

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXIGÊNCIA DE HISTIDINA PARA TILÁPIAS DO NILO COM BASE NO
DESEMPENHO PRODUTIVO, EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR, MORFOMETRIA DAS FIBRAS BRANCAS E
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Autora: Micheli Zaminhan Hassemer
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Coorientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

MARINGÁ
Estado do Paraná
dezembro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXIGÊNCIA DE HISTIDINA PARA TILÁPIAS DO NILO COM BASE NO
DESEMPENHO PRODUTIVO, EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR, MORFOMETRIA DAS FIBRAS BRANCAS E
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Autora: Micheli Zaminhan Hassemer
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Coorientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
dezembro – 2016

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

Zaminhan-Hassemer, Micheli
224e Exigência de histidinas de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular, morfometria das fibras brancas e parâmetros hematológicos e bioquímicos / Micheli Zaminhan-Hassemer. -- Maringá, 2016.

xv, 94 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya.
Coorientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2016.

1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Aminoácidos essenciais. 2. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Expressão gênica. 3. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Miogênese. 4. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Crescimento muscular. 5. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) - Desempenho produtivo. 6. Peixes - Nutrição. I. Furuya, Wilson Massamitu, orient. II. Boscolo, Wilson Rogério, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 21.ed. 639.37

AMMA-003382



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EXIGÊNCIA DE HISTIDINA PARA TILÁPIAS DO NILO
COM BASE NO DESEMPENHO PRODUTIVO,
EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR, MORFOMETRIA
DAS FIBRAS BRANCAS E PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**


Autora: Micheli Zaminhan Hassemer
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 12 de dezembro de 2016.



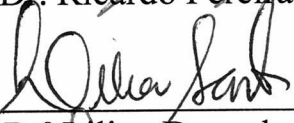
Prof.^a Dr.^a Alice Eiko Murakami



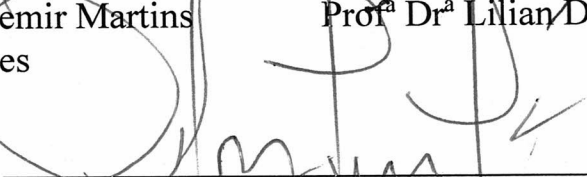
Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro



Prof. Dr. Claudemir Martins
Soares



Prof.^a Dr.^a Lilian Dena dos Santos



Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
(Orientador)

O sonho

*Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por sua vida*

Clarice Lispector

Dedico

Ao meu pai Alderico Zaminhan por me ensinar o caminho da sabedoria.

*A minha mãe Tereza Chinaider Zaminhan. Por sempre confiar em mim e me incentivar.
Admiro cada um de vocês por serem íntegros, responsáveis, amorosos e muito trabalhadores.*

“A beleza dos filhos são seus pais”

Prov. 17:6.

Ao meu irmão Marcelo Zaminhan, por mais longe que a distância possa nos levar
que o amor sempre permaneça.

*Ao meu esposo Djeison Giovan Hassemer, por me incentivar, ajudar, estando sempre ao meu
lado, compartilhando as minhas tristezas e alegrias e sabendo sempre me dizer as palavras que
eu precisava ouvir em alguns momentos da minha vida.*

Te amo!!

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a todos que ajudaram direta ou indiretamente para a realização dessa tese.

A Deus, pelo dom da vida e por ter me conduzido nesta jornada e me dado forças para vencer as dificuldades. Que o vosso nome seja sempre louvado!

Aos meus pais, Aldérico e Tereza por todo amor, carinho, educação, enfim por me tornarem o que sou hoje e por perdoarem a minha ausência em momentos tão importantes de suas vidas.

Ao meu esposo, Djeison Giovan Hassemer, meu confidente, amigo e companheiro, meu porto seguro. Agradeço, por sempre me ouvir e ajudar a encontrar soluções para os problemas encontrados no decorrer dessa caminhada.

Ao meu orientador, Wilson Massamitu Furuya, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela enorme paciência comigo e pelos ensinamentos. Agradeço pela preocupação e compreensão e por me direcionar durante todo esse tempo. Sempre com tantos compromissos e mesmo distante conseguiu me atender em todos os momentos. Muito obrigada professor!

Ao meu coorientador, Wilson Rogério Boscolo pelos ensinamentos, atenção e diplomacia em todos os momentos, contribuindo para realização deste experimento.

À Márcia Luzia Ferrarezi Maluf, por todos os ensinamentos, pela amizade e por sempre confiar em mim.

Às minhas colegas de apartamento em Maringá, Juliana Losch e Taciana Oliveira Bruxel, pela amizade e companheirismo. As colegas queridas, que tive o prazer de conhecer em Maringá, Marília e Joyce.

Ao Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura – GEMaQ, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, pela disponibilidade das estruturas para realização do trabalho, por ter me acolhido por todos esses anos, desde a graduação até o doutorado. Aos professores integrantes do Gemaq: Wilson Rogério Boscolo, Aldi Feiden, Altevir Signor, Fábio Bittencourt, Márcia Luzia Ferrarezi Maluf. Aos colegas que contribuíram para realização dos experimentos: Rômulo, Jackeline, Juliana, Lara, Yuri, Sidnei, Milena, Mariana, Glaucia, Taty, Daniele, Evandro, Grace, Maísa, Matheus, Deyvidi, Jakinha, Jaina, Jhonis, Gustavo, Diego, Joana, Mayara, Andréa e Layane. Meu muito obrigada!

Agradecimento especial aos colegas que auxiliaram na confecção das rações, Evandro, Diego e Jhonis.

Agradecimento especial ao colega Rômulo, por toda ajuda e parceria durante a condução dos experimentos da tese e em outros projetos e pelas discussões científicas geradas no decorrer dos estudos.

Ao colega Nilton, pelas trocas de ideias científicas no decorrer da tese.

Ao profissional Antônio, que sempre me “salvou” nos problemas de “encanamento” das estruturas dos experimentos.

Ao profissional Cristian e equipe que me auxiliaram na parte elétrica da estrutura experimental.

Aos profissionais Arilde e Belmiro por cuidarem com carinho da manutenção da extrusora.

Ao técnico do laboratório de Engenharia de Pesca, Fernando, pelo auxílio dos materiais no decorrer dos experimentos, pelo chimarrão e prosas descontraídas.

À colega Mariana Michelato, pela parceria e orientações no desenvolvimento dos experimentos e por me acolher em sua casa durante as análises.

À minha querida amiga Elenice, por todos os anos de amizade e confidências. Obrigada pela ajuda imensurável na impressão e entrega das cópias. Meus agradecimentos, Elenice e Márcio, por terem me acolhido com tanto carinho durante a qualificação.

À colega Vanessinha pela ajuda com as cópias da defesa e por me acolher em sua casa.

Ao programa de Pós – Graduação em Zootecnia.

Ao assistente do programa, Denilson, por toda atenção demonstrada.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda – Animal Nutrition, pela doação dos aminoácidos e realização das análises. Em especial ao Edgar Ishikawa e a Marianne Kutschenco, pela contribuição nas pesquisas.

Às pisciculturas Dal Bosco e Acta pelo fornecimento dos peixes.

Às minhas tilápias, que cooperaram muito para realização desta pesquisa. Meu respeito aos peixes que foram eutanasiados.

BIOGRAFIA

Micheli Zaminhan Hassemer, filha de Tereza Chinaider Zaminhan e Alderico Zaminhan, nasceu em Santo Antônio do Sudoeste – PR, no dia 03 de agosto de 1986.

Em março de 2006, ingressou no curso de Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* Toledo. Em dezembro de 2010, concluiu a graduação obtendo o título de Engenheira de Pesca, com o trabalho de conclusão: “Efeito da vitamina C sobre os parâmetros hematológicos de kinguio *Carassius auratus*”

Iniciou o Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca em março de 2011 pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Após defender a dissertação intitulada “Desempenho e resposta hematológica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano”, em fevereiro de 2013 recebeu o título de mestra em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Em março de 2013 deu início ao doutorado em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá. Em dezembro de 2016, submeteu-se a banca examinadora para defesa da tese de doutorado e obtenção do título de Doutora em Zootecnia, com área de concentração em Produção Animal pela Universidade Estadual de Maringá – UEM.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE FIGURAS | xii |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| 1.0 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 1.0 REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 1.1 Tilápia do Nilo..... | 2 |
| 1.2 Proteínas e aminoácidos para peixes | 3 |
| 1.3 Absorção e excreção dos aminoácidos em peixes | 5 |
| 1.4 Histidina | 6 |
| 1.5 L - histidina em dietas para peixes | 8 |
| 1.6 Hematologia em peixes teleósteos..... | 10 |
| 1.7 Musculatura estriada esquelética nos peixes | 12 |
| 1.8 Controle molecular da miôgenese em peixes teleósteos | 15 |
| 1.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 17 |
| 2.0 OBJETIVOS..... | 25 |
| 2.1 GERAL..... | 25 |
| 2.2 ESPECÍFICOS | 25 |
| 3.0 CAPÍTULO I..... | 26 |
| Exigência de histidina para alevinos de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e parâmetros hematológicos..... | 26 |
| Introdução..... | 27 |

| | |
|---|----|
| Material e métodos | 29 |
| Resultados..... | 36 |
| Discussão | 48 |
| Referências bibliográficas | 54 |
| 4.0 CAPÍTULO II..... | 60 |
| Exigência de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina, parâmetros hematológicos e crescimento muscular | 60 |
| Introdução..... | 62 |
| Material e métodos | 63 |
| Condições experimentais..... | 63 |
| Resultados..... | 72 |
| Discussão | 83 |
| Referências bibliográficas | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| CAPÍTULO I: Exigência de histidina para alevinos de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e parâmetros hematológicos | |
| Tabela 1. Formulação e composição química das dietas experimentais (g kg ⁻¹ dieta seca)..... | 18 |
| Tabela 2. Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg ⁻¹ da matéria seca) ¹ | 29 |
| Tabela 3. Primers utilizados para amplificação da MyoD, Miogenina, Miostatina e 18S ribossomal DNA (18SrDNA) por PCR em tempo real. | 33 |
| Tabela 4. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina. | 36 |
| Tabela 5. Composição corporal de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina. | 38 |
| Tabela 6. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina. | 43 |
| Tabela 7. Leucócitos totais, trombócitos totais, percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas com níveis crescentes de histidina | 45 |
| CAPÍTULO II: Exigência de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina, parâmetros hematológicos e crescimento muscular | |
| Tabela 1. Formulação e composição química das dietas experimentais (g kg ⁻¹ dieta seca)..... | 63 |
| Tabela 2. Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg ⁻¹ da matéria seca) ¹ | 64 |
| Tabela 3. Primers utilizados para amplificação da MyoD, Miogenina, Miostatina e 18S ribossomal DNA (18SrDNA) por PCR em tempo real. | 68 |

| | |
|--|----|
| Tabela 4. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina. | 71 |
| Tabela 5. Composição corporal de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina..... | 73 |
| Tabela 6. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina. | 78 |
| Tabela 7. Leucócitos totais, trombócitos totais, percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo histidina | 79 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| REVISÃO DE LITERATURA | |
| Figura 1. Fórmula estrutural da histidina..... | 6 |
| Figura 2. Biotransformação da L-histidina em histamina.. | 7 |
| Figura 3. Estrutura dos miômeros do músculo lateral. No lado direito são mostrados os miômeros isolados..... | 12 |
| Figura 4. Corte transversal da musculatura estriada esquelética da tilápia do Nilo | 14 |
| Figura 5. Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular em peixes..... | 15 |
| CAPÍTULO I: Exigência de histidina para alevinos de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e parâmetros hematológicos | |
| Figura 1. Ganho em peso de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina..... | 39 |
| Figura 2. Frequência de distribuição das fibras musculares brancas de tilápias do Nilo. | 41 |
| Figura 3. Quantificação da MyoD, miogenina e miostatina realizado no tecido muscular esquelético branco da tilápia do Nilo. | 44 |
| CAPÍTULO II: Exigência de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina, parâmetros hematológicos e crescimento muscular | |
| Figura 1. Ganho em peso de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina digestível..... | 75 |
| Figura 2. Frequência da distribuição das fibras musculares brancas de juvenis de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>)..... | 77 |
| Figura 3. Quantificação da MyoD, miogenina e miostatina realizada no tecido muscular esquelético branco da tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) detectados por RT-qPCR..... | 79 |

RESUMO

Dois experimentos foram conduzidos para determinar a exigência dietética de histidina para alevinos e juvenis de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, desenvolvimento muscular, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (Myod, miogenina e miostatina) e respostas hematológicas e bioquímicas. No primeiro experimento, foram utilizados 540 alevinos de tilápia do Nilo com peso médio inicial de 4,84 (\pm 0,04 g), distribuídos em 18 caixas de fibra de vidro com capacidade de 250 litros, em um delineamento inteiramente casualizado composto por seis tratamentos, três repetições e trinta peixes por unidade experimental, por um período de 110 dias. Seis dietas isoproteicas (265,7 g kg⁻¹ de proteína bruta) e isoenergéticas (3821,41 kcal kg⁻¹ de energia bruta) contendo níveis crescentes de inclusão de histidina (4,2; 5,4; 7,1; 8,9; 9,8 e 11,5 g kg⁻¹ da matéria seca) foram elaboradas. Os melhores resultados de ganho em peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foram observados nos peixes que receberam a dieta com 8,9 g kg⁻¹ de histidina. Foi observado processo de crescimento hipertrófico nos peixes alimentados com a dieta contendo 8,9 g kg⁻¹ de histidina em comparação com os peixes que receberam a dieta contendo 5,4 g kg⁻¹ de histidina. A suplementação de 9,8 g kg⁻¹ de histidina na dieta proporcionou maior expressão dos níveis de mRNA da MyoD. Contudo, a expressão dos níveis de mRNA da miogenina foi mais elevada nos peixes que receberam as dietas contendo 9,8 e 11,5 g kg⁻¹ de histidina. A expressão da miostatina não foi influenciada pelos níveis de histidina da dieta. Com base na regressão polinomial de segunda ordem a exigência de histidina para o máximo ganho de peso de alevinos de tilápia foi estimada em 8,2 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 3,1% da proteína bruta da dieta. No segundo experimento, foram utilizados 288 juvenis de tilápia do Nilo com peso médio inicial de 64,15 (\pm 0,49 g), distribuídos em 24 caixas de fibra de vidro com capacidade de 500 litros, em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, por um período de 65 dias. Foram elaboradas seis dietas isoproteicas (267,3 g kg⁻¹ de proteína bruta) e

isoenergéticas (4048 kcal kg⁻¹ energia bruta) contendo níveis crescente de inclusão de histidina digestível (3,50; 5,50; 7,50; 9,50; 11,50 e 13,50 g kg⁻¹ da matéria seca). Os peixes foram alimentados com dietas extrusadas, até a saciedade aparente. Os melhores resultados (P<0,05) de ganho em peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foram observados em peixes que receberam as dietas com 9,50 a 11,50 g kg⁻¹ de histidina digestível em comparação com os peixes que receberam dieta contendo 3,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. Com base no modelo de regressão polinomial de segunda ordem a exigência de histidina digestível para o máximo ganho em peso de juvenis de tilápia do Nilo foi estimada em 10,5 g kg⁻¹ de histidina digestível. A composição corporal e os parâmetros hematológicos e bioquímicos não foram influenciados (P>0,05) pelos diferentes níveis de histidina digestível na dieta. O crescimento muscular ocorreu por hiperplasia e hipertrofia entre todos os tratamentos. Peixes que receberam dietas com 9,50 a 13,50 g kg⁻¹ de histidina digestível apresentaram maior expressão dos níveis de mRNA para o gene Myod em comparação aos peixes que receberam a dieta contendo 3,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. A maior expressão dos níveis de mRNA para o gene miogenina foi observada nos peixes alimentados com a dieta contendo 9,50 a 11,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. No entanto, a maior expressão dos níveis de mRNA do gene miostatina foi observada nos peixes que receberam dietas contendo 3,5 a 9,5 g kg⁻¹ de histidina digestível. Conclui-se que a exigência de histidina digestível para juvenis de tilápia do Nilo para o máximo ganho em peso foi estimada em 10,5 g kg⁻¹ correspondente a 3,7% da proteína bruta da dieta.

