécies mais estudadas globalmente. Pois apresenta boa adaptação climática, rusticidade, rápido crescimento, boa conversão alimentar, precocidade reprodutiva, boa obtenção de larvas e tolerância a doenças (El-Sayed, 1998; Gupta e Acosta, 2004). No entanto, ainda faltam estudos sobre o



antagonismo entre BCAA para essa espécie, para possibilitar a formulação de dietas balanceadas em aminoácidos. O presente estudo foi elaborado com o objetivo de avaliar dietas com diferentes níveis de BCAA para avaliar interrelações e/ou antagonismos sobre o desempenho produtivo, composição corporal e perfil dos aminoácidos, retenção de aminoácidos e morfometria intestinal em alevinos de tilápias do Nilo.

## **Material e métodos**

### **Local de realização e instalações experimentais**

A presente pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Protocolo 6350/2017).

O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), PR, Brasil no período de outubro a novembro de 2016, durante oito semanas. Foram utilizados 320 tilápias do Nilo, da variedade SUPREME (Aquabel, Rolândia, PR, Brasil), com peso corporal inicial médio de  $1,70 \pm 0,88$  g, masculinizados durante a fase larval. Os peixes foram distribuídos em 20 aquários com volume unitário de 70 L (35,5 x 57,0 x 35,0 cm de altura, comprimento e largura, respectivamente), em delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições.

Os aquários foram mantidos em sistema de recirculação com biofiltro, filtro UV e dois aquários de decantação de 150 L cada. Em cada aquário foi mantida aeração por meio de pedra porosa e mangueira acoplada a um soprador de 0,5 CV, de forma a manter o teor de oxigênio entre 6,0 a 6,5 mg/L. A temperatura foi controlada por meio de aquecedor acoplado a um termostato, para manter a temperatura em  $27 \pm 1$  °C. Semanalmente, foram monitorados os parâmetros de oxigênio dissolvido (5,8) e temperatura 28,2 °C por meio de oxímetro digital portátil, pH (6,1) por meio de pHmetro de bancada digital e amônia total 0,08 mg/L, nitrito 0,05 mg/L e nitrato 0,4 mg/L por meio de colorímetro. A retirada das fezes foi realizada por meio de sifonagem, realizada a cada três dias.

### **Dietas e manejo alimentar**

Foi elaborada uma dieta basal (Controle), com 281,36 g kg<sup>-1</sup> de proteína bruta e 4490,85 kcal kg<sup>-1</sup> energia bruta, atendendo as exigências de aminoácidos para tilápias (NRC, 2011). A partir da dieta basal foram elaboradas três dietas: (+Ile), com elevado nível de isoleucina; (+Leu), com elevado nível de leucina e (+Val), com elevado nível de valina. As dietas +Ile, +Leu e +Val foram suplementadas com isoleucina, leucina e

valina de forma a conterem o dobro dos respectivos valores contidos na dieta controle (Tabela 1).

Os valores de energia bruta e fósforo total das dietas foram estimados por meio de valores descritos por Furuya et al. (2001), Pezzato et al. (2002) e Guimarães et al. (2008a, b), em estudos realizados com tilápia do Nilo. Os valores de aminoácidos essenciais e não essenciais das dietas foram confirmados por meio de análises laboratoriais (Tabela 2).

As dietas foram moídas em moinho martelo em peneira com furos de 0,5 mm de diâmetro, granuladas em moinho de carne com adição de 30% de água (55 °C) e secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C durante 24 horas. Após, foram desintegradas em moinho bola, selecionando-se os grânulos com diâmetro  $\geq 0,5$  e  $\leq 0,8$  mm para peixes até 3 g de peso corporal, diâmetro  $\geq 0,8$  e  $\leq 1,0$  mm para peixes de 3,1 a 10 g de peso corporal e grânulos com diâmetro  $\geq 1,0$  e  $\leq 2,0$  mm para peixes de 10,1 a 40,0 g de peso corporal. Para tal, seis peixes de cada caixa foram pesados semanalmente para correção do tamanho dos grânulos a serem fornecidos.

**Tabela 1:** Formulação e composição química das dietas experimentais ( $g\ kg^{-1}$  dieta) para tilápias do Nilo.

Ingrediente	Dietas ( $g\ kg^{-1}$ )				
	Controle	+Ile	+Leu	+Val	+BCAA
Quirera de arroz <sup>1</sup>	643,42	643,42	643,42	643,42	643,42
Farinha de peixe <sup>1</sup>	210,00	210,00	210,00	210,00	210,00
Óleo de peixe	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
$\alpha$ -celulose	26,00	20,00	20,00	20,00	20,00
L -ácido aspártico	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
DL-metionina	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
L-lisina	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
L-treonina	4,90	4,90	4,90	4,90	4,90
L-triptopano	2,90	2,90	2,90	2,90	2,90
L-histidina	4,90	4,90	4,90	4,90	4,90
L-ácido glutâmico	50,00	43,48	42,80	44,10	18,38
L-isoleucina	5,48	18,00	5,48	5,48	18,00
L-leucina	-	-	13,20	-	13,20
L-valina	3,00	3,00	3,00	14,90	14,90
Premix <sup>3</sup>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Antioxidante <sup>5</sup>	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Antifúngico <sup>6</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Carboximetilcelulose	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Bicarbonato de sódio	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
<i>Composição química analisada (<math>g\ kg^{-1}</math> dry matter)</i>					
Matéria seca	949,5	943,8	945,1	945,3	946,8
Energia bruta, kcal/kg	4490,85	4501,95	4531,59	4556,99	4490,52
Proteína bruta	281,36	280,25	281,59	281,25	282,39
Lipídio bruto	57,44	57,22	56,13	55,95	54,03
Fibra bruta	31,06	30,50	30,28	30,73	29,95
Cinzas	70,13	68,25	68,21	69,06	68,18
Cálcio	12,75	12,68	12,63	12,63	12,60
Fósforo total <sup>7</sup>	8,12	8,11	8,07	8,01	8,01

<sup>1</sup>De acordo com Guimarães et al. (2008a), como  $g\ kg^{-1}$  da matéria seca: milho (16,9 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 72,1 de proteína bruta; 42,4 de lipídios totais; 20,0 de fibra bruta; 12,0 de cinzas), arroz (15,5 MJ  $kg^{-1}$  de energia bruta; 82,1 de proteína bruta; 82,6 de lipídios totais; 7,50 de fibra bruta; 7,80 de cinzas),