Palavras-chaves: aminoácidos essenciais, expressão gênica, miogênese

ABSTRACT

Two studies were carried out to determine the dietary histidine requirement for Nile tilapia fingerling and juveniles based on growth performance, muscle fibers morphometry, expression of muscle growth-related genes (MyoD, myogenin and myostatin), and hematological and biochemical parameters. In the first experiment, 540 Nile tilapia fingerlings with initial average weight of 4.84 (\pm 0.04 g) were distributed in 18 fiberglass boxes with 250 liter capacity in a completely randomized design composed of six treatments, three replicates and thirty fish per experimental unit, for a period of 110 days. Six isoproteic (265,7g kg⁻¹ crude protein) and isoenergetic diets (3821.41 kcal kg⁻¹ gross energy) containing increasing levels of histidine inclusion (4.2; 5.4; 7.1; 8.9; 9.8 and 11.5 g kg⁻¹ of dry matter) were prepared. The best results of weight gain, feed conversion and protein efficiency ratio were observed in fish fed diet containing 8.9 g kg⁻¹ of histidine. Hypertrophic growth process was observed in fish fed the diet containing 8.9 g kg⁻¹ of histidine when compared to the fish fed diets containing 5.4 g kg⁻¹ of histidine. Supplementation of 9.8 g kg⁻¹ of histidine in the diet provided higher expression of the MyoD mRNA levels. However, the expression of myogenin mRNA levels was higher in the fish fed diets containing 9.8 kg and 11.5 g kg⁻¹ of histidine. The myostatin expression was not affected by histidine levels in the diet. Based on the polynomial regression of the second order, the histidine dietary requirement for maximum weight gain of tilapia fingerlings was estimated at 8.2 g kg⁻¹, corresponding to 3.1% of the diet crude protein. In the second study, 288 Nile tilapia juveniles with initial average weight of 64.15 (\pm 0.49 g) were used, distributed in 24 fiberglass boxes with 500 liters capacity in a completely randomized design with six treatments and four replicates, for a period of 65 days. Six isoproteic (267.3 g kg⁻¹ of crude protein) and isocaloric diets (4048 kcal kg⁻¹ of gross energy) were prepared containing increasing levels of digestible histidine inclusion (3.50; 5.50; 7.50; 9.50; 11.50 and 13.50 g kg⁻¹ of dry matter). The fish were fed with extruded diets, manually and at ease. The best results (P <0.05) of weight gain, feed conversion and protein

efficiency ratio were observed in the fish fed diets containing 9.50 to 11.50 g kg⁻¹ of digestible histidine, compared to fish fed the diet containing 3.50 g kg⁻¹ of digestible histidine. Based on the polynomial regression of the second order model, the histidine digestible requirement was estimated at 10.5 g kg⁻¹, in which no increase of weight gain was observed from that histidine inclusion level. Body composition and hematological, biochemical parameters were not affected ($P > 0.05$) by the different levels of digestible histidine in the diet. Muscle growth occurred by hyperplasia and hypertrophy among all treatments. Fish fed diets containing 9.50 to 13.50 g kg⁻¹ of digestible histidine presented higher expression of mRNA levels for Myod gene compared to fish fed diet containing 3.50 g kg⁻¹ of digestible histidine. The increased expression of mRNA levels for myogenin gene was observed in the fish fed the diet containing 9.50 to 11.50 g kg⁻¹ of digestible histidine. However, the highest expression of the myostatin gene mRNA levels was observed in the fish fed diets containing 3.5 to 9.5 g kg⁻¹ of digestible histidine. The conclusion is that the requirement of digestible histidine for a maximum weight gain of Nile tilapia juveniles was estimated at 10.5 g kg⁻¹, corresponding to 3.7% of the protein.

Keywords: essential amino acids, gene expression, myogeny

I. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é a atividade agropecuária em maior expansão na produção de alimentos de origem animal para o consumo humano, sendo uma importante alternativa para uma população cada vez mais numerosa, servindo como fonte alimentar de alto valor proteico. Dentre as atividades desenvolvidas pela aquicultura, destaca-se a piscicultura, que engloba a criação de várias espécies de peixes com alto potencial comercial, que estão contribuindo cada vez mais para o desenvolvimento e crescimento dessa atividade.

Dentre as espécies de peixes mais produzidas, destaca-se a tilápia do Nilo, que lidera a produção aquícola no Brasil com uma produção de 198,49 mil toneladas no ano de 2014, equivalente a 41,9% do total produzido na piscicultura. A espécie registrou um aumento de 17,3% em relação à produção alcançada em 2013 (IBGE, 2016). Características favoráveis como rusticidade, rápido crescimento, facilidade reprodutiva e aceitação da ração, desde o período pós-larval até a fase de terminação, foram fatores importantes para expansão na criação de tilápias em nosso país.

Diversos estudos estão sendo desenvolvidos no campo da nutrição, pois a alimentação representa grande parte dos custos da produção de peixes. Dentre os nutrientes que compõem as dietas dos peixes, a proteína é o principal componente e o mais oneroso nas formulações das rações. A proteína pode ser definida devido à sua sequência de aminoácidos, que é única, e pela forma como são decodificadas geneticamente no organismo animal; dessa forma, apresentam inúmeras estruturas e participam de todos os processos metabólicos vitais (NRC, 2011). Os peixes não possuem exigência dietética específica para proteína, mais sim de um balanço de aminoácidos adequado (Bicudo e Cyrino, 2009). Assim, a formulação de dietas levando-se em consideração as exigências nutricionais de aminoácidos tem sido foco de pesquisa na nutrição de peixes.

A histidina é um aminoácido considerado essencial, básico, que contém um grupo funcional carregado positivamente, denominado de anel imidazol. Esse anel desempenha um importante papel, pois faz ligações com as metaloproteínas e também atua como um local catalítico para determinadas enzimas, auxiliando as funções catalíticas da quimiotripsina e das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e proteínas. Além disso, está presente de forma abundante na hemoglobina e, ainda, é uma importante fonte de átomos de carbono para síntese de purinas (NRC, 2011).

O crescimento muscular nos peixes ocorre por meio de dois processos distintos, a hipertrofia e hiperplasia, que podem variar de acordo com a espécie, fase de crescimento estudadas (Johnston, 1993) e fatores nutricionais. Esses processos são controlados por inúmeros genes, dentre os quais se destaca a família dos fatores de regulação miogênica (MRFs): MyoD, Myf5, miogenina e MRF4. A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos na fase de proliferação dos mioblastos, enquanto os fatores secundários, miogenina e MRF4, são expressos em mioblastos nas fases de fusão e diferenciação em fibras musculares (Watabe, 1999). Enquanto a miostatina é uma proteína que atua no controle e também na proliferação e diferenciação dos mioblastos, desempenha um papel negativo durante a regulação do crescimento muscular, atuando na atenuação do processo hiperplásico e hipertrófico (McPherron e Lee, 1997).

Embora muitos estudos na área de nutrição para a tilápia do Nilo tenham sido desenvolvidos, suas exigências nutricionais não foram totalmente estabelecidas. Estudos avaliando a exigência de histidina nas fases de alevinos e juvenis e seus efeitos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no crescimento muscular ainda não foram relatados na literatura. Assim, o estudo é de extrema relevância, visto que a tilápia do Nilo é a principal espécie produzida comercialmente no Brasil, e determinar as suas exigências dietéticas em aminoácidos aliado ao entendimento do comportamento dos mecanismos moleculares sobre o crescimento muscular é fundamental na contribuição para maximização da produção com consequente redução dos custos com alimentação na piscicultura.

1.0 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe teleósteo pertencente à família *Cichlidae*, sendo originária do continente africano, mais precisamente da Bacia do Rio Nilo. Há registros de que as tilápias eram cultivadas pelos egípcios em tanques ornamentais, para consumo em ocasiões especiais, há mais de dois mil anos antes de Cristo (Nogueira, 2007). Cerca de 22 espécies de tilápias são cultivadas no mundo, contudo a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, a tilápia mossâmbica *O. mossambicus*, a tilápia azul *O. aureus*, *O. macrochir*, *O. hornorum*, *O. galilaeus*, *Tilapia zillii* e a *T. rendalli* são as espécies mais criadas comercialmente (El-Sayed, 1999).

No Brasil, a tilápia do Nilo foi introduzida em 1971, na região do nordeste, por meio do programa brasileiro de produção de juvenis realizado pelo Departamento Nacional de Obras contra a Seca – DNOCS, com o objetivo de repovoar os reservatórios públicos daquela região. Posteriormente, logo se espalhou pelo país, sendo que o cultivo dessa espécie abrange desde o rio Amazonas até o Rio Grande do Sul (Castagnoli, 1992).

A tilápia do Nilo é um dos peixes que apresenta maior potencial para piscicultura, devido ao seu rápido crescimento, rusticidade, ausência de espinhas intramusculares, hábito alimentar onívoro e facilidade para a aceitação de rações (Hayashi, 1995). Além disso, é uma das espécies que apresenta maior resitência a doenças, oscilações de temperatura, a baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de amônia na água de cultivo. Outra característica importante é que esse peixe apresenta um ciclo relativamente rápido em relação às outras espécies de peixe, além de se adaptar facilmente às inúmeras condições de criação, desde tanques-rede, escavados até “raceways”, incluindo as diferentes regiões do Brasil (Turra et al., 2010).

A expansão da tilapicultura em todo o território brasileiro deve-se em parte ao estabelecimento de pacotes tecnológicos decorrentes de pesquisas relacionadas com essa espécie. Porém, mais estudos devem ser realizados em diversas áreas, desde a nutrição até a genética, com intuito de maximizar ainda mais a criação de tilápias de uma forma rentável e aliada à sustentabilidade.

1.2 Proteínas e aminoácidos para peixes

As proteínas incluem os compostos orgânicos mais comuns no organismo. Depois da água, são as moléculas mais abundantes nos seres vivos, apresentando maior variedade molecular, sendo encontradas em todas as estruturas celulares (Nelson e Cox, 2008). As proteínas desempenham papel fundamental nas atividades orgânicas, atuam como reguladoras do metabolismo na forma de enzimas e hormônios; além disso, são elementos essenciais para todos os tipos celulares corporais, desde órgãos, ossos, músculos até tendões e ligamentos (NRC, 2011). No organismo dos peixes, as proteínas são classificadas de acordo com a sua solubilidade ou função. Assim, as proteínas fibrosas são aquelas altamente indigestíveis, que incluem gelatina, queratina e colágeno. Já as proteínas globulares são aquelas solúveis em água ou soluções salinas, as quais incluem proteínas hormonais, enzimas e proteínas do sangue (Lovell, 1998).

As proteínas são constituídas por carbono (50,0 – 55,0%), hidrogênio (6,5 - 7,5%), nitrogênio (15,5 - 18,0%), oxigênio (21,5 - 23,5%) e enxofre (0,5 - 2,0%). Ainda, são formadas estruturalmente por aminoácidos e esses, por sua vez, são compostos por um átomo central (carbono alfa), ao qual um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino (-NH₂) e um átomo de hidrogênio estão covalentemente ligados. O átomo de carbono alfa está ligado a um grupo químico específico, denominado R ou radical, e é esse grupo que difere cada aminoácido (Lovell, 1998).

Por muitos anos, as dietas para peixes foram formuladas com base na exigência em proteína bruta para os animais. Com o passar dos anos, estudos permitiram concluir que a proteína bruta não poderia atender as exigências nutricionais para os peixes, devido à possibilidade de ocorrer a deficiência de alguns dos aminoácidos. Nesse sentido, os pesquisadores na área de nutrição concluíram que era necessário levar em consideração nas formulações as exigências específicas para cada aminoácido considerado essencial para os peixes, com o objetivo de suprir as possíveis deficiências. Assim, muitas pesquisas foram e estão sendo desenvolvidas para determinar as exigências em aminoácidos para as espécies de peixes que apresentam potencial para piscicultura (Portz e Furuya, 2012).

Os aminoácidos são classificados nutricionalmente em essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais são aqueles que o organismo não sintetiza, ou não consegue produzir em proporções suficientes para o crescimento do animal ou para desenvolver as suas funções metabólicas; devido a isso, devem ser adicionados na dieta. Dentre os aminoácidos essenciais estão a arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Já os aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados de forma eficaz pelo organismo, não sendo necessário suplementar na dieta; incluem a alanina, asparagina, aspartato, cisteína, glicina, glutamina, glutamato, prolina, serina e tirosina (NRC, 2011).

Além de levar em consideração as exigências mínimas de cada aminoácido, deve-se certificar que a dieta assegure uma relação adequada entre os aminoácidos. Dietas com desequilíbrio entre os aminoácidos podem interferir no consumo da ração e, como consequência, pode haver redução da ingestão na quantidade do aminoácido limitante, resultando na diminuição do crescimento do animal (D'Mello, 2003). Além disso, esse desequilíbrio pode acarretar no aumento no custo da produção e elevar a excreção do nitrogênio para o meio aquático, causando problemas como a eutrofização (Furuya et al., 2001).

Diante disso, mais estudos são necessários com intuito de determinar a exigência de aminoácidos para espécies de peixes que apresentam potencial para aquicultura. A tilápia do Nilo, que ocupa o primeiro lugar na produção nacional aquícola no Brasil, é um dos peixes mais utilizados em estudos relativos à nutrição. No entanto, ainda não foram determinadas as exigências de todos os aminoácidos essenciais para essa espécie, em suas diferentes fases de criação.