<sup>2</sup>De acordo com Guimarães et al. (2008b), como  $g\ kg^{-1}$  da matéria seca: farinha de soja (19,3 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 512,1 proteína bruta; 14,8 lipídios totais; 71,2 fibra bruta; 74,4 cinza), Subprodutos da avicultura (20,4 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 627,9 proteína bruta; 171,8 lipídios totais; 183,2 cinza) e farinha do glúten de milho (20,6 MJ  $kg^{-1}$  energia bruta; 700,7 proteína bruta; 94,8 lipídio bruto; 8,3 fibra bruta; 17,0 cinza),

<sup>3</sup>Mistura vitamínica e mineral: composição por kg: vit, A - 1,200,000 IU, vit, D<sub>3</sub> - 200,000 IU, vit, E - 12,000 mg, vit, K<sub>3</sub> - 2,400 mg, vit, B<sub>1</sub> - 4,800 mg, vit, B<sub>2</sub> - 4,800 mg, vit, B<sub>6</sub> - 4,000 mg, vit, B<sub>12</sub> - 4,800 mg, ácido fólico - 1,200 mg, Pantotenato de cálcio- 12,000 mg, vit, 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,

<sup>4</sup>Vitamina C: Rovimix Stay-C 35 (DSM, São Paulo, São Paulo, Brasil),

<sup>5</sup>Banox®: Alltech Agroindustrial Ltda, São Paulo Brasil,

<sup>6</sup>Mold Zap Aquatica® Composição: dipropionato de amônio, ácido acético, ácido sórbico e ácido benzoico (Alltech Agroindustrial Ltda, Brasil),

<sup>7</sup>De acordo com Furuya et al. (2001b), Pezzato et al. (2002) e Guimarães et al. (2008ab),

**Tabela 2:** Composição de aminoácido das dietas experimentais (g kg<sup>-1</sup> dry dieta) para tilápias do Nilo.

Aminoácido	Dietas (g kg <sup>-1</sup> )				
	Controle	+Ile	+Leu	+Val	+BCAA
<i>Aminoácidos essenciais</i>					
Arginina	11,32	11,37	11,47	11,83	12,52
Histidina	8,58	8,32	8,34	8,31	8,93
Lisina	16,09	16,52	16,83	16,61	16,72
Metionina	7,24	7,25	7,67	7,92	7,57
Fenilalanina	6,93	6,45	6,32	6,86	6,66
Treonina	11,35	11,30	11,30	11,69	11,38
Triptopano	2,98	2,98	2,95	3,16	3,04
Isoleucina	15,56	31,04	15,54	15,52	31,07
Leucina	15,22	15,24	29,31	15,26	29,38
Valina	13,66	13,60	13,64	26,91	26,98
<i>Aminoácidos não essenciais</i>					
Alanina	14,10	13,00	12,44	12,76	12,55
Ácido aspártico	22,40	28,41	27,36	28,87	29,10
Cisteína	1,62	1,68	2,55	1,77	1,82
Ácido glutâmico	21,82	23,12	22,63	23,56	23,35
Glicina	16,02	17,29	17,30	18,83	17,14
Serina	7,05	7,33	7,21	7,61	7,71
Tirosina	5,17	5,20	4,90	5,90	6,12

Após secagem, as dietas foram armazenadas em refrigerador (5 °C). Os peixes foram alimentados seis vezes ao dia, em intervalos de três horas, das 8h às 18h. O arraçoamento foi manual e o fornecimento foi com base em 4% do peso vivo. Ao início do experimento, todos os peixes de cada aquário foram pesados em lotes em balança de precisão (0,01 g),

#### Coleta de amostra e análise laboratorial

No início do experimento, 120 peixes permaneceram em jejum de 24 horas e foram coletados para determinação da composição corporal inicial. Ao final do experimento, de cada aquário e após jejum de 24 horas, todos os peixes foram pesados em balança digital de precisão (0,01g), sendo que oito peixes por unidade experimental

foram coletados para composição corporal. Os peixes foram eutanasiados por meio de superdosagem de benzocaína (100 mg/L).

As amostras para a composição corporal foram moídas em multiprocessador de alimentos, até obter uma amostra homogênea. Posteriormente, foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 48 horas e moídas em moinho bola. As análises de umidade foram determinadas pela secagem em estufa a 105 °C durante 24 h; o extrato etéreo foi determinado pelo extrator Soxhlet com éter como solvente; a cinza foi determinada em mufla a 550 °C por 24 horas, a composição corporal dos peixes e da dieta foram realizadas no Laboratório de Aquicultura da UEPG, seguindo-se metodologia citada por AOAC (1995), As análises de proteína bruta e aminoácidos das rações e dos peixes foram realizadas pelo Laboratório da Ajinomoto do Brasil, Indústria e Comércio de Alimentos, em Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), modelo *Shimadzu*.

### **Cálculos**

Os dados de desempenho produtivo foram calculados de acordo com as equações a seguir:

- Ganho de peso (g): peso final (g) – peso inicial (g)
- Conversão alimentar: consumo de alimento (g) / ganho de peso (g)
- Retenção de proteína (%): ganho em proteína (g) / proteína consumida (g) x 100
- Gordura visceral (%): peso da gordura visceral (g) / peso corporal (g) x 100
- Índice hepatossomático (%): peso do fígado (g) / peso corporal (g) x 100
- Sobrevivência: número de peixes final / número de peixes inicial x 100
- Excreção de nitrogênio (g/kg de ganho de peso): conversão alimentar x nitrogênio da dieta (%) – [(conversão alimentar x nitrogênio da dieta (%)) x eficiência de retenção do nitrogênio da dieta (%)]

### **Análise estatística**

Os valores observados de cada variável resposta foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Em caso de diferenças, foram comparados por meio do teste de

Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1).

## **Resultados**

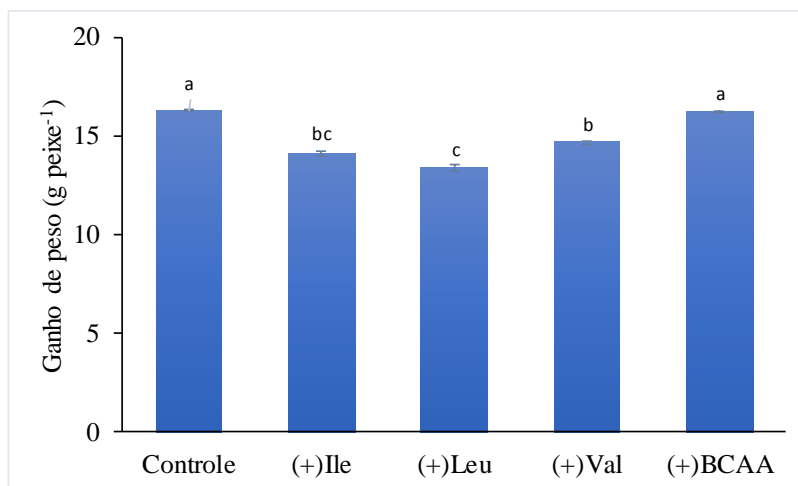
### *Desempenho produtivo*

Foi observado maior peso final ( $P < 0.001$ ) e ganho de peso ( $P < 0,001$ ) (Figura 1) em peixes que receberam a dieta controle e +BCAA em relação aos peixes que receberam as demais dietas. Peixes que receberam a dieta controle e +BCAA consumiram mais ( $P < 0,001$ ) em relação aos peixes que consumiram a dieta +Ile. Por outro lado, não foi observada diferença no consumo pelos peixes que receberam as dietas controle, +Leu, +Val e +BCAA. A pior conversão alimentar ( $P < 0,001$ ) foi observada em peixes que consumiram a dieta +Leu em relação aos peixes que consumiram as demais dietas. Por outro lado, não foram observadas diferenças entre a conversão alimentar para os peixes que consumiram as demais dietas. As menores retenções de proteína ( $P < 0,001$ ) foram observadas em peixes que consumiram as dietas +Leu e +BCAA (Figura 2). Foi observada maior deposição de gordura visceral ( $P < 0,001$ ) em peixes que consumiram as dietas +Ile e +BCAA em relação ao observado nos peixes que consumiram as demais dietas. Por outro lado, não foi observada diferença na deposição de gordura visceral em peixes que consumiram as dietas controle e +Val. Não foi observado efeito dos tratamentos ( $P > 0,05$ ) sobre o peso inicial, índice hepatossomático e sobrevivência (Tabela 3).

**Tabela 3** Desempenho de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos <sup>1</sup>.

Variáveis	Diets					<i>P</i>
	Controle	+Ile	+Leu	+Val	+BCAA	
Peso corporal inicial (g)	1,76 ± 0,01	1,81 ± 0,01	1,77 ± 0,01	1,82 ± 0,02	1,82 ± 0,02	0,642
Peso corporal final (g)	18,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	15,90 ± 0,12 <sup>bc</sup>	15,14 ± 0,16 <sup>c</sup>	16,47 ± 0,09 <sup>b</sup>	18,02 ± 0,05 <sup>a</sup>	<0,001
Ganho de peso (g)	16,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	14,08 ± 0,12 <sup>bc</sup>	13,38 ± 0,17 <sup>c</sup>	14,65 ± 0,09 <sup>b</sup>	16,21 ± 0,05 <sup>a</sup>	<0,001
Consumo alimentar (g)	22,87 ± 0,04 <sup>a</sup>	20,14 ± 0,22 <sup>b</sup>	21,37 ± 0,31 <sup>ab</sup>	21,41 ± 0,26 <sup>ab</sup>	23,42 ± 0,18 <sup>a</sup>	<0,001
Conversão alimentar	1,40 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,43 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,60 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,44 ± 0,01 <sup>b</sup>	<0,001
Retenção de proteína (%)	31,74 ± 0,03 <sup>a</sup>	29,50 ± 0,04 <sup>b</sup>	26,26 ± 0,18 <sup>c</sup>	28,68 ± 0,21 <sup>b</sup>	27,25 ± 0,13 <sup>c</sup>	<0,001
Índice hepatossomático (%)	2,96 ± 0,11	3,93 ± 0,13	3,05 ± 0,112	3,51 ± 0,16	4,10 ± 0,05	0,786
Gordura visceral (%)	2,34 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,80 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,31 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,68 ± 0,03 <sup>c</sup>	3,67 ± 0,08 <sup>ab</sup>	<0,001
Sobrevivência (%)	93,82 ± 1,347	90,73 ± 0,83	90,73 ± 0,83	89,11 ± 0,72	89,11 ± 0,72	0,800

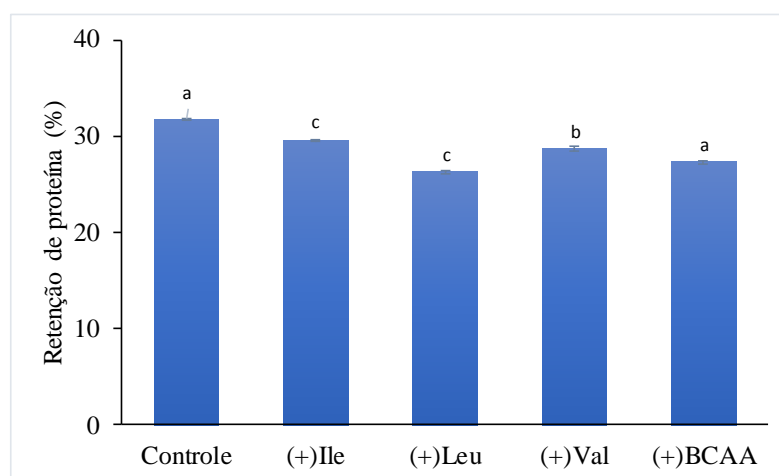
<sup>1</sup>Valores expressos como médias (± EPM) de quatro repetições (n = 4) e valores letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey's (*P* < 0,05).



**Figura 1:** Ganho de peso em alevinos de tilápias do Nilo alimentadas com as dietas experimentais.

Controle = dieta atendendo as exigências de aminoácidos sulfurados, (+)Ile = dieta com excesso de leucina, (+)Leu, dieta com excesso de leucina, (+)Val, dieta com excesso de valina e (+)BCAA, dieta com excesso de isoleucina, leucina e valina.

Valores são médias ( $\pm$  EPM) de quatro repetições e valores com letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2:** Retenção de proteína em alevinos tilápias do Nilo alimentadas com as dietas experimentais.

Controle = dieta atendendo as exigências de aminoácidos sulfurados, (+)Ile = dieta com excesso de leucina, (+)Leu, dieta com excesso de leucina, (+)Val, dieta com excesso de valina e (+)BCAA, dieta com excesso de isoleucina, leucina e valina.