1.3 Absorção e excreção dos aminoácidos em peixes

Nos peixes, os processos digestivos iniciam na boca, seguindo para a cavidade faríngea, local onde ocorre a redução de forma mecânica do tamanho das partículas alimentares e posteriormente essas partículas são dirigidas para a região do esôfago, que tem como função a condução dos alimentos (Horn, 1998). Os peixes que apresentam estômago funcional realizam a secreção de dois componentes: o ácido clorídrico e o pepsinogênio. O ácido clorídrico atua na digestão inicial pela desnaturação da proteína e também para conversão do pepsinogênio em enzima proteolítica ativa (Nelson e Cox, 2008).

No intestino é realizada a maior parte da digestão dos peixes, sendo que no intestino médio ocorre a absorção dos nutrientes. Assim, no intestino dos peixes, a absorção dos aminoácidos livres é realizada na membrana apical do enterócito, por meio de transportadores específicos dependentes ou não de Na^+ e ainda por difusão. Durante o processo de absorção do aminoácido e do sódio, não ocorre gasto de energia de forma direta, porém, é dependente de um gradiente formado por um sistema de transporte ativo, denominada de bomba Na^+/K^+ . Essa bomba cria um gradiente de sódio que facilita a sua entrada no enterócito. Assim, o Na^+ tende a entrar e, como o transportador só funciona se houver um aminoácido conectado, acaba por carregar ambos para dentro da célula, levando assim a uma absorção de Na^+ pela célula. O aminoácido passa por difusão do interior do enterócito para os capilares sanguíneos existentes nas dobras intestinais. Quando ocorre a absorção de dois aminoácidos pelo mesmo transportador, a presença de grandes quantidades de aminoácidos pode agir de forma inibitória para absorção de outro (Rotta, 2003).

Nos peixes, a maior parte da produção da amônia é realizada no fígado, sendo cerca de 50 a 70%. Porém, em menores quantidades, é produzida no músculo, rins e intestino (Smuntá et al., 2002). Após a transaminação e posteriormente desaminação, os aminoácidos que estão em excesso são convertidos para glutamato, esse por sua vez é então desaminado, resultando

em alfa-cetoglutarato e amônia, a qual é liberada na circulação sanguínea. Cerca de 80% do nitrogênio metabolizado é excretado por meio das lamelas branquiais.

A amônia ocorre em duas formas nas soluções aquosas, ou como um gás NH_3 (não ionizada) ou na forma de íon amônio NH_4^+ , a soma dessas duas formas é chamada de amônia total. A presença de uma ou de outra forma está diretamente relacionada com o pH e a temperatura. A amônia é a forma mais tóxica, pois é facilmente difusível pelas membranas celulares, necessitando apenas de diferenças de gradientes para ser transportada. A ureia e a creatinina são produzidas em menores quantidades, e podem ser excretadas pela pele, urina e brânquias (Tomasso, 1994).

1.4 Histidina

A histidina é um aminoácido básico considerado essencial, que contém um grupo funcional carregado positivamente, denominado de anel imidazol (Figura 1). Pode atuar tanto como um ácido quanto uma base, podendo aceitar e doar prótons sob algumas condições. O anel imidazol desempenha um importante papel, pois faz ligações com as metaloproteínas e também atua como um local catalítico para determinadas enzimas, auxiliando as funções catalíticas da quimiotripsina, por exemplo, e das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e proteínas. A desaminação da histidina é catalisada pela enzima histidase, resultando na formação do ácido urocânico. Ela é convertida em ácido 4-imidazolona-5-propiónico sob a ação catalítica da enzima urocanase, com a subsequente formação de ácido glutâmico através do ácido N-formímico-glutâmico. A histidina está presente de forma abundante na hemoglobina, e ainda, é uma importante fonte de átomos de carbono para síntese de purinas (NRC, 2011).

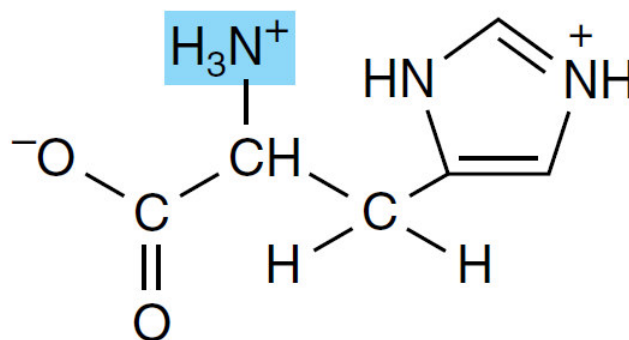


Figura 1. Fórmula estrutural da histidina.
Fonte: Rodwell (2003).

O plasma sanguíneo apresenta um nível elevado de uma glicoproteína (HRG) rica em histidina, que apresenta uma estrutura de múltiplos domínios, que regula uma série de processos biológicos, os quais incluem adesão e migração celular, depuração de complexos imunes e fagocitose de células apoptóticas (Jones et al., 2005).

A histidina é precursora da histamina, a partir da descarboxilação da L-histidina que é metabolizada pela ação da enzima L-histidina descarboxilase, sendo que sua síntese pode ser inibida pela enzima α -fluormetilhistidina. A histamina apresenta a fórmula química: $C_5H_9N_3$ e a fórmula estrutural contém um núcleo de imidazol unido a uma cadeia lateral de dois carbonos ligados a uma amina terminal, sendo que o nitrogênio do anel imidazol (NH) apresenta caráter ácido (Figura 2). O principal local de armazenamento da histamina nos tecidos é nos mastócitos, sendo que no sangue é estocada em uma das células de defesa leucocitária, o basófilo. Recentemente, estudos demonstraram que a histamina pode ser sintetizada em células progenitoras hematopoiéticas, macrófagos, plaquetas, células dendríticas e ainda nos linfócitos T (Haas et al., 2008; Deml et al., 2009; Dy e Shneider, 2004).

A histamina atua como um neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC), estando envolvida na modulação de diferentes funções fisiológicas (Onodera et al., 1994) como ritmos circadianos incluindo o sono, a atividade motora, os comportamentos agressivos, alimentar, as funções neuroendócrinas e vestibulares. Além disso, pode atuar no controle homeostático do metabolismo energético e no sistema imunológico (Sakata et al., 1997).

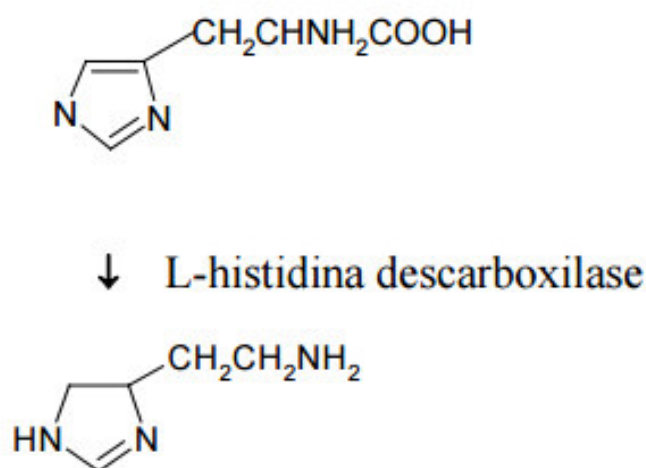


Figura 2. Biotransformação da L-histidina em histamina. Fonte: Vieira (2005).

O tecido animal contém alguns diferentes dipeptídeos relacionados à L – histidina. Destes dipeptídeos, a carnosina, anserina e balenina podem ocorrer no músculo esquelético dos vertebrados, em grandes quantidades, dependendo da espécie. Em peixes com musculaturas vermelhas, a concentração de peptídeos relacionados à histidina geralmente é baixa, quando comparada aos peixes que apresentam musculatura branca, sendo que essa distribuição de peptídeos está relacionada como a capacidade de natação das espécies (Abe, 1995).

Algumas enfermidades são observadas em humanos, decorrentes das alterações no metabolismo da histidina, como por exemplo a histidinemia, que é uma doença causada pela deficiência da atividade da enzima histidase (enzima que converte a histidina em ácido urocânico e amônia), presente na pele e fígado. Essa deficiência causa a elevação nas concentrações de histidina no sangue, até quinze vezes acima do valor normal, elevação da urina e fluído cérebro-espinhal, redução do ácido urocânico no sangue e na pele e aumento da excreção urinária de metabólitos da histidina (Wu, 2013).

1.5 L - histidina em dietas para peixes

Assim como os outros animais, os peixes não apresentam uma exigência em proteína, mas sim de uma dieta contendo uma mistura balanceada de aminoácidos essenciais e não essenciais. Deste modo, a determinação das exigências em aminoácidos é fundamental para maximizar a qualidade e a eficiência das dietas. Nesse sentido, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas por meio da suplementação de aminoácidos industriais nas dietas. Contudo, até o momento, o único estudo avaliando a exigência de histidina para a tilápia do Nilo foi conduzido por Santiago e Lovell (1988). Esses autores utilizaram uma ração purificada para larvas de tilápia do Nilo e observaram um melhor crescimento nos peixes que receberam a dieta contendo $4,8 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina, correspondente a 1,72% de proteína da dieta.

Dentre os estudos para outras espécies de peixes, Gao et al. (2015), conduzindo estudos com juvenis de carpa capim *Ctenopharyngodon idella*, demonstraram que os peixes alimentados com dietas deficientes em histidina apresentaram maior fragilidade osmótica dos eritrócitos e menor atividade das enzimas antioxidantes e por meio da regressão polinomial de segundo grau, estimaram a exigência de $12,1 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina, correspondente a 3,2% de proteína dietética, para um melhor crescimento e uma maior atividade enzimática.

Avaliando a suplementação de histidina em dietas para o bagre *Heteropneustes fossilis*, Khan e Abidi (2014) observaram que a exigência de histidina para adequada taxa de

hemoglobina e percentual de hematócrito foi 4% maior do que a estimada para o máximo ganho em peso. Esses autores estimaram níveis entre 15,1 a 15,6 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 3,51 a 3,63% da proteína da dieta, para o melhor desempenho e eritropoiese dos animais, respectivamente. Trabalhando com alevinos de *Labeo rohita* Abidi e Khan (2004) relataram exigência 8,2 a 9,0 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 2,05 a 2,25% da proteína da dieta, para melhor crescimento e conversão alimentar. Para o catfish (*Ictalurus punctatus*) Wilson et al. (1980) observaram melhor desempenho produtivo para os peixes que consumiram a dieta com 4,0 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 1,77% da proteína da dieta.

Farhat e Khan (2013) relataram que a suplementação de histidina em dietas para alevinos de stinging catfish *Heteropneustes fossilis* melhorou a conversão alimentar, a retenção de proteína e o crescimento dos animais. Além disso, as respostas hematológicas como taxa de hemoglobina, contagem total de eritrócitos e percentual de hematócrito melhoraram em peixes que receberam a dieta suplementada com histidina. Com base na análise de regressão de segunda ordem, foi estimada exigência de 9,4 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 2,48% da proteína da dieta.

Zehra e Khan (2014) observaram que alevinos da carpa maior da Índia *Catla catla* apresentaram melhor desempenho produtivo nos parâmetros hematológicos e na taxa de RNA/DNA, indicando melhor síntese de proteína corporal em peixes que receberam 6,3 a 6,8 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 1,91 a 2,06 % da proteína da dieta. Foi relatado por Zhao et al. (2012), para juvenis de carpa Jian, que a melhor deposição corporal de proteína, melhor desempenho produtivo e maior atividade enzimática intestinal foram observadas nos peixes que receberam dieta com 7,8 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 2,38% da proteína da dieta.

Uma série de estudos têm demonstrado que a histidina pode atuar como um fator preventivo no desenvolvimento de catarata em juvenis de salmão do Atlântico. A catarata é uma patologia nos olhos que consiste na opacidade parcial ou total do cristalino ou de sua cápsula, podendo acometer um ou ambos os olhos e ser reversível ou não, dependendo da causa e da longevidade (Wall e Bjerk, 1999; Breck e Sveier, 2001). Essa enfermidade tem sido descrita há mais de duas décadas e têm causado perdas significativas na produção do salmão do Atlântico (Midtlyng et al., 2000). No entanto, não há registros de ocorrência de catarata relacionada à deficiência de histidina em tilápias.

Waagbø et al. (2010), estudando o salmão do Atlântico adulto, observaram maior risco de desenvolvimento de catarata no período de transição da água doce para água do mar. Segundo esses autores, essa patologia pode ser prevenida e tratada com a suplementação de histidina. Breck et al. (2005) e Tröbe et al. (2009) trabalharam com o salmão do Atlântico e

observaram melhor desempenho e redução na ocorrência de catarata em peixes alimentados com dietas suplementadas com histidina. Esses autores também observaram uma interação significativa entre o genótipo, salinidade e temperatura da água sobre o desenvolvimento da catarata no salmão do Atlântico.

1.6 Hematologia em peixes teleósteos

O sangue é um tecido de matriz fluida, composto por plasma e células. Desempenha inúmeras funções no organismo, como o transporte de gás carbônico, oxigênio, nutrientes e produtos em degradação, além disso, flui através de tecidos sensoriais especializados, capazes de reagir seletivamente a fatores, tais como pressão osmótica, pH, temperatura e níveis de alguns hormônios, atuando também no sistema imunológico do organismo (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A hematologia é uma ferramenta que permite a avaliação das condições de higiene dos animais, permitindo aos pesquisadores e também piscicultores identificar as respostas dos peixes, perante os desafios durante a criação (Ranzani-Paiva et al., 2013). O hemograma é um dos exames de sangue mais utilizados, devido à sua praticidade, e ao baixo custo na parte clínica. Pode ser dividido em três partes: Eritrograma, leucograma e trombograma. O eritrograma é composto pela contagem total de eritrócitos, percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina; ainda é composto pelos índices hematimétricos, o VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média).

O leucograma estuda a série branca, ou seja, os glóbulos brancos, por meio de técnicas de identificação, quantificação e avaliação morfológica dos leucócitos. As células que compõem o leucograma dos peixes incluem os linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e a célula granulocítica especial (PAS). Os leucócitos são responsáveis pela defesa do organismo, utilizam a corrente sanguínea para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou injúrias teciduais (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Já o trombograma estuda os trombócitos, que são células similares às plaquetas dos mamíferos. Realizam a coagulação sanguínea e, ainda, possuem função de defesa do organismo por meio da atividade fagocítica (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

O estudo dos parâmetros bioquímicos em conjunto com o hemograma é de grande importância na piscicultura, pois serve como auxílio para avaliação do estado fisiológico dos

animais. O perfil bioquímico também pode ser utilizado como indicador dos processos adaptativos do organismo, no metabolismo energético, proteico e mineral, ainda, pode oferecer subsídios na interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo e muscular (González e Silva, 2006).