Valores são médias ( $\pm$  EPM) de quatro repetições e valores com letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



### *Composição corporal*

Não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) dos tratamentos sobre a umidade, proteína bruta e cinzas corporal. Por outro lado, peixes que consumiram a dieta +BCAA apresentaram maior conteúdo de gordura corporal ( $P = 0,049$ ) em relação aos peixes da dieta controle. Por outro lado, não foram observadas diferenças no teor de gordura corporal em peixes que receberam as dietas +Ile, +Leu e +Val (Tabela 4). A composição corporal de aminoácidos não foi influenciada ( $P > 0,05$ ) pelos tratamentos avaliados (Tabela 5).

**Tabela 4:** Composição aproximada corporal ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos<sup>1</sup>.

Item	Dietas experimentais ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )					<i>P</i>
	Controle	+Ile	+Leu	+Val	+BCAA	
Umidade	$72,37 \pm 0,03$	$72,05 \pm 0,07$	$72,10 \pm 0,04$	$72,24 \pm 0,05$	$71,65 \pm 0,16$	0,167
Proteína bruta	$12,34 \pm 0,11$	$12,16 \pm 0,21$	$11,81 \pm 0,14$	$11,64 \pm 0,07$	$13,02 \pm 0,44$	0,413
Lipídios totais	$7,63 \pm 0,02^b$	$7,81 \pm 0,04^{ab}$	$7,78 \pm 0,02^{ab}$	$7,74 \pm 0,02^{ab}$	$8,01 \pm 0,06^a$	0,049
Cinzas	$3,69 \pm 0,02$	$3,70 \pm 0,02$	$3,74 \pm 0,02$	$3,55 \pm 0,04$	$3,77 \pm 0,03$	0,147

Valores médios da composição corporal inicial ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ): 81,54 de umidade, 6,70 de proteína bruta, 1,18 de lipídios totais e 1,481 de cinzas,

<sup>1</sup>Valores expressos como médias ( $\pm$  EPM) de quatro repetições ( $n = 4$ ) e valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey's ( $P > 0,05$ ).

### *Retenção corporal dos aminoácidos*

Na Tabela 6, são apresentados os valores médios da retenção corporal de aminoácidos em peixes alimentados com dietas contendo diferentes perfis de aminoácidos aromáticos. Não foram observadas diferença ( $P > 0,05$ ) sobre a retenção corporal de arginina, histidina, metionina, fenilalanina, alanina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, serina e tirosina. Foi observada maior retenção ( $P < 0,001$ ) de isoleucina ( $P < 0,001$ ), leucina, triptofano, valina e ácido aspártico em peixes que receberam a dieta controle em relação aos que receberam a dieta +BCAA. No entanto, peixes que receberam dieta +Ile apresentaram menor retenção corporal de isoleucina ( $P < 0,001$ ), enquanto peixes que receberam a dieta +Leu, apresentaram menor retenção de leucina ( $P < 0,001$ ), sendo que os peixes que receberam a dieta +Val apresentaram menor retenção de valina ( $P < 0,001$ ), em relação aos peixes da dieta controle. Dietas com níveis elevados de isoleucina, leucina e valina resultaram em menor utilização do referido aminoácido, não reduzindo a utilização dos demais aminoácidos aromáticos, indicando não haver antagonismo entre os aminoácidos aromáticos. Da mesma forma, a suplementação em excesso combinada dos aminoácidos aromáticos não resultou em melhoria na utilização dos mesmos (Figura 3).

### *Excreção de nitrogênio*

A maior excreção de nitrogênio ( $P < 0,001$ ) foi observada em peixes alimentados com a dieta +Leu, enquanto a menor excreção de nitrogênio foi obtida em peixes que consumiram a dieta controle. No entanto, não foi observado diferenças na excreção de nitrogênio em peixes alimentados com a dietas +Ile, +Val e +BCAA (Figura 4).

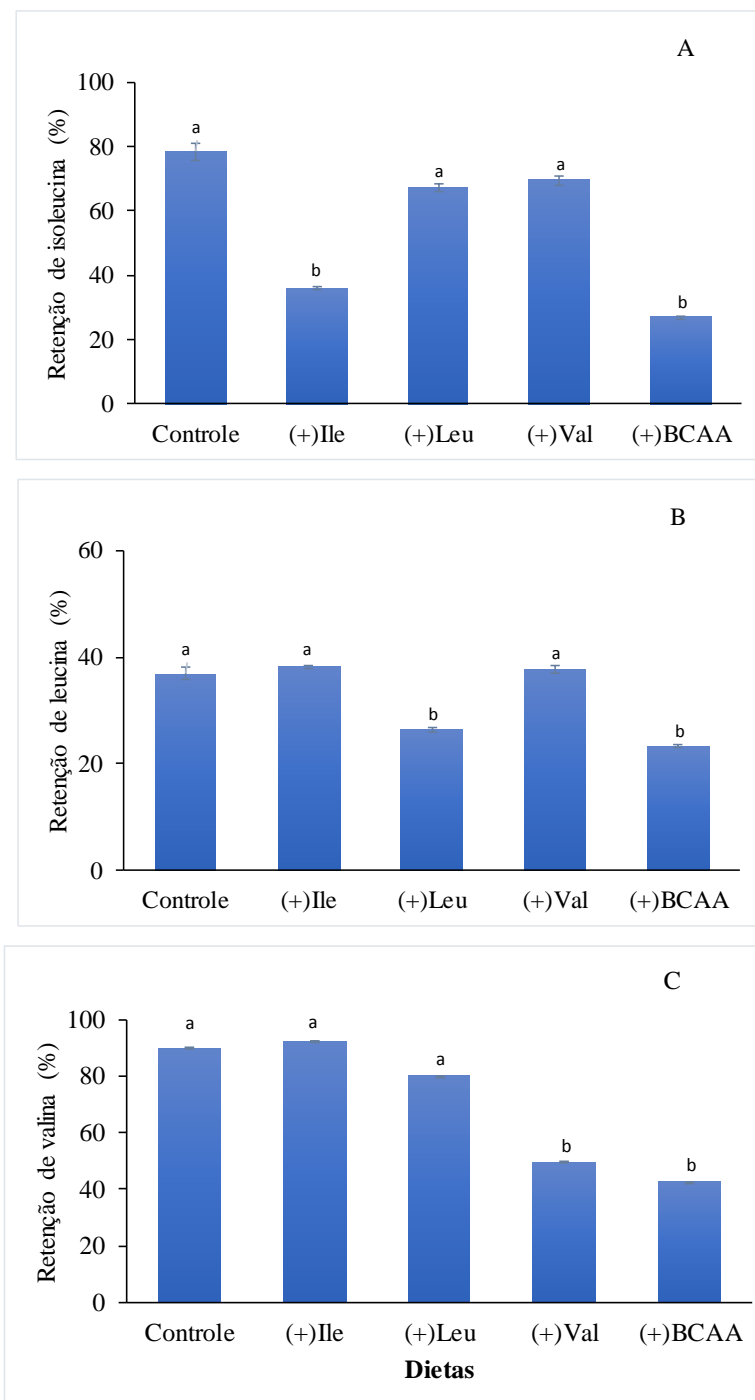
**Tabela 5:** Composição corporal de aminoácidos corporais (g 100 g<sup>-1</sup>) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos<sup>1</sup>.

	Dietas experimentais (g 100 g <sup>-1</sup> )					P		
	Controle	+Ile	+Leu	+Val	+BCAA			
<b>Aminoácidos essenciais</b>								
Arginina	2,44 ± 0,08	2,51 ± 0,04	2,39 ± 0,03	2,31 ± 0,01	2,36 ± 0,07	0,789		
Histidina	0,74 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,80 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,781		
Isoleucina	1,54 ± 0,06	1,67 ± 0,02	1,65 ± 0,03	1,65 ± 0,01	1,55 ± 0,03	0,281		
Leucina	2,56 ± 0,05	2,78 ± 0,02	2,78 ± 0,05	2,73 ± 0,02	2,63 ± 0,03	0,178		
Lisina	2,40 ± 0,06	2,55 ± 0,03	2,54 ± 0,03	2,51 ± 0,04	2,37 ± 0,04	0,459		
Metionina	0,85 ± 0,02	0,82 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,85 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,664		
Fenilalanina	1,52 ± 0,02	1,67 ± 0,03	1,51 ± 0,05	1,48 ± 0,02	1,55 ± 0,05	0,477		
Treonina	1,48 ± 0,03	1,66 ± 0,02	1,65 ± 0,02	1,64 ± 0,02	1,58 ± 0,03	0,058		
Triptofano	0,36 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,35 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,335		
Valina	1,81 ± 0,04	1,89 ± 0,01	1,84 ± 0,03	1,85 ± 0,02	1,76 ± 0,02	0,638		
<b>Aminoácidos não essenciais</b>								
Alanina	2,34 ± 0,05	2,55 ± 0,01	2,47 ± 0,05	2,49 ± 0,03	2,40 ± 0,02	0,282		
Ácido aspártico	2,99 ± 0,05	3,40 ± 0,03	3,43 ± 0,04	3,42 ± 0,04	3,32 ± 0,06	0,226		
Cisteína	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,756		
Ácido glutâmico	4,73 ± 0,09	4,96 ± 0,10	4,94 ± 0,05	4,91 ± 0,06	4,98 ± 0,12	0,689		
Glicina	3,26 ± 0,09	3,40 ± 0,02	3,30 ± 0,07	3,29 ± 0,02	3,34 ± 0,06	0,822		
Serina	1,49 ± 0,05	1,59 ± 0,03	1,59 ± 0,01	1,53 ± 0,02	1,48 ± 0,05	0,768		
Tirosina	1,28 ± 0,03	1,19 ± 0,06	1,14 ± 0,06	1,11 ± 0,06	1,08 ± 0,04	0,788		
<sup>1</sup> Valores	foram	expressos	como	médias	(± EPM)	de quatro	repetições	(n = 4).

**Tabela 6:** Retenção corporal de aminoácidos ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos<sup>1</sup>

Item	Diets experimentais ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ )					P
	Controle	+Ile	+Leu	+Val	+BCAA	
Aminoácidos essenciais						
Arginina	93,47 ± 3,98	94,45 ± 1,99	79,94 ± 0,66	84,18 ± 1,46	73,08 ± 2,50	0,006
Histidina	58,80 ± 2,33	62,60 ± 0,53	57,46 ± 1,84	52,04 ± 1,89	46,45 ± 1,44	0,071
Isoleucina	78,56 ± 2,65 <sup>a</sup>	35,94 ± 0,52 <sup>b</sup>	67,22 ± 1,27 <sup>a</sup>	69,41 ± 1,35 <sup>a</sup>	26,74 ± 0,56 <sup>b</sup>	<0,001
Leucina	36,98 ± 1,24 <sup>a</sup>	38,16 ± 0,17 <sup>a</sup>	26,27 ± 0,39 <sup>b</sup>	37,71 ± 0,64 <sup>a</sup>	23,25 ± 0,34 <sup>b</sup>	<0,001
Lisina	91,33 ± 3,65 <sup>ab</sup>	95,39 ± 0,58 <sup>a</sup>	85,18 ± 0,86 <sup>ab</sup>	91,57 ± 0,60 <sup>a</sup>	73,33 ± 1,50 <sup>b</sup>	0,015
Metionina	80,11 ± 1,90	75,08 ± 2,62	71,95 ± 2,86	69,95 ± 1,74	60,60 ± 0,91	0,105
Fenilalanina	95,20 ± 2,86	103,88 ± 2,16	82,15 ± 3,08	88,70 ± 2,38	79,04 ± 2,87	0,066
Treonina	75,33 ± 1,94 <sup>ab</sup>	84,35 ± 0,99 <sup>a</sup>	74,49 ± 0,54 <sup>ab</sup>	81,17 ± 0,52 <sup>a</sup>	66,31 ± 1,12 <sup>b</sup>	0,002
Triptofano	79,76 ± 1,23 <sup>a</sup>	74,30 ± 1,07 <sup>ab</sup>	68,63 ± 0,89 <sup>ab</sup>	62,64 ± 1,75 <sup>b</sup>	64,80 ± 1,28 <sup>b</sup>	0,004
Valina	89,99 ± 2,97 <sup>a</sup>	92,31 ± 0,90 <sup>a</sup>	80,14 ± 1,34 <sup>a</sup>	49,59 ± 1,32 <sup>b</sup>	42,73 ± 0,54 <sup>b</sup>	<0,001
Aminoácidos não essenciais						
Alanina	78,64 ± 2,66	84,55 ± 0,52	73,06 ± 1,30	80,80 ± 1,72	65,64 ± 0,51	0,014
Ácido aspártico	89,95 ± 2,15 <sup>a</sup>	80,41 ± 0,74 <sup>ab</sup>	75,57 ± 0,75 <sup>bc</sup>	77,94 ± 0,56 <sup>ab</sup>	63,58 ± 1,41 <sup>c</sup>	<0,001
Cisteína	67,96 ± 1,71	56,92 ± 2,31	58,89 ± 3,85	64,61 ± 3,11	56,22 ± 0,60	0,547
Ácido glutâmico	83,69 ± 2,89	86,19 ± 1,97	76,67 ± 0,81	83,27 ± 0,44	72,10 ± 1,83	0,137
Glicina	88,51 ± 3,37	90,69 ± 0,90	78,26 ± 1,33	85,70 ± 1,37	73,75 ± 1,42	0,061
Serina	54,33 ± 2,63	56,93 ± 1,40	50,80 ± 0,24	53,17 ± 0,73	43,47 ± 1,83	0,139
Tirosina	57,16 ± 2,06	50,61 ± 3,30	42,73 ± 2,49	45,85 ± 3,21	37,92 ± 1,49	0,223