Dentre os parâmetros bioquímicos avaliados, as proteínas plasmáticas totais podem ser divididas em albuminas e globulinas. A concentração das proteínas está relacionada com o estado nutricional do animal e a qualidade do alimento. A diminuição nos valores de proteínas totais e albumina sérica pode ter uma implicação significativa sobre as atividades fisiológicas e ainda pode ser vital na imunossupressão dos peixes, podendo causar impacto negativo sobre o desempenho produtivo dos animais (Gbore et al., 2010).

Da mesma forma que as proteínas plasmáticas totais, a glicose é um parâmetro importante a ser avaliado. Seu nível no plasma pode apresentar variações intraespecíficas, devido a vários fatores, como o estresse, estado nutricional, reprodutivo, peso, idade e também a temperatura ambiental. A elevação ou a redução dos níveis de glicose no plasma pode sugerir uma resposta ao estresse causada por inúmeros fatores relacionados ao metabolismo ou à fisiologia do animal, ao originar a quebra de carboidratos ou a utilização elevada da glicose para finalidades metabólicas (Kavitha et al., 2009).

Nos tecidos corporais o esteroide mais comum é colesterol. Esse composto atua como precursor na síntese de hormônios esteroides e sais biliares. Além disso, é um dos componentes estruturais das membranas celulares. Circula no plasma em forma livre e esterificada, sendo que normalmente durante as análises, pode-se determinar a soma de ambos ou do colesterol total (Duncan, 2000). Nos peixes, o nível de colesterol total no plasma é um bom indicador de saúde, pois está relacionado com o estado nutricional e metabólico dos animais. Seus níveis no plasma podem ser influenciados pelos nutrientes da dieta, como a fonte proteica, energética e ainda a composição dos ácidos graxos (Eliason et al., 2010; Messina et al., 2013). Os triglicérides incluem a classe mais importante de gordura na dieta e os seus níveis plasmáticos são determinados pela natureza química de seus ácidos graxos constituintes. Como todo lipídeo, uma das suas principais funções é fornecer energia para diversas funções vitais do organismo (Guyton e Hall, 2002).

Tanto os parâmetros hematológicos quanto os bioquímicos podem ser influenciados por diversos fatores ambientais como: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, fotoperíodo, bem como a assimilação de nutrientes e por fatores fisiológicos, como tamanho, comprimento corporal dos animais, sexo e fatores ambientais (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Além disso, as variações nos parâmetros podem ser decorrentes das metodologias empregadas nas

análises. Devido a esses diversos fatores, divergências entre os valores são encontradas na literatura, dificultando a comparação dos dados encontrados para uma determinada espécie. Assim, mais informações são necessárias para determinação de valores de referências para os parâmetros sanguíneos da tilápia do Nilo, contribuindo para área hematológica, que pode ser usada como uma ferramenta, auxiliando no controle da homeostase nos animais.

1.7 Musculatura estriada esquelética nos peixes

Nos peixes, o tecido muscular estriado esquelético compõe em torno de 40 a 60% do peso total do animal, perfazendo a maior parte da massa corporal. Além de atuar como um mecanismo específico para adaptação dos peixes ao meio aquático (Bone, 1978), essa parcela de massa corporal também é utilizada como estoque de proteínas que são empregadas em atividades que exigem elevada demanda de energia; ainda, compõe uma importante fonte de proteína para alimentação humana (Weatherley e Gill, 1985).

A musculatura nos peixes está organizada em unidades morfofuncionais, como os miômeros que apresentam formato em “W” em corte longitudinal e que ao longo do corpo do animal estão dispostos lado a lado e a sua divisão ocorre por bainhas do tecido conjuntivo, os miosseptos, onde estão inseridas as fibras musculares (Figura 3). A forma com que os miômeros estão dispostos nos peixes permite uma melhor mobilidade e agilidade durante a realização dos movimentos ondulatórios de natação (Alexander, 1969; Leeuwen, 1999).

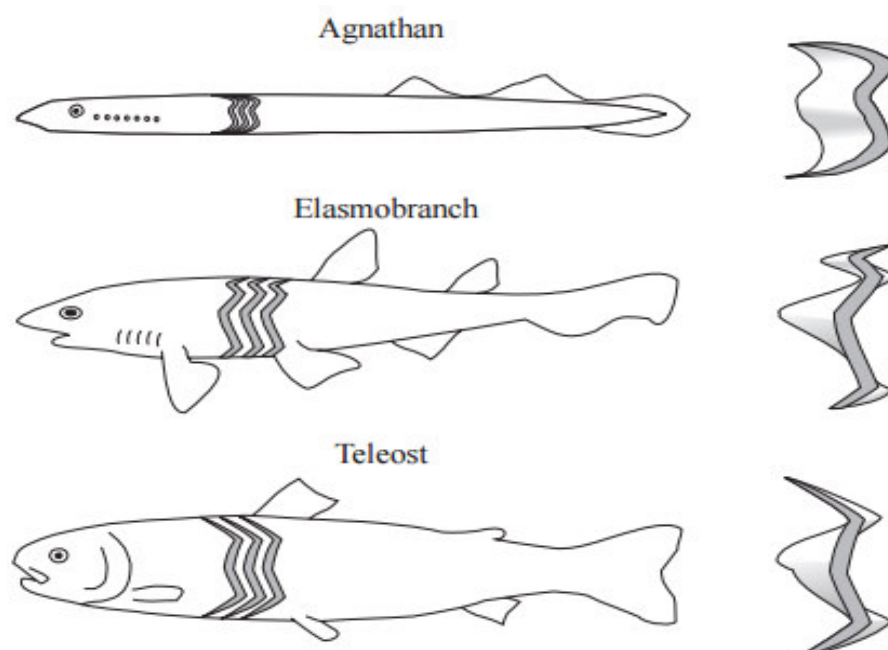


Figura 3. Estrutura dos miômeros do músculo lateral. No lado direito são mostrados os miômeros isolados. Fonte: Altringham & Ellerby (1999).

Nos peixes, as fibras musculares distribuem-se em três áreas ou compartimentos distintos, sendo eles: compartimento vermelho (superficial), intermediário e branco (profundo), essa distribuição pode variar em função da espécie em estudo e a fase de crescimento, conforme observado na (Figura 4) (Furuya et al., 2005).

O compartimento denominado vermelho ou superficial é composto por fibras menores com diâmetro variando entre 25 e 45 μm . Apresenta velocidade lenta de contração, elevada concentração de mioglobina, grande quantidade de mitocôndrias, lipídeos e com excelente suprimento dos capilares sanguíneos (Bone, 1978; Johnston, 1981). As fibras musculares vermelhas são responsáveis pelos movimentos lentos e de sustentação, sendo utilizadas pelos peixes durante o processo em que realizam a migração (Johnston, 1999). As fibras do compartimento vermelho normalmente correspondem de 10 a 30% de toda a musculatura miotomal (Greer-Walker e Pull, 1975; Sanger e Stoiber, 2001).

As fibras que compõem o compartimento branco ou profundo constitui a maior parte da massa muscular miotomal dos peixes, ocupando em torno de 70 a 90% do volume total (Weatherley e Gill, 1989; Kilarski, 1990). Essas fibras são maiores em comparação com as fibras vermelhas, com diâmetro entre 50 e 100 μm ou mais; caracterizam-se por apresentar velocidade de contração rápida, menor suprimento de capilares sanguíneos, baixa concentração de mioglobina, pouca quantidade de mitocôndrias e lipídeos (Bone, 1978; Sanger e Stoiber, 2001). A utilização dessas fibras ocorre durante a realização de movimentos bruscos de natação, como por exemplo, na fuga de predadores ou na captura de alimentos.

As fibras musculares intermediárias encontram-se inseridas entre as fibras musculares vermelhas e brancas, e a sua quantidade é diferente entre as espécies e durante os estgios de desenvolvimento dos peixes. O diâmetro médio das fibras musculares intermediárias encontra-se entre o diâmetro das fibras vermelhas e brancas. Como características adicionais, apresentam contração rápida, metabolismo oxidativo/glicolítico intermediário e resistência à fadiga (Johnston, 1981; Sanger e Stoiber, 2001).

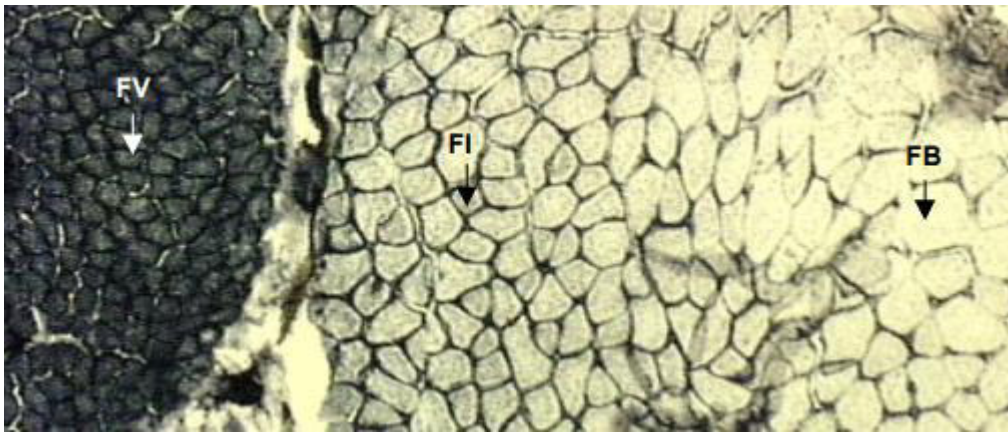


Figura 4. Corte transversal da musculatura estriada esquelética da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), mostrando o compartimento vermelho superficial (FV), compartimento intermediário (FI) e compartimento branco profundo (FB). Fonte: Furuya et al. (2005).

O crescimento muscular nos peixes ocorre por meio da ativação, diferenciação e proliferação dos mioblastos. Diferentemente dos mamíferos, a maioria dos peixes apresenta crescimento contínuo ao longo do ciclo de vida, ocorrendo por meio da hipertrofia e hiperplasia. Durante o crescimento hipertrófico, as células satélites fundem-se com as fibras musculares existentes, aumentando o número dos núcleos e a síntese de miofibrilas, ocasionando o aumento do diâmetro ou a área das fibras musculares, mantendo constante a razão entre o núcleo e citoplasma. Na hiperplasia, os mioblastos em proliferação agregam-se à superfície das fibras musculares e formam novos miotubos multinucleados, que se separam das fibras dando origem às novas fibras musculares (Figura 5) (Johnston, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001). Essa produção de miotubos e formação de novas fibras musculares continua até o momento em que o peixe alcance aproximadamente 40% do comprimento máximo do corpo (Johnston & Haal, 2004).

Nas espécies de peixes que chegam ao tamanho final de poucos centímetros de comprimento total, o crescimento muscular ocorre pelo mecanismo de hipertrofia de fibras na fase embrionária, sendo que o período de crescimento hiperplásico é mais curto. Enquanto que em peixes que atingem um tamanho em comprimento final maior, novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases de crescimento, inclusive na vida adulta (Weatherley et al., 1988; Rowleron e Veggetti, 2001). No entanto, esses processos podem ser influenciados por inúmeros fatores, como a espécie de peixe estudada, fase de crescimento, temperatura, fotoperíodo, composição da dieta e regime alimentar (Johnston, 2001; Dal Pai-Silva et al., 2003).

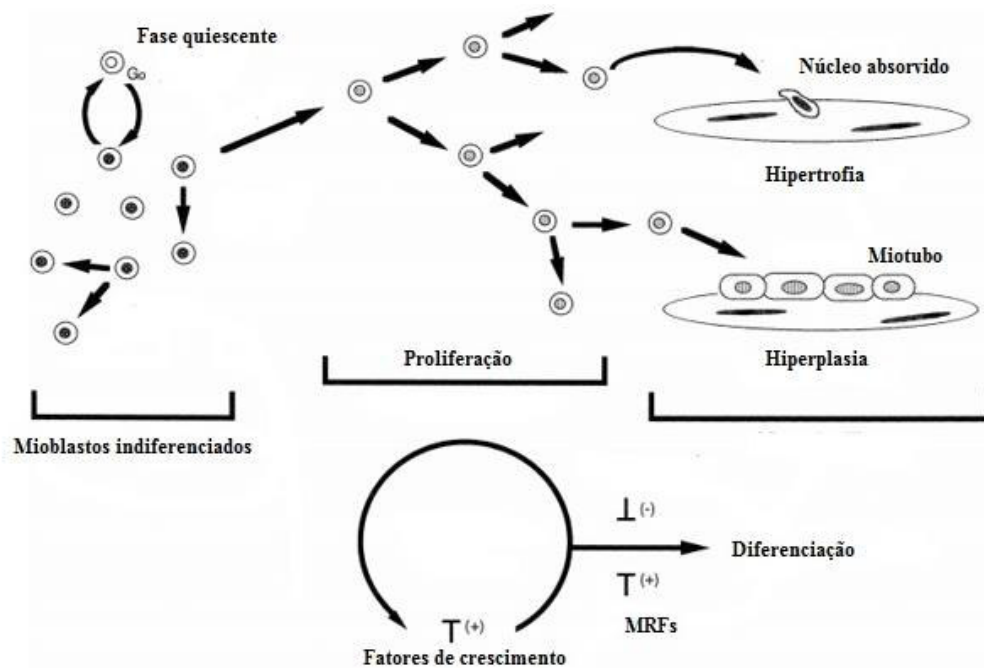


Figura 5. Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular em peixes. Os mioblastos indiferenciados proliferam e podem se fundir entre si para formar uma nova fibra muscular (hiperplasia) ou podem sofrer fusão com uma fibra muscular, aumentando a área da fibra muscular, sob influência dos Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) e dos Fatores de Crescimento. (Adaptado de Johnston, 1999).

Estudos relacionando o crescimento muscular associados a nutrição, ainda não foram totalmente elucidados para peixes de interesse comercial no Brasil. Assim, pesquisas avaliando o comportamento muscular em função da dieta, são necessários para auxiliar no entendimento desse mecanismo no organismo dos peixes.

1.8 Controle molecular da miogênese em peixes teleósteos

Nos peixes, o processo de diferenciação das células precursoras miogênicas nas fibras musculares é regulado por meio da expressão diferencial de fatores reguladores da miogênese (do inglês *myogenic regulatory factors* ou MRFs), sendo composta pelos genes MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Watabe, 2001). Durante o processo da miogênese, os MRFs (MyoD e Myf5) atuam na proliferação dos mioblastos ou das células satélites, enquanto que a expressão da miogenina e MRF4 são requeridos na determinação do processo de diferenciação dos mioblastos, durante as fases de fusão e diferenciação em fibras musculares maduras ou das células satélites (Rescan, 2001).