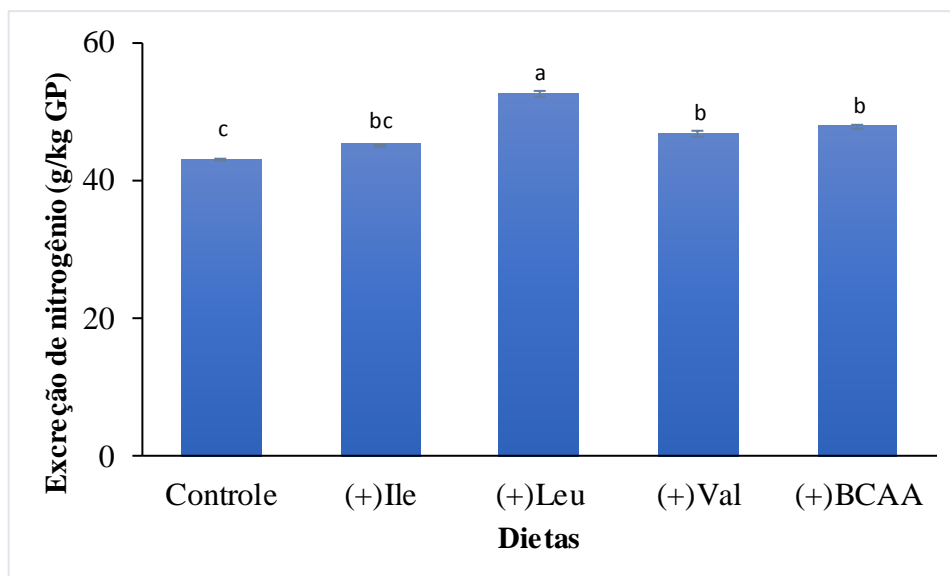
<sup>1</sup>Valores médias sobrescritos na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey's ( $P > 0,05$ ), <sup>1</sup>Valores foram expressos como médias ( $\pm$  EPM) de quatro repetições ( $n = 4$ ).



**Figura 3:** Retenção corporal de isoleucina (A), leucina (B) e valina (C) em alevinos tilápias do Nilo alimentadas com as dietas experimentais.

Controle = dieta atendendo as exigências de aminoácidos sulfurados, (+)Ile, dieta com excesso de leucina, (+)Leu, dieta com excesso de leucina, (+)Val, dieta com excesso de valina e (+)BCAA, dieta com excesso de isoleucina, leucina e valina.

Valores são médias ( $\pm$  EPM) de quatro repetições e valores com letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4** Nitrogênio excretado por quilograma de ganho de peso em alevinos tilápias do Nilo alimentadas com as dietas experimentais.

Controle = dieta atendendo as exigências de aminoácidos sulfurados, (+)Ile, dieta com excesso de leucina, (+)Leu, dieta com excesso de leucina, (+)Val, dieta com excesso de valina e (+)BCAA, dieta com excesso de isoleucina, leucina e valina.

Valores são médias ( $\pm$  EPM) de quatro repetições e valores com letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## Discussão

No presente estudo, peixes alimentados com a dieta suplementada com todos os aminoácidos aromáticos (+BCAA) apresentaram peso final semelhante aos peixes da dieta controle. Resultado semelhante foi observado por Kawanago et al. (2015), que relataram maior peso final de yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, alimentado com dieta suplementada com aminoácidos aromáticos. No entanto, concordando com resultado obtido no presente trabalho, os autores não encontraram antagonismos entre os aminoácidos aromáticos.

O desbalanço dos aminoácidos prejudica o crescimento e a síntese proteica muscular (Wu, 2009). Validando a hipótese, o crescimento reduzido e piora na conversão alimentar ocorrem em animais alimentados com dietas desbalanceadas em aminoácido devido ao gasto extra de energia direcionado para a desaminação e excreção dos aminoácidos (Ahmed e Khan, 2006). Assim, como observado no presente estudo, o maior ganho de peso dos peixes que receberam a dieta com excesso de todos os aminoácidos aromáticos resultou em piora na retenção de proteína, maior deposição de gordura corporal e piora na retenção de alguns aminoácidos essenciais e não essenciais.

Assim, é possível afirmar que os efeitos negativos do excesso de isoleucina, leucina e valina não resultaram em antagonismo entre os aminoácidos, mas pelo excesso destes aminoácidos, uma vez que a suplementação individual acima da exigência de cada aminoácido influenciou negativamente somente a retenção do próprio aminoácido, não resultando em efeito negativo sobre a retenção dos demais aminoácidos aromáticos.

Além disso, no presente estudo, o excesso de leucina foi mais pronunciado sobre a redução no ganho de peso e na retenção de proteína em relação aos peixes que receberam as dietas com excesso de isoleucina e valina. Fato semelhante foi observado em outras pesquisas com carpa da maior Índia, *Cirrhinus mrigala* (Ahmed e Khan, 2006) e linguado japonês, *Paralichthys olivaceus* (Han et al., 2014). Da mesma forma, o excesso de leucina se sobressaiu em relação a isoleucina e valina, causando o desbalanceamento na dieta (Feng et al., 2017; Yamamoto et al., 2004; Yaghoubi et al., 2017), fato que pode ser aliviado pela suplementação dos três BCAA para realizar o potencial da leucina em aumentar o crescimento muscular (Wu, 2013). No entanto, no presente estudo, apesar de ter restaurado o ganho de peso dos peixes, a múltipla suplementação de aminoácidos aromáticos não resultou em melhoria na eficiência de utilização da proteína, indicando que o excesso não contribuiu para a síntese proteica, mas para a produção de energia que foi depositada na forma de gordura corporal.