Esses fatores reguladores da expressão miogênica são fosfoproteínas nucleares que contêm um domínio que é considerado altamente conservado, com aproximadamente 60 aminoácidos, conhecido como “basic Helix-Loop-Helix” (bHLH). Esses fatores têm capacidade de conectar-se a sequências de DNA (5’ – CANNTG-3’), sendo conhecidas como *Ebox*; podem ser encontrados na região promotora de inúmeros genes músculo-específico, levando à expressão dos mesmos. Ainda, possuem a habilidade de iniciar a transcrição dos seus próprios genes durante o crescimento muscular dos animais (Murre et al., 1989; Sassoon, 1993).

O processo de proliferação dos mioblastos e a hiperplasia celular nos peixes podem ser induzidos pela maior expressão dos genes MRFs, MyoD e Myf5, durante a fase de crescimento inicial, enquanto que a expressão da Miogenina e MRF4 está relacionada com os processos de diferenciação dos mioblastos e hipertrofia das fibras musculares, agindo de forma mais intensa na fase adulta (Johansen e Overturf, 2005). Além de desempenhar um importante papel no desenvolvimento muscular, a MyoD é essencial no processo de regeneração do músculo esquelético. Posteriormente a uma lesão, inicia-se o processo de regeneração muscular, onde as células satélites são ativadas; essas células são indiferenciadas e ficam localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema das fibras maduras. Em condições consideradas normais, elas permanecem em estado quiescentes.

Em condições onde há necessidade de novos mioblastos para o crescimento ou para regeneração muscular, essas células são ativadas, tanto após injúrias, traumas, exposição a substâncias tóxicas, desnervação, entre outros (Lieber, 2002). Após a ativação dessas células, inicia-se o processo de proliferação e diferenciação das células satélites, sendo esse processo semelhante ao das células musculares durante o desenvolvimento embrionário, e os MRFs desempenham importante papel nesses casos (Chargé e Rudnicki, 2004).

A miogenina, juntamente com os genes MRFs secundários e MRF4, atuam na diferenciação dos miócitos e na maturação das miofibrilas. A miogenina desempenha papel de forma direta na diferenciação muscular e ativação de genes músculo-específicos, sendo que a expressão da miogenina é controlada pela expressão do MRF4. Deste modo, pode-se dizer que o gene MRF4 age de maneira sinérgica com a miogenina na diferenciação celular e, ainda, na maturação dos mioblastos (Puri e Sartorelli, 2000).

Durante o crescimento dos animais, a manutenção do fenótipo muscular é resultante do equilíbrio entre a síntese proteica e a degradação proteica. Esses processos são controlados por meio da ação de hormônios, fatores de crescimento e também pela ação dos fatores de

regulação miogênicas como a miostatina. Em conjunto, esses fatores iniciam uma cascata de eventos, culminando na síntese ou degradação proteica (Matsakas e Patel, 2009).

A miostatina pertence à superfamília dos fatores de crescimento TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) e atua na regulação do crescimento do músculo estriado esquelético nos animais vertebrados. Desempenha papel de forma negativa na regulação da miogênese, silenciando a ativação dos fatores de transcrição. Além disso, controla a formação de novas fibras musculares e impede a hipertrofia das fibras existentes, por meio da redução da expressão dos MRFs (Langley et al., 2002). Estudos indicam que em animais adultos a miostatina parece agir sobre as células satélites, mantendo-as em estado de repouso, podendo suprir a proliferação e a diferenciação. Em algum momento, quando necessário, a miostatina pode sofrer inibição e então as células satélites são ativadas (Lee, 2007). Nos mamíferos, a expressão do gene miostatina é encontrada exclusivamente no músculo esquelético, ocorrendo nas fases de desenvolvimento e adulto, enquanto que nos peixes esse gene pode ser encontrado nos olhos, brânquias, tecido muscular, intestino, cérebro, ovários e testículos, exercendo importante papel na manutenção da homeostase do crescimento do tecido, regulando ainda, a osmolaridade e atuando na regulação do aparelho reprodutivo (Maccatrozzo et al., 2001; Rios et al., 2002; Rodgers et al., 2001).

A modulação do crescimento muscular está diretamente relacionada com a expressão dos fatores de regulação miogênica realizada pelos mioblastos, e pode exercer influência no tamanho dos peixes na fase adulta. Fatores como a temperatura, potencial de Hidrogênio, oxigênio dissolvido e a composição da dieta também podem influenciar a expressão dos fatores reguladores miogênicos durante o crescimento, podendo modificar o fenótipo das fibras de acordo com as necessidades dos animais (Heap et al., 1985). Nesse sentido, estudos focando o efeito da nutrição sobre a expressão dos genes envolvidos no crescimento muscular em diferentes espécies de peixes produzidos comercialmente são relevantes, pois podem proporcionar melhores respostas zootécnicas e, ainda, reduzir os custos com a alimentação.

1.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, H. 1995. Histidine-related dipeptides: distribution, metabolism, and physiological function. *Biochem. Mol. Boil. Fishes.* 4, 309-333.
- Abidi, S. F., Khan, M., 2004. Dietary histidine requirement of fingerling indian major carp, *Labeo rohita* (hamilton) *ISR J Aquacult Bamid.* 56, 200-208.

- Abidi, S.F.; Khan, M.A., 2012. Dietary histidine requirement of Singhi, *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch). *Aqua. Res.* 45, 1-14.
- Alexander, R., 1969. The orientation of muscle in the myomers of fishes. *J. Mar. Biol. Assoc.* 49, 263-290.
- Altringham, J.D., Ellerby, D.J., 1999. Fish swimming: patterns in muscle function. *J. Exp. Biol.* 202, 3397-3403.
- Bicudo, I.J., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P. 2009. Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. *Aqua. Res.* 40, 486-495.
- Bone, Q. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, 1978. pp. 361-424.
- Breck, O., Sveier., 2001. Growth and cataract development in two groups of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) post smolts transferred to sea with a four week interval. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 21, 91-103.
- Breck, O., Bjerkås, E., Campbell, P., Arnesen, P., Haldorsen, P., Waagbø, R., 2003. Cataract preventative role of mammalian blood meal, histidine, iron and zinc in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of different strains. *Aqua. Nutr.* 9, 341-350.
- Breck, O., Bjerkås, E., Campbell, P., Rhodes, J.D., Sanderson, J., Waagbø, R., 2005. Histidine nutrition and genotype affect cataract development in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.* 28, 357-371.
- Castagnolli, N. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Funep, 1992. 192p.
- Chargé, S.B.P., Rudnicki, M. A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 1, 209-38.
- Cowey, C.B. 1994. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture* 124, 1-11.
- Dal Pai-Silva, M.; Carvalho, R. F.; Pellizzon, C. H.; Pai, V. Dal. 2003. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell*, 35(3), 179-187.
- De Fabo, E. C., Webber, L. J., Ulman, E. A., Broemeling, L. D., 1997. Dietary L-histidine regulates murine skin levels of trans-urocanic acid, an immunoregulating photoreceptor, with an unanticipated modulation: potential relevance to skin cancer. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, 127, 2158-2164.
- Deml, K. F., Beermann, S., Neumann, D., Strasser, A., Seitert, R., 2009. Interactions of Histamine H1-Receptor Agonists and Antagonists with the Human Histamine H4-Receptor. *Mole. Pharmacol.* 76, 1019-1030.
- D'Mello, J.P.F. Conclusions, in: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Amino acids in animal nutrition*. Cabi Publishing., London, 2003, 544p.

- Duncan, J. Bioquímica Clínica. En: Manual de Patología Clínica em Pequenos Animales. Davidson, M; R. Else; J. Lumsden (Eds). Ed. Harcourt, España. 2000.
- Dy, M., Schneider, E., 2004. Histamine–cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 393–410.
- Eliason, E.J., Djordjevic, B., Trattner, S., Pickova, J., Karlsson, A., Farrell, A.P., Kiessling, A.K. 2010. The effect of hepatic passage on postprandial plasma lipid profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after a single meal. *Aqua. Nutr.* 16, 536-543.
- El-Sayed, A.F.M., 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* *Aquaculture* 179,149-168.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Farhat, Khan, M.A., 2013. Effects of varying levels of dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition in fingerlings stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture*, 404-405, 130-138.
- 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 para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.* 30,1143-1149.
- Furuya, W.M., Botaro, D., Neves, P.R., Silva, L. C.R., Hayashi, C., 2004. Exigência de lisina pela tilápia do Nilo na fase de terminação. *Cien. Rural.* 34, 1571-1577.
- Furuya, W.M., Botaro, D., Macedo, R. M. G., Santos, V. G., Silva, L. C.R., Silva, T.C., Furuya, V.R.B., Sales, P.J.P., 2005. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.* 34, 1433-1441.
- Gao, Yu-Lie., Liu, Yong-Jian., Chen, Xian-Quan., Yang, Hui-Jun., Li, Xue-Fei., Tian, Lia-Xia. Effects of graded levels of histidine on growth performance, digested enzymes activities, erythrocyte osmotic fragility and hypoxia-tolerance of juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Aquaculture*. 452, 338-394.
- Gbore, F., Adewole, A.M., Oginni, O., Oguntolu, M.F., Bada, A.M. Akele, O. 2010. Growth performance, haematology and serum biochemistry of African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings fed graded levels dietary fumonisin B1. *Mycotoxin Res.* 26, 221-227.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232, 455–470.
- Glover, C.N., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2003. Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* 1614, 211–219.

- González, F. H. D., Da Silva, Ceroni. Introdução a Bioquímica Química e Veterinária. 2º edição, editora UFRGS, 2006.
- Greer-Walker, M., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. J. Fish. Biol., 7, 295-300.
- Guyton, Arthur C.; Hall, John E. Tratado de fisiologia medica. 10.ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan AS, 2002.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., Selbach, O., 2008. Histamine in the Nervous System. Physiol. Rev. 88, 1183 – 1241.
- Hayashi, C. 1995. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R.P., HAYASHI, C., Furuya, W.M. (Eds.) Curso de piscicultura-Criação racional de tilápias. 1.ed. Maringá: Eduem, p.4.
- Heap, S.P., Watt, P.W., Goldspink. 1985. Consequences of thermal change on the myofibrillar ATPase of five freshwater teleosts. J. Fish. Biol. 26, 733-738.
- Horn, M. H. 1998. Feeding and Digestion In: Evans, E. H. The Physiology of Fishes – 2º ed. New York: CRC Press LLC, 43-64.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Mundial. Rio de Janeiro, v. 42, p.1-39, 2014.
- Johansen K.A., Overturf K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mar. Biotechnol. 7, 576-587.
- Johnston, I.A., 1981. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. Cell.Tissue. Res. 214, 369-379.
- Johnston, I. A. 1993. Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae. Mar. Biol. 116, 369- 379.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. Aquaculture 177, 99-115.
- Johnston, I.A., Hall, T.E., 2004. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. In: J.J. Govoni (ed.), The Development of Form and Function in Fishes and the Question of Larval Adaptation, pp. 85-116. American Fisheries Society, Symposium 40, Bethesda, Maryland.
- Johnston, I.A., 2001. Genetic and environmental determinants of muscle growth patterns. In: Jhohnston, I.A (Ed), Muscle Development and Growth. Fish Physiology. 18, 141-186.
- Jones, A. L., Hulett, M. D., Parish, C. R., 2005. Histidine-rich glycoproteins: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. Immunol. Cell. Biol. 83, 106- 118.
- Kavitha, C., Harada, T., Kawashima, A., Imada, K., Mizuguchi, K., 2009. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing

monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids. 80, 229-238.

- Khan, M.A., Abidi, S.F., 2014. Dietary histidine requirement of Singhi, *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch). Aquac. Res. 45, 1341-1354.
- Kilarski, W., 1990. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L). J. Fish. Biol. 36, 353-362.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. J. Biol. Chem. 277, 49831-49840.
- Lee, S.J., 2007. Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess. Trends in Genetics. 23, 475-477.
- Lieber, R.L., 2002. Skeletal muscle structure, function & plasticity: The physiological basis of rehabilitation. 2 ed. Baltimore-USA, Williams & Wilkins.
- Lopes, S. T. A., Biondo, A. W., Santos, A.P., 2007. Manual de Patologia Clínica Veterinária. UFSM - Universidade Federal De Santa Maria CCR - Centro De Ciências Rurais. 3^o edição, Santa Maria.
- Lovell, T., 1998. Nutrition and Feeding of fish. Alabama: Kluwer Academic Publishers.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Rodaelli, G., Mascarello, F., Patarnelo, T. 2001. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure and expression pattern. Mar. Biotechnol. 3, 224-230.
- Matsakas, A., Patel, K., 2009. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. Histol. Histopathol. 24, 209-22.
- McPherron, A. C.; Lee, S.J. 1997. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 12457-12461.
- Messina, M., Piccolo, G., Tulli, F., Messina, C.M., Cardinaletti, G., Tibaldi, E. Lipid composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed diets containing wheat gluten and legume meals as substitutes for fish meal. Aquaculture 376-379, 6-14.
- Midtlyng, P.J., Breipohl, W., Ahrend, M., Bjerkas, E., Waagbø, R.; Wall, T., 2000. Cataracts in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. In: Aqua 2000, Nice, France, May 2-6 (Abstract), 472.
- Murre, C., Mccaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell, 58, 537- 44.

- National Research Council. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Washington, DC: The National Academies Press, 2011, 390p.
- Nelson, D.L, Cox, M.M., 2008. Lehninger Principles of biochemistry. 5. Ed. New York: Worth Publishers, 1119p.
- Nogueira, A. Criação de tilápias em tanques-rede. Salvador: Sebrae Bahia, 2007. 23p.
- Onodera, K., YamtodanI, A., Watanabe, T., Wada, H., 1994. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. Prog in Neurobiol. 42, 685-702.
- Pezzato, L.E.; Barros, M.M.; Fracasoli, D.M.; Cyrino, J.E.P. Nutrição De Peixes. IN: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Ed). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo, TecArt, 2004, 533p.
- Portz, L., Furuya, W.M., 2012. Energia, proteína e aminoácidos, in: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds.), Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Aquabio, Florianópolis, Santa Catarina, 65-77.
- Puri, P.L., Sartorelli, V., 2000. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. J. Cell. Physiol. 185, 155-173.
- Quintana, C.F., 2002. *Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887) tratados com cromo*. Jaboticabal. 2002. 67f. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Universidade Estadual Paulista - Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP. Jaboticabal, SP, 2002.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Benites DE Pádua, S., Tavares-Dias, M., Egami, M.I. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem, Maringá, Paraná, 140p.
- Rescan, P.Y., 2001. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 130, 1-12.
- Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J., 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. Am. J. Physiol-Cell. PH. 282, 993-999.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., Levine, M.A., 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. Endocrinology 142, 1412-1418.
- Rodwell, V.W., Kennelly, P.J., 2003. Catabolism of the Carbon Skeletons of Amino Acids. In: Murray, K.R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. Harper's Illustrated Biochemistry. New York: McGraw-Hill Companies. 269-279
- Rotta, M.A., 2003 Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Corumbá: Série Documentos, Embrapa, 49p.

- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston, I.A. (Ed.). *Muscle Development and Growth*. London: Academic Press, 103-139.
- Sakata, T., Yoshimatsu, H., Kurokawa, M., 1997. Hypothalamic neuronal histamine: Implications of its homeostatic control of energy metabolism. *Nutrition* 13, 403-411.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.). *Muscle Development and Growth*. London: Academic Press, p.187-250.
- Santiago, B.C., Lovell, R.T. 1988. Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *J. Nutr.* 118, 1539-1546.
- Sassoon, D.A., 1993. Myogenic Regulatory Factors: Dissecting Their Role And Regulation During Vertebrate Embryogenesis. *Dev. Biol.* 156, 11-23.
- Smutná, M., Vorlová, L., Svodobová, Z., 2002. Pathobiochemistry of ammonia in the internal environment of fish (review). *Acta Vet. Brno.* 71, 169-181.
- Souza, P. A. T. Análise dos receptores de acetilcolina (nachs) na musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca submetidos ao treinamento aeróbico. 2012. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de PósGraduação em Biologia Geral e Aplicada. 89p.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ed.Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto, São Paulo, 144p.
- Tomasso, J.R., 1944. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Rev. Fish. Biol.* 2, 291-314.
- Tröbe, C., Waagbø, R., Breck, O., Stavrum, A.K., Petersen, K., Olsvik, A.P. 2009. Genome-Wide transcription analysis of histidine-related cataract in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Molecular Vision.* 15, 1332-1350.
- Turra, E. M., Oliveira, D. A. A., Teixeira, E. A., Prado, S. A., Melo, D. C., Souza, A. B., 2010. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 34, 29-36.
- Vieira, L.C. Comparação da atividade anti-histamínica da Clemastina e da pirilamina em íleo de *Cavia porcellus* (cobaio). 2005, 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Waagbø, R., Tröbe, C., Koppe, W., Fontanillas, R., Breck. O., 2010. Dietary histidine supplementation prevents cataract development in adult Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in seawater. *Br. J. Nutr.* 104,1460–1470.
- Wall, T., Bjerkas, E. 1999. A simplified method of scoring cataracts in fish. *Bull. European Association of Fish Pathologists*, v.19, p.162–165.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish. Biol.* 55, 1–18.

- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors. *In*: Johnston, I.A. (Ed) Muscle development and Growth. *Fish Physiology* 18. San Diego: Academic Press, 19-41.
- Weatherley, A. H., Gill, H. S., 1985. Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth. *Experientia* v.41, 353-354
- Weatherley, A., Gill, H., Lobo, A.F., 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J. Fish. Biol.* 33, 851-859.
- Wilson, R.P., Poe, W.E., Robinson, E.H., 1980. Leucine, isoleucine, valine and histidine requirements of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 110, 627-633.
- Wu. G., 2013. Amino Acids: Biochemistry and Nutrition. CRC Press Boca Raton, London New York, 482p.
- Zehra, S., Khan, A. Mukthar. 2014. Dietary histidine requirement of fingerling *Catla Catla* (Hamilton) based on growth, protein gain, histidine gain, RNA/DNA ratio, haematological indices and carcass composition. *Aquac. Res.* 1-12.
- Zhao, B., Feng, L., Liu, Y., Kuang, S., Tang, L., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W.D., Li, S.H., Zhou, X.Q. 2012. Effects of dietary histidine levels on growth performance, body composition and intestinal enzymes activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquacul. Nutr.* 18, 220-232.

2.0 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar a exigência de histidina em dietas para alevinos e juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar as exigências dietéticas de histidina para alevinos e juvenis de tilápias do Nilo por meio do desempenho produtivo;
- ✓ Analisar a expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina de alevinos e juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina;
- ✓ Avaliar o crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico de alevinos e juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina;
- ✓ Examinar as respostas hematológicas e bioquímicas do sangue de alevinos e juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina;
- ✓ Analisar a composição corporal de alevinos e juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina.

3.0 CAPÍTULO I

Exigência de histidina para alevinos de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e parâmetros hematológicos¹

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi determinar a exigência de histidina para alevinos de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, desenvolvimento muscular, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina e miostatina) e respostas hematológicas e bioquímicas. Foram utilizados 540 alevinos de tilápia do Nilo com peso médio inicial de 4,84 ($\pm 0,04$ g), distribuídos em 18 caixas de fibra de vidro com capacidade de 250 litros, em um delineamento inteiramente casualizado composto por seis tratamentos, três repetições e trinta peixes por unidade experimental, por um período de 110 dias. Seis dietas isoproteicas (265,7 g kg⁻¹ de proteína bruta) e isoenergéticas (3821,41 kcal kg⁻¹ de energia bruta) contendo níveis crescente de inclusão de histidina (4,2; 5,4; 7,1; 8,9; 9,8; 11,5 g kg⁻¹ da matéria seca) foram elaboradas. Os melhores resultados de ganho em peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foram observados nos peixes que receberam a dieta com 8,9 g kg⁻¹ de histidina. A proteína corporal foi mais elevada nos peixes alimentados com as dietas contendo 7,1 e 9,8 g kg⁻¹ de histidina em comparação aos animais que receberam a dieta contendo 11,5 g kg⁻¹ de histidina. Foi observado processo de crescimento hipertrófico nos peixes alimentados com a dieta contendo 8,9 g kg⁻¹ de histidina em comparação com os peixes que receberam a dieta contendo 5,4 g kg⁻¹ de histidina. A suplementação de 9,8 g kg⁻¹ de histidina na dieta proporcionou maior expressão dos níveis de mRNA da MyoD. Contudo, a expressão dos níveis de mRNA da miogenina foi mais elevada nos peixes que receberam as dietas contendo 9,8 e 11,5 g kg⁻¹ de histidina. A expressão da miostatina não foi influenciada pelos níveis de histidina da dieta. Com base na regressão polinomial de segunda ordem, a exigência de histidina para o máximo ganho de peso de alevinos de tilápia foi estimada em 8,1 g kg⁻¹ de histidina, correspondente a 3,1% da proteína bruta da dieta.

Palavras-chave: aminoácidos, hematologia, crescimento muscular esquelético MyoD, miogenina e miostatina.

¹ Manuscrito redigido de acordo com as normas da Aquaculture

Histidine requirement for Nile tilapia fingerlings based on growth performance, expression of muscle growth-related genes, and hematological parameters

Abstract: The purpose of this study was to determine the dietary histidine requirement for Nile tilapia fingerling based on growth performance, muscle development, expression of muscle growth-related genes (Myod, myogenin and myostatin), hematological and biochemical responses. Five hundred and forty Nile tilapia fingerlings with initial average weight (4.84 ± 0.04 g) were used, distributed in 18 fiberglass boxes with 250 liter capacity in a completely randomized design composed of six treatments, three replicates and thirty fish per experimental unit, for a period of 110 days. Six isoproteic ($265,7\text{g kg}^{-1}$ crude protein) and isoenergetic diets (3821.41 kcal kg^{-1} gross energy) containing increasing levels of histidine inclusion (4.2; 5.4; 7.1; 8.9; 9.8; 11.5 g kg^{-1} of dry matter) were prepared. The best results of weight gain, feed conversion and protein efficiency ratio were observed in fish fed diet containing 8.9 g kg^{-1} histidine. The body protein was higher for the fish fed diets containing 7.1 and 9.8 g kg^{-1} of histidine compared to animals that received the diet containing 11.5 g kg^{-1} of histidine. Hypertrophic growth process was observed in fish fed the diet containing 8.9 g kg^{-1} of histidine when compared to the fish fed with diets containing 5.4 g kg^{-1} of histidine. Supplementation of 9.8 g kg^{-1} of histidine in the diet provided higher expression of the MyoD mRNA levels. However, the expression of the myogenin mRNA levels was higher in the fish fed diets containing 9.8 g and 11.5 g kg^{-1} of histidine. The myostatin expression was not affected by histidine levels in the diet. Based on the polynomial regression of the second order, the histidine dietary requirement for maximum weight gain of tilapia fingerlings was estimated at 8.1 g kg^{-1} , corresponding to 3.1% of the diet crude protein.

Keywords: amino acids, skeletal muscle growth hematology, MyoD, myogenin, myostatin.

Introdução

A proteína é o principal nutriente e também o mais oneroso na formulação das dietas para tilápias. Os peixes, assim como outros animais, não apresentam uma exigência verdadeira em proteína, mas sim de uma combinação de aminoácidos que atenda às exigências quantitativas em que os aminoácidos estejam presentes em proporções adequadas de forma a evitar toxicidade, antagonismos ou interrelações.

Dentre os aminoácidos, a histidina é considerada essencial e pode estar presente em quantidade limitante em dietas elaboradas com base em ingredientes de origem vegetal. Atua na manutenção da osmorregulação (Abe e Ohmama, 1987) e possui funções catalíticas vitais

no metabolismo dos aminoácidos (NRC, 2011). Ainda, a histidina está presente em grande quantidade na glicoproteína (HRG) presente no plasma e essa, por sua vez, é responsável por uma série de processos, incluindo adesão e migração celular, funções fagocíticas e apoptose das células (Jones et al., 2005).

A exigência de histidina foi determinada para diversas espécies de peixes, incluindo a carpa comum *Cyprinus carpio* (Nose, 1979); truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Rodehutschord et al., 1997); carpa maior da Índia *Cirrhinus mrigala* (Ahmed e Khan, 2005); Jian carpa *C. carpio* (Zhao et al., 2013); Stingin catfish *H. fossilis* (Farhat e Khan, 2013); Singhi *H. fossilis fry* (Khan e Abidi, 2014); Catla *C. catla* (Zehra e Khan, 2014); bagre Africano *Clarias gariepinus* (Khan e Abidi, 2009). Até o momento, somente um estudo avaliando a exigência de histidina para larvas de tilápia do Nilo *O. niloticus* foi realizado (Santiago e Lovell, 1988). A tilápia do Nilo está entre as espécies de peixes mais cultivadas no mundo. Portanto, dietas balanceadas que atendam às exigências nutricionais e propiciem o melhor desempenho dos peixes são fundamentais para incrementar a produção dessa espécie.

Nos peixes, o crescimento muscular ocorre por hipertrofia e hiperplasia a partir da proliferação e diferenciação de mioblastos em fase adulta ou por célula satélites. Em geral, esses dois tipos de crescimento muscular ocorrem durante todo o período de crescimento dos peixes. No entanto, a hiperplasia é um processo de crescimento mais acentuado durante a fase juvenil, enquanto o crescimento hipertrófico é mais intenso e evidente na fase adulta do animal (Almeida et al., 2010).

A formação do tecido muscular envolve a ação de diversos fatores regulatórios. Dentre eles, estão os fatores de regulação miogênica (MRFs), como a MyoD e a miogenina. Os MRFs compartilham um domínio altamente conservado, conhecido como *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH), que apresenta 80% de similaridade na sua sequência de aminoácidos (Edmondson e Olson, 1993). Os MRFs ligam-se a sequências específicas de DNA, presentes na região promotora de genes músculo-específicos, levando à sua expressão (Watabe, 1999). Enquanto a miostatina atua controlando o crescimento muscular de forma negativa, ela evita a hipertrofia das fibras musculares, agindo na redução da expressão dos MRFs (Langley et al., 2002).

Estudos avaliando a exigência de histidina e de como esse aminoácido influencia a expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular da tilápia do Nilo ainda não foram relatados na literatura. Assim, o objetivo desse trabalho, foi determinar a exigência de histidina em dietas para alevinos de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo,

parâmetros hematológicos, bioquímicos, expressão dos genes MyoD, miogenina, miostatina e crescimento das fibras musculares.

Material e métodos

Peixes e condições experimentais

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a junho de 2014 no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos em Manejo na Aquicultura – (GEMAQ), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, *Campus* Toledo, e foi aprovado pelo Comitê de Ética da mesma instituição, sob o protocolo N°05/14. Foram utilizadas 540 tilápias com peso médio de $4,80 \pm 0,07$ g, distribuídas em caixas de fibra de vidro circulares com capacidade de 250 litros, sendo cada unidade composta por 30 peixes. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados diariamente como o aparelho YSI Professional *Plus Multiparameter Water Quality Meter*; o oxigênio dissolvido foi mantido por meio de um soprador ($5,97 \pm 0,28$ mg L⁻¹), a temperatura foi controlada com a utilização de um termostato digital ($28,22 \pm 0,88$ °C), o pH manteve-se em $7,12 \pm 0,19$ e a condutividade elétrica apresentou média de $108,24 \pm 6,32$ µS.cm⁻¹.

Dietas experimentais

Foram elaboradas seis dietas com 265,75 g kg⁻¹ de proteína bruta e 3821,41 kcal kg⁻¹ de energia bruta com níveis crescentes de suplementação de L-histidina (Ajinomoto – Divisão de Nutrição Animal, SP, Brasil) de 0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,1 e 7,6 g kg⁻¹, em que foram obtidas dietas com 4,2; 5,4; 7,1; 8,9; 9,8 e 11,5 g kg⁻¹ de histidina em substituição a L-alanina, seguindo às recomendações propostas por Furuya (2010) e NRC (2011) para o atendimento das exigências nutricionais de alevinos de tilápia do Nilo, conforme a Tabela 1. Os ingredientes selecionados foram moídos individualmente em moedor tipo martelo (Vieira, MCS 280, Tatuí-SP, Brasil) com peneira de malha 0,3 mm de diâmetro. Posteriormente, as rações foram processadas de maneira extrusada (Extec, Ex-Micro, Ribeirão Preto-SP, Brasil) para terem diâmetros de aproximadamente 2,0 mm. O arrazoamento foi realizado quatro

vezes ao dia (8h00, 11h00, 14h00 e 17h00) até a saciedade aparente, por um período de 110 dias. A composição dos aminoácidos essenciais e não essenciais encontram-se na Tabela 2. As análises foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC- *High-Performance Liquid Chromatography*) no Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. – *Animal Nutrition*, São Paulo, Brasil.