Os aminoácidos aromáticos são encontrados em elevadas proporções no músculo esquelético de tilápias (Michelato et al., 2016). Assim, atuam tanto como elemento estrutural quanto como depósito de nitrogênio, mantendo sua homeostase (Cole, 2015) e junto com os demais aminoácidos realizam o turnover de proteínas intracelulares que determinam o balanço de proteína nos tecidos (Wu, 2013).

Na presente pesquisa, as dietas com níveis elevados de aminoácidos aromáticos influenciaram negativamente a retenção de proteína, em relação ao observado em peixes alimentados com a dieta controle. Tal fenômeno já foi descrito em peixes, prejudicando a retenção de proteína (Castillo e Gatlin III, 2017) e o crescimento dos peixes (Yamamoto et al., 2004).

Não foi observada diferença para o índice hepatossomático, enquanto a gordura visceral diferiu em alevinos de tilápias do Nilo alimentados com dietas com diferentes perfis de +BCAA. O mesmo resultado foi observado no linguado japonês, *Paralichthys olivaceus* alimentado com diferentes níveis de leucina e valina (Han et al., 2014). Destaca-se que a gordura visceral não foi bom indicador do excesso de aminoácidos, uma vez que foi detectada menor retenção da proteína dietética e maior deposição de



gordura corporal em peixes que receberam a dieta +BCAA, sendo esperada maior deposição de gordura visceral.

As dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos não influenciaram a sobrevivência dos peixes. O mesmo foi encontrado em outros trabalhos com aminoácidos aromáticos, em que a sobrevivência não foi influenciada (Ahmed e Khan, 2006; Castillo e Gatlin III, 2017). Foi observado maior consumo em peixes que receberam a dieta +BCAA. Ao contrário do observado no presente estudo, em caso de excessos de aminoácidos aromáticos, casos de intoxicação, antagonismos e desequilíbrios foram relatados, resultando em menor consumo, comprometendo a taxa de crescimento e debilitando a imunidade dos peixes (Oliva-Teles, 2012; Wu, 2013).

No presente trabalho, com exceção dos lipídios, a composição corporal dos peixes não foi influenciada pelas dietas com diferentes perfis de aminoácidos aromáticos. O mesmo foi observado em yellow tail alimentados com diferentes níveis de aminoácidos aromáticos, que não apresentaram diferença significativa na composição corporal. Foi descrito que o conteúdo de gordura corporal aumentou em peixes que consumiram dietas com excesso de aminoácidos aromáticos (Kawanago et al., 2015), indicando menor utilização dos aminoácidos para a síntese proteica e utilização dos esqueletos de carbono dos mesmos para a síntese de gordura corporal (Wang et al., 2017).

A retenção corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais diferiu entre os peixes que consumiram as dietas testadas no presente estudo. É visto que o excesso de aminoácidos aromáticos influenciou negativamente a retenção de aminoácidos, refletindo na menor retenção de proteína corporal e piora no crescimento (Xiao et al., 2017). A menor retenção de aminoácidos em peixes que receberam a dieta +BCAA indicou que os efeitos negativos não ocorreram pelo antagonismo entre os mesmos, mas pelo excesso de aminoácidos. Tal fato foi evidenciado quando mantendo a relação de aminoácidos na dieta +BCAA, não ocorreu melhoria na retenção da proteína, ou mesmo dos próprios aminoácidos aromáticos. Assim, é importante o balanceamento de aminoácidos para adequada utilização dos mesmos na dieta não somente para melhoria no desempenho produtivo, mas para maximizar a retenção de nitrogênio e reduzir a fração nitrogenada excretada pelos peixes. Com a intensificação na criação de tilápias, torna-se importante dietas que contribuam para uma criação sustentável, particularmente pela menor redução de nitrogênio, um dos compostos mais poluentes em excesso no meio aquático. O excesso de nitrogênio, além da piora na qualidade da

água, pode contribuir para o desenvolvimento excessivo de organismos planctônicos que contribuem para a ocorrência de “off-flavor” no pescado, resultando em prejuízos econômicos. Assim, conclui-se que não ocorre antagonismo entre aminoácidos aromáticos em dietas para alevinos de tilápias do Nilo contendo o dobro das exigências. Além disso, o excesso de leucina mostrou efeito mais negativo sobre a retenção dos aminoácidos em relação ao excesso dos demais aminoácidos aromáticos. A utilização de dietas balanceadas em aminoácidos é importante para reduzir a excreção de nitrogênio e aumentar a sustentabilidade da criação de tilápias.

## Referências

- Ahmed, I., Khan, M, A. 2006. Dietary branched-chain amino acid valine, isoleucine and leucine requirements of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton), British journal of nutrition; 96: 450-460.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International (16th edn), Arlington, Virginia, 1995.
- Castillo, S., Gatlin III, D, M. 2017. Dietary requirements for leucine, isoleucine and valine (branched- chain amino acids) by juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*, Aquaculture Nutrition; 24: 1056-1065.
- Cole, Jeffrey T. Metabolism of BCAAs. 2015. In: Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition, Springer New York, 13-24.
- Choo, P.S., Smith, T.K., Cho, C.Y., Ferguson, H.W. 1991. Dietary excesses of leucine influence growth and body composition of rainbow trout, The Journal of nutrition; 121: 1932-1939.
- El-Sayed, A,-FM. 1998. A substituição total de farinha de peixe com fontes de proteína animal em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds, Aquaculture Research; 29: 275-280.
- Feng, L., Gan, L., Jiang, WD., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Zhou, X.Q. 2017. Gill structural integrity changes in fish deficient or excessive in dietary isoleucine: Towards the modulation of tight junction protein, inflammation, apoptosis and antioxidant defense via NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signaling pathways, Fish & Shellfish Immunology, 63, 127-138.
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Pezzato, A.C., Barros, M.M., Miranda, E.C. 2001. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Revista Brasileira de Zootecnia, 30, 1143-1149.
- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Barros, M.M. 2008a. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, Aquaculture Nutrition, 14, 396-404.

- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Tachibana, L. 2008b. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia, *Journal of the World Aquaculture Society*, 39, 781-789.
- Gupta, M.V., Acosta, B.O. 2004. From drawing board to dining table: the success story of the GIFT project, *NAGA, WorldFish Center Quarterly*; 27: 4-14.
- Han, Y., Han, R., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Gao, J. 2014. Interactive effects of dietary valine and leucine on two sizes of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture*; 432: 130-138.
- Harper, A.E., Benton, D.A., Winje, M.E., Elvehjem, C.A. 1954. Leucine-isoleucine-valine antagonism in the rat, *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 51: 523-524.
- Hughes, S.G., Rumsey, G.L., Nesheim, M.C. 1984. Effects of dietary excesses of branched-chain amino acids on the metabolism and tissue composition of lake trout (*Salvelinus namaycush*), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*; 78: 413-418.
- Jiang, W.D., Deng, Y.P., Liu, Y., Qu, B., Jiang, J., Kuang, S.Y., Zhou, X.Q. 2015. Dietary leucine regulates the intestinal immune status, immune-related signalling molecules and tight junction transcript abundance in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Aquaculture*; 444: 134-142.
- Kawanago, M., Takemura, S., Ishizuka, R., Shioya, I. 2015. Dietary branched-chain amino acid supplementation affects growth and hepatic insulin-like growth factor gene expression in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, *Aquaculture Nutrition*, 21: 63-72.
- Luo, J.B., Feng, L., Jiang, W.D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Zhou, X.Q. 2017. Physical and Flavor Characteristics, Fatty Acid Profile, Antioxidant Status and Nrf2-Dependent Antioxidant Enzyme Gene Expression Changes in Young Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Fillets Fed Dietary Valine, *PLoS one*; 12: 0169270.
- Manifava, M., Smith, M., Rotondo, S., Walker, S., Niewczas, I., Zoncu, R., Ktistakis, N.T. 2016. Dynamics of mTORC1 activation in response to amino acids, *Elife*, 5.
- Michelato, M., de Oliveira Vidal, L.V., Xavier, T.O., de Moura, L.B., de Almeida, F.L.A., Pedrosa, V.B., Furuya, W.M. 2016. Dietary lysine requirement to enhance muscle development and fillet yield of finishing Nile tilapia. *Aquaculture*. 457, 124-130.
- Murakami, T., Matsuo, M., Matsuo, A., Shimomura, Y. 2005. Dissociation of branched-chain amino alpha-keto acid dehydrogenase kinase from branched-chain, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*; 51: 48-50.
- NRC - National Research Council. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington: National academies press. 330p.
- Oliva-Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish, *Journal of Fish Diseases*, 35: 83-108.
- Robinson, E.H., Poe, W.E., Wilson, R.P. 1984. Effects of feeding diets containing an imbalance of branched-chain amino acids on fingerling channel catfish, *Aquaculture*; 37: 51-62.

- Shinnick, F.L., Harper, A.E. 1977. Effects of branched-chain amino acid antagonism in the rat on tissue amino acid and keto acid concentrations, *The Journal of nutrition*; 107: 887-895.
- Smith, T.K., Austic, R.E. 1978. The branched-chain amino acid antagonism in chicks, *The Journal of nutrition*; 108: 1180-1191.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Azizi, S., Perelló, M., Salmerón, C., Riera-Codina, M., Navarro, I. 2017. Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production, *Aquaculture*; 467: 28-40.
- Wang, L., Han, Y., Jiang, Z., Sun, M., Si, B., Chen, F., Bao, N. 2017. Interactive effects of dietary leucine and isoleucine on growth, blood parameters, and amino acid profile of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Fish physiology and biochemistry*; 43: 1265-1278.
- Wiltafsky, M.K., Roth, F.X. 2008. Antagonism between branched-chain amino acids affects Isoleucine requirement of the piglet, *Proceedings of the Society of Nutrition and Physiology*; 17: 144.
- Wu, G. 2013. *Amino acids: biochemistry and nutrition*, CRC Press.
- Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition, *Amino acids*, 37 1-17.
- Xiao, W., Li, D.Y., Zhu, J.L., Zou, Z.Y., Yue, Y.R., Yang, H. 2017. Dietary valine requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 315-323.
- Yaghoubi, M., Torfi Mozanzadeh, M., Marammazi, J.G., Safari, O., Gisbert, E. 2017. Effects of dietary essential amino acid deficiencies on the growth performance and humoral immune response in silvery- black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles, *Aquaculture Research*; 48: 5311-5323.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H. 2004. Antagonistic effects of branched-chain amino acids induced by excess protein-bound leucine in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*; 232: 539-550.
- Zhao, J., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Chen, G., Jiang, W., Zhou, X. 2012. Effects of dietary isoleucine on growth, the digestion and absorption capacity and gene expression in hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var, Jian), *Aquaculture*; 368: 117-128.
- Zhen, H., Nakamura, K., Kitaura, Y., Kadota, Y., Ishikawa, T., Kondo, Y., Shimomura, Y. 2015. Regulation of the plasma amino acid profile by leucine via the system L amino acid transporter, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*; 79: 2057-2062

#### IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formulação de dietas tem papel importante no balanceamento dos nutrientes, necessários para o desenvolvimento da tilápia do Nilo em sistema comercial de criação, Destaque para os aminoácidos, que compõem a proteína de diversos ingredientes alimentares, tanto de origem animal ou vegetal, sendo responsáveis pela síntese proteica e o crescimento dos peixes, A isoleucina se apresenta como um aminoácido potencialmente limitante em alguns ingredientes de origem vegetal, que deve ser suplementado em sua forma cristalina.

No presente trabalho, a isoleucina influenciou o crescimento e a retenção corporal de aminoácidos de tilápias do Nilo. Além disso, influenciou a expressão dos genes MyoD e miogenina, ligados aos processos de hipertrofia e hiperplasia das fibras muscular e do crescimento dos peixes.

A isoleucina influencia o sistema celular dos peixes, por atuarem, no turnover proteico, no músculo esquelético, no mecanismo hormonal e no sistema imune, devendo ser incluída na dieta em toda a fase de desenvolvimento dos peixes.

Não foi observado mecanismo de antagonismo entre os aminoácidos aromáticos, sendo observado somente interrelações entre os mesmos. Além disso, entre os aminoácidos aromáticos, o excesso de leucina se mostrou mais negativo sobre a retenção da proteína.

O balanceamento de aminoácidos aromáticos influencia a utilização da proteína dietética, sendo que o adequado fornecimento é importante para maximizar a retenção e consequentemente reduzir a excreção de nitrogênio para o meio aquático, contribuindo para a criação de tilápia de com melhor resposta econômica e de forma mais sustentável.