Tabela 1 Formulação e composição química das dietas experimentais (g kg⁻¹ matéria seca)

| Ingredientes | Níveis de histidina (g kg ⁻¹) | | | | | |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 4,2 | 5,4 | 7,1 | 8,9 | 9,8 | 11,5 |
| Arroz, quirera | 662,0 | 662,0 | 662,0 | 662,0 | 662,0 | 662,0 |
| Farinha de vísceras de aves | 145,5 | 145,6 | 145,6 | 145,6 | 145,6 | 145,6 |
| Farinha de penas | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Farinha de carne e ossos 45% | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| Óleo de soja | 5,8 | 5,8 | 5,8 | 5,8 | 5,8 | 5,8 |
| Sal comum | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| L-alanina | 10,0 | 8,4 | 6,9 | 5,4 | 3,9 | 2,4 |
| L-lisina – 78,4% | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 | 6,4 |
| L-treonina – 98,5% | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 | 2,2 |
| DL-metionina – 99% | 1,20 | 1,20 | 1,20 | 1,20 | 1,20 | 1,20 |
| L-triptofano – 99% | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| L-histidina – 99% | 0,0 | 1,5 | 3,0 | 4,5 | 6,0 | 7,5 |
| Supl. mineral e vitamínico ¹ | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| Vitamina C | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Antifúngico | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Antioxidante | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Composição analisada com base na matéria seca (g kg ⁻¹) | | | | | | |
| Matéria seca | 924,4 | 923,9 | 923,7 | 924,9 | 924,3 | 924,8 |
| Energia bruta, kcal kg ⁻¹ | 3822 | 3820 | 3819 | 3824 | 3821 | 3820 |
| Proteína bruta | 265,9 | 265,8 | 265,8 | 265,7 | 265,7 | 265,6 |
| Lípideos totais | 44,3 | 44,9 | 44,2 | 44,7 | 44,2 | 44,9 |
| Fibra bruta | 2,1 | 2,1 | 2,0 | 2,2 | 2,1 | 2,0 |
| Cálcio | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 1,3 | 1,2 | 1,3 |
| Fósforo total | 9,0 | 9,2 | 9,1 | 9,0 | 9,0 | 9,2 |

¹Suplemento mineral e vitamínico: níveis de garantia por kg do produto - Premix (DSM-Roche®): Vit_A, 24.000 UI; Vit_{D3}, 6.000 UI; Vit_E, 300 mg; Vit_{K3}, 30 mg; Vit_{B1}, 40 mg; Vit_{B2}, 40 mg; Vit_{B6}, 35 mg; Vit_{B12}, 80 mg; Ác. fólico, 12 mg; Pantotenato Ca, 100 mg; Vit_C, 600 mg; Biotina, 2 mg; Colina, 1.000 mg; Niacina; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg.

BHT = Butil Hidroxi Tolueno

Baseado nos valores propostos por Furuya (2010) e NRC (2011).

Tabela 2. Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg⁻¹ da matéria seca)¹

| | Dietas | | | | | |
|-----------------------------------|--------|------|------|------|------|------|
| | 4,2 | 5,4 | 7,1 | 8,9 | 9,8 | 11,5 |
| <i>Aminoácidos essenciais</i> | | | | | | |
| Arginina | 15,8 | 16,0 | 17,3 | 15,5 | 16,4 | 16,2 |
| Fenilalanina | 11,4 | 11,8 | 12,1 | 11,8 | 11,5 | 11,4 |
| Histidina | 4,2 | 5,4 | 7,1 | 8,9 | 9,8 | 11,5 |
| Isoleucina | 10,3 | 10,2 | 10,4 | 10,4 | 10,5 | 10,0 |
| Leucina | 19,0 | 19,0 | 19,4 | 19,2 | 19,3 | 19,0 |
| Lisina | 15,6 | 15,3 | 15,4 | 15,9 | 16,0 | 16,7 |
| Metionina | 6,0 | 6,1 | 6,0 | 6,1 | 6,2 | 6,2 |
| Treonina | 12,0 | 12,1 | 12,7 | 12,7 | 12,7 | 12,4 |
| Triptofano | 3,3 | 3,2 | 3,3 | 3,2 | 3,2 | 3,1 |
| Valina | 13,5 | 13,8 | 13,3 | 13,9 | 13,9 | 13,0 |
| <i>Aminoácidos não essenciais</i> | | | | | | |
| Ácido aspártico | 18,5 | 18,7 | 19,0 | 19,2 | 19,0 | 18,5 |
| Ácido glutâmico | 30,4 | 30,3 | 31,7 | 32,0 | 31,6 | 31,4 |
| Alanina | 24,7 | 22,6 | 20,8 | 18,8 | 16,8 | 14,3 |
| Cistina | 5,9 | 5,9 | 6,5 | 5,9 | 6,2 | 5,9 |
| Glicina | 23,6 | 24,5 | 24,7 | 24,6 | 25,1 | 24,9 |
| Serina | 16,7 | 17,3 | 17,9 | 18,0 | 17,8 | 17,3 |
| Tirosina | 8,2 | 8,1 | 8,4 | 7,5 | 7,9 | 7,8 |

¹Análises realizadas pela *Ajinomo Animal Nutrition*

Coleta de dados e desempenho produtivo

Ao final do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, para esvaziamento do trato gastrointestinal e, posteriormente, para coleta de sangue, foram anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹ de água) em seguida foram submetidos à eutanásia com benzocaína (250 mg L⁻¹), para realização dos parâmetros de desempenho produtivo e composição corporal seguindo protocolo de Gomes et al. (2001).

Para o desempenho produtivo, foram avaliados os parâmetros de ganho em peso (g) [(peso final) – (peso inicial)]; conversão alimentar [(consumo de ração) / (ganho de peso)]; sobrevivência (%) [(número de animais final ÷ número de animais inicial) × 100]; índice hepatossomático [(peso do fígado/peso final) × 100]; taxa de eficiência proteica [ganho de peso/ (consumo de ração × % da proteína da dieta) × 100].

Análises hematológicas e bioquímicas

Para as análises hematológicas, três peixes de cada unidade experimental foram capturados, o sangue foi coletado por punção do vaso caudal, com seringas e agulhas contendo EDTA 10%, posteriormente com o sangue total realizou-se a contagem total de eritrócitos com utilização da câmara de Neubauer, taxa de hemoglobina, realizada por meio da metodologia descrita por Collier (1944), percentual de hematócrito seguindo a metodologia de Goldenfarb et al. (1971), e os índices hematimétricos como volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média, de acordo com Wintrobe (1934): Volume corpuscular médio (fL) = [(hematócrito × 10)]/eritrócitos; hemoglobina corpuscular média (pg) = [(hemoglobina × 10)]/eritrócitos e concentração de hemoglobina corpuscular média (gdL⁻¹) = [(hemoglobina × 100)]/ hematócrito.

As primeiras gotas de sangue foram utilizadas para confecção de extensões sanguíneas em lâminas de vidro com extremidades foscas, coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 100x, utilizando óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos foram realizadas pelo método indireto (Ranzani-Paiva et al., 2013): Leucócitos totais (μL) = [(número de leucócitos contados na extensão × número de eritrócitos em câmara de Neubauer) /2000]; e Trombócitos totais (μL) = [(número de trombócitos contados na extensão × número de eritrócitos em câmara de Neubauer) / 2000].

A contagem do diferencial de leucócitos consistiu em determinar a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão 100 vezes foram contados 200 leucócitos. A contagem foi feita no corpo da extensão, percorrendo-se todo o material, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem.

Para realização das análises bioquímicas, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. A determinação do colesterol total, triglicerídeos e glicose plasmática foram realizadas com uso de Kits específicos (Gold Analisa Diagnóstica,[®] Belo Horizonte-MG, Brasil) e procedidas conforme instruções do fabricante, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro.

Morfometria da fibra muscular

A análise morfológica e morfométrica do músculo branco das tilápias foi realizada no Laboratório de Histologia Animal do Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Para a avaliação do tecido muscular, foram capturados três peixes de cada unidade experimental e em seguida os animais foram submetidos à eutanásia. Posteriormente, com auxílio de uma lâmina de bisturi retirou-se uma amostra do músculo branco do lado direito do peixe, acima da linha lateral. As amostras foram fixadas imediatamente em formol tamponado em 10% por 24 horas. Após esse período, foram transferidas e conservadas em álcool 70% até o momento da realização das análises. As amostras foram desidratadas em séries ascendentes de álcool, diafanizadas em xilol, e em seguida incluídas em parafina histológica, posteriormente foram realizados os cortes dos blocos de parafina por meio do micrótomo (MICROM, International GmbH 69190, Walldorf, Alemanha).

Os cortes transversais (5 μm) foram obtidos e submetidos à coloração hematoxilina-eosina. As lâminas coradas foram observadas em Microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 (Manila, Filipinas) acoplado a uma câmera digital *Olympus* PMC 35B (Berlim, Alemanha) sendo as imagens capturadas digitalmente, utilizando objetiva de 40X. Para a morfometria, utilizou-se um sistema de análise de imagens *Image Pro-Plus* versão 4.5, e foi determinado o menor diâmetro de 200 fibras musculares, por animal, que foram agrupadas em classes de diâmetros (< 20 μm , 20-50 μm e > 50 μm) para avaliar a contribuição da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular (Almeida et al. 2008).

Expressão gênica

As análises da expressão dos genes foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural, Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR.

Foram coletados fragmentos da musculatura branca dorsal dos mesmos peixes utilizados para análise de fibra muscular. As amostras foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer – 80 °C até o processamento. A expressão dos genes da MyoD, miogenina e miostatina foram realizadas por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR), seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR

Experiment (Bustin, 2009). O RNA total das amostras congeladas foi extraído com TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies), seguindo-se o protocolo do fabricante.

Para verificar a integridade do RNA obtido, 1 µL de solução de RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração de RNA, em ng/µL, foi determinada através de espectrofotômetro a 260 nm de absorvância. A pureza do RNA foi confirmada pela obtenção da razão entre as absorvâncias 260/280 nm igual a 2. Para eliminar os resíduos de DNA genômico contaminante, as amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com a enzima DNase, conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies). Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante, e o DNA complementar (cDNA) resultante foi armazenado em freezer a -20°C e utilizado nas reações de RT-qPCR. Os níveis de expressão dos genes alvo MyoD e miogenina foram detectados por 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 18S ribossomal DNA (*18SrDNA*).

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando-se o Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. Um conjunto de primers senso e antisenso, 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 1: GU246722.1; miogenina: GU246725.1, 18S ribossomal DNA (*18SrDNA*) (Tabela 3). Todos os conjuntos de primers foram sintetizados pela s.

As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, utilizando-se as condições de termociclagem: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao término de cada reação, a amplificação específica de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo Método do CT, após sua validação, e foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 3. Primers utilizados para amplificação da MyoD, Miogenina, Miostatina e 18S ribossomal DNA (18SrDNA) por PCR em tempo real

| Gene | GenBank | Sequência do Primer (5'-3') |
|--------------------------------------|----------|--|
| Myogenic Factor (<i>MyoD</i>) | GU246722 | Forward: CCACCTGTCAGACAACCAGA Reverse: ACTGCGTTCGCTCTTCAGAC |
| Myogenin | GU246725 | Forward: CTCAACCAGCAGGACACTGA Reverse: ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT |
| Myostatin 1 | FJ972683 | Forward: TCCACATGACCCTGCAGAC Reverse: TGCACCACACATACTCCTCATC |
| 18S ribosomal DNA (<i>18SrDNA</i>) | JF698683 | Forward: GACACGGAAAGGATTGACAG Reverse: GTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC |

Análise proximal

Para as análises centesimais, no início do experimento, 20 peixes foram eutanasiados e ao final dez peixes de cada unidade experimental foram utilizados. A composição corporal dos animais seguiu o protocolo preconizado pela AOAC (2005) para análises de umidade (pré secagem a 55°C por 72 horas seguida de secagem a 105°C por oito horas), proteínas (método de Kjeldhal; Modle MA-036, Piracicaba-SP, Brasil), extrato etéreo (extrator de Soxhlet com éter como solvente; Model TE-0,44, Piracicaba-SP, Brasil), e matéria mineral (calcinação das amostras a 550°C por 6 horas; Modle 2000B, Belo Horizonte-MG, Brasil). As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos do Grupo de Estudo e Manejo na Aquicultura – GEMAQ, UNIOESTE-Toledo, Paraná.

Delineamento e análise estatística

Foi utilizado um modelo inteiramente casualizado com seis níveis e três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando foram observadas diferenças significativas, aplicou-se teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5% de significância. Para verificação dos dados das fibras musculares foi aplicada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis complementada com o teste de comparação múltipla de Dunn. A exigência de histidina foi estimada com base na análise de regressão de segunda ordem com base no ganho em peso. As análises foram efetuadas por meio do programa computacional *Statistic 7.1* (Statsoft, 2005).

Resultados

Desempenho produtivo e composição proximal

O desempenho produtivo dos alevinos de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de histidina estão apresentados na Tabela 4. Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para as variáveis: peso final, ganho em peso, conversão alimentar e

taxa de eficiência proteica. Contudo, o consumo das dietas contendo histidina não influenciou ($P>0,05$) os parâmetros de sobrevivência, índice hepatossomático e gordura visceral.

O peso final e o ganho em peso foram maiores ($P<0,05$) nos peixes que receberam a dieta contendo $8,9 \text{ g kg}^{-1}$ de inclusão de histidina, porém, não diferindo estatisticamente dos tratamentos com $5,4$ e $9,8 \text{ g kg}^{-1}$ de inclusão de histidina. Os peixes alimentados com a dieta em que não foi suplementada a histidina apresentaram crescimento inferior, demonstrando que a histidina não estava presente em quantidade adequada na dieta e sua deficiência resultou em menor crescimento dos peixes. A dieta suplementada com $8,9 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina, proporcionou melhor conversão alimentar e maior eficiência na utilização da proteína dietética.

Tabela 4. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina

| Variáveis | Níveis de histidina (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|-----------------------------|--|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------|
| | 4,2 | 5,4 | 7,1 | 8,9 | 9,8 | 11,5 | |
| Peso inicial (g) | 4,81±0,05 | 4,83±0,03 | 4,87±0,04 | 4,89±0,01 | 4,79±0,07 | 4,84±0,04 | 0,6382 |
| Peso final (g) | 39,68±3,92 ^d | 48,12±3,38 ^{ab} | 47,26±4,21 ^b | 50,23±3,10 ^a | 48,35±4,02 ^{ab} | 43,79±3,62 ^c | <0,0001 |
| Ganho em peso (g) | 34,87±4,54 ^d | 43,29±3,97 ^{ab} | 42,39±4,28 ^b | 45,34±3,87 ^a | 43,56±4,86 ^{ab} | 38,95±5,32 ^c | <0,0001 |
| Conversão alimentar | 1,37±0,01 ^a | 1,33±0,03 ^{ab} | 1,37±0,01 ^a | 1,14±0,01 ^c | 1,28±0,02 ^b | 1,38±0,01 ^a | <0,0001 |
| Taxa de eficiência proteica | 2,63±0,02 ^c | 2,71±0,06 ^{bc} | 2,63±0,02 ^c | 3,17±0,03 ^a | 2,84±0,03 ^b | 2,63±0,00 ^c | <0,0001 |
| Sobrevivência (%) | 83,3±6,6 | 91,2±3,3 | 92,2±1,92 | 93,3±1,92 | 95,5±5,0 | 95,5±1,9 | 0,3932 |
| Índice hepatossomático (%) | 2,42±0,56 | 2,27±0,26 | 2,56±0,12 | 2,40±0,10 | 2,50±0,15 | 2,32±0,05 | 0,9716 |
| Gordura visceral (%) | 3,11±0,14 | 3,29±0,78 | 3,70±0,19 | 3,10±0,16 | 3,28±0,18 | 3,49±0,26 | 0,8395 |
| | Equações | | | | | | P |
| Peso final | Y= -0,6188x ² + 10,14489x + 8,564; R ² = 0,90: His = 8,1 g kg ⁻¹ | | | | | | 0,01734 |
| Ganho em peso | Y= -0,616092x ² + 10,10051x + 3,8844; R ² = 0,90: His = 8,1 g kg ⁻¹ | | | | | | 0,01847 |
| Conversão alimentar | Y= 9,2811x ² - 154,515x + 1,8958; R ² = 0,60: His = 8,3 g kg ⁻¹ | | | | | | 0,01839 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de três repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Com base no peso final e ganho em peso, foram estimadas as exigências de histidina para alevinos de tilápia do Nilo. A partir do ajuste dos dados ao modelo de regressão polinomial de segundo grau, a exigência de histidina para o ganho em peso foi estimada em $8,1 \text{ g kg}^{-1}$, correspondente a 3,05% da proteína bruta da dieta (Figura 1). Verificou-se efeito similar para a conversão alimentar, estimando-se o valor de $8,3 \text{ g kg}^{-1}$ histidina, correspondente a 3,13% da proteína bruta da dieta. Contudo, o aumento adicional de $11,5 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina na dieta reduziu o crescimento, piorou a conversão alimentar e reduziu a retenção corporal de proteína.

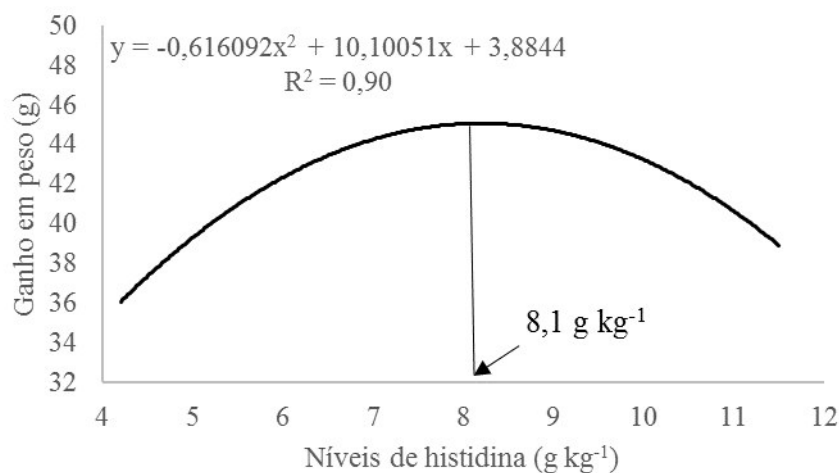


Figura 1. Ganho em peso de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina.

Os níveis de histidina não influenciaram ($P > 0,05$) os parâmetros de composição corporal de umidade e extrato etéreo. Contudo, o teor corporal de proteína bruta foi maior ($P < 0,05$) para os peixes que receberam as dietas contendo $7,1$ e $9,8 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina, em comparação aos peixes alimentados com a dieta contendo $11,5 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina. Os peixes que receberam as dietas $5,4$, $9,8$ e $11,5 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina apresentaram o menor teor corporal de matéria mineral em comparação com os peixes que receberam a dieta com $4,2 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Composição corporal de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina

| Variáveis | Níveis de histidina (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|-----------------|---|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| | 4,2 | 5,4 | 7,1 | 8,9 | 9,8 | 11,5 | |
| Umidade | 67,74±1,0 | 67,46±1,89 | 66,05±1,46 | 65,58±0,99 | 66,15±0,87 | 66,72±1,28 | 0,2286 |
| Proteína bruta | 15,23±0,26 ^{ab} | 15,28±0,55 ^{ab} | 16,50±0,40 ^a | 15,17±0,42 ^{ab} | 15,48±0,27 ^a | 13,98±0,86 ^b | 0,0021 |
| Extrato etéreo | 15,23±0,18 | 15,28±1,88 | 16,50±0,96 | 15,17±0,15 | 15,48±0,62 | 13,98±0,28 | 0,0861 |
| Matéria mineral | 4,46±0,10 ^a | 3,62±0,14 ^b | 4,35±0,20 ^{ab} | 4,25±0,16 ^{ab} | 3,65±0,18 ^b | 3,69±0,73 ^b | 0,0069 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de três repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

Morfometria do músculo

Os níveis dietéticos de histidina influenciaram ($P < 0,05$) a frequência da ocorrência das fibras musculares brancas entre os tratamentos. Comparando os efeitos da histidina na frequência das fibras musculares entre os tratamentos, os peixes que receberam a dieta contendo $8,9 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina apresentaram menor ocorrência ($P < 0,05$) na frequência das fibras de $< 20 \mu\text{m}$ em comparação dos peixes alimentados com as dietas contendo $5,4$, $9,8$ e $11,5 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina. De forma similar, foi observada uma maior ocorrência ($P < 0,05$) na frequência das fibras musculares na classe de $> 50 \mu\text{m}$ de diâmetro nos peixes alimentados com a dieta suplementada com $7,1$ e $8,9 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina em comparação com os peixes que receberam a dieta com $5,4 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina (Figura 2).

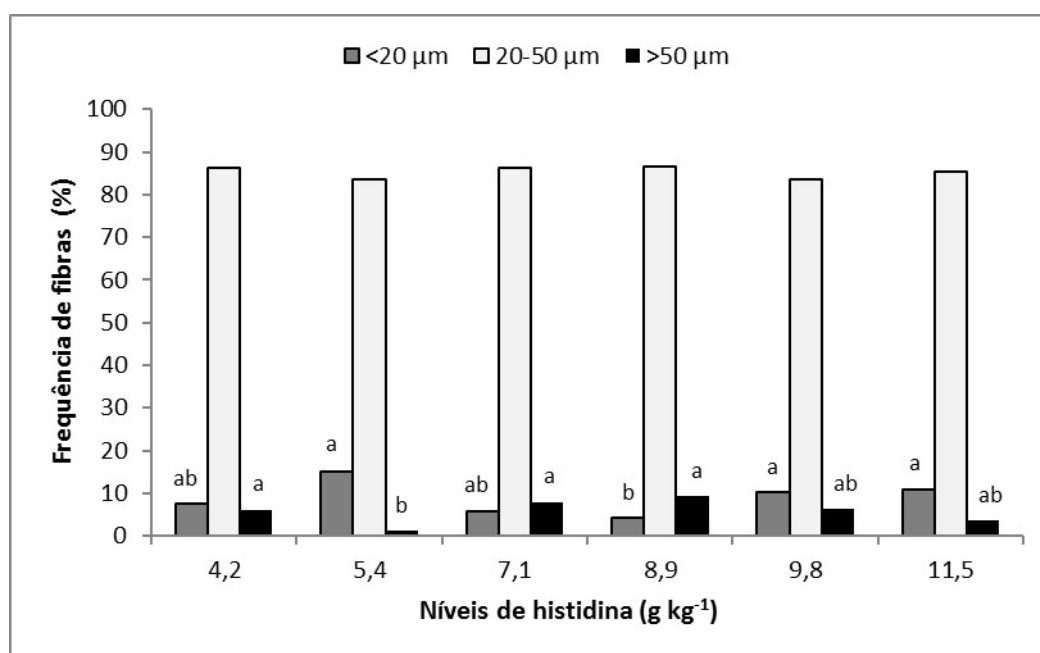


Figura 2. Frequência de distribuição das fibras musculares brancas de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina. Diferenças entre as letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

Expressão gênica da miogenina, MyoD e miostatina

A expressão dos níveis de mRNA da MyoD e miogenina foram influenciados ($P < 0,05$) pelos níveis de histidina no músculo branco (Figura 3). Contudo, a expressão dos níveis de mRNA da miostatina não foi influenciada ($P > 0,05$) com a suplementação de histidina na

dieta. A suplementação de $9,8 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina na dieta proporcionou uma maior expressão ($P < 0,05$) dos níveis de mRNA da MyoD, quando comparada com os tratamentos contendo 4,2, 5,4, 7,1, 8,9 e $11,5 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina. De forma similar, foi observada maior expressão ($P < 0,05$) nos níveis de mRNA da miogenina para os peixes que receberam as dietas contendo 9,8 e $11,5 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina, porém, não diferindo estatisticamente dos peixes que consumiram a dieta com $8,9 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina. A menor expressão dos níveis de mRNA da miogenina, foi observada nos peixes que consumiram as dietas com 4,2 a $7,1 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina.

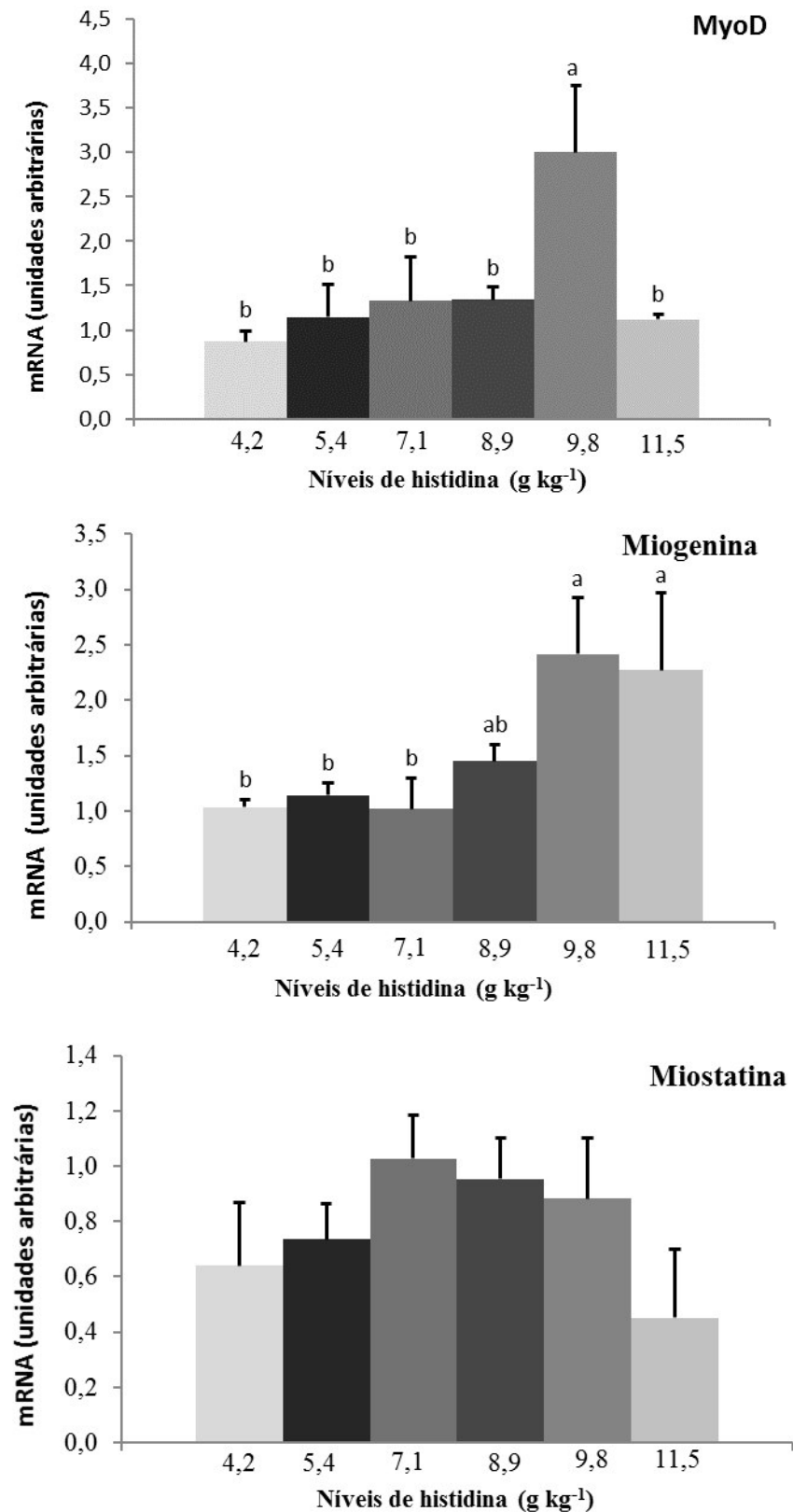


Figura 3. Quantificação da MyoD, miogenina e miostatina realizado no tecido muscular esquelético branco da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) detectados por RT-qPCR. Barras representam médias \pm Desvio padrão para cada tratamento (n=9) Letras distintas indicam diferença significativa a nível de (P>0,05) de significância pelo teste de Tukey.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para a contagem total de eritrócitos, taxa de hemoglobina, percentual de hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. De forma similar, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para os parâmetros bioquímicos de triglicerídeos, colesterol total e glicose plasmática dos alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina (Tabela 6).

Tabela 4. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina

| Variáveis | Níveis de histidina (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|---|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| | 4,2 | 6,0 | 6,5 | 8,9 | 9,8 | 11,5 | |
| Parâmetros hematológicos | | | | | | | |
| Eri (10 ⁶ µL ⁻¹) | 1,95±0,06 | 2,01±0,09 | 1,96±0,02 | 2,01±0,06 | 2,00±0,04 | 1,99±0,10 | 0,8844 |
| Hb (g dL ⁻¹) | 8,11±0,25 | 8,42±0,65 | 8,54±0,30 | 7,60±0,71 | 8,33±0,58 | 7,60±0,54 | 0,2284 |
| Htc (%) | 36,55±0,84 | 37,22±1,35 | 37,23±0,84 | 34,66±2,33 | 33,66±2,84 | 34,66±1,17 | 0,1762 |
| VCM (fL) | 187,51±6,30 | 186,0±7,32 | 189,26±3,19 | 172,93±13,34 | 167,99±12,76 | 174,93±10,93 | 0,119 |
| HCM (%) | 41,78±2,81 | 41,72±2,08 | 43,39±1,97 | 37,77±3,82 | 41,73±3,38 | 38,58±4,82 | 0,3512 |
| CHCM (g dL ⁻¹) | 22,21±0,79 | 22,68±1,90 | 22,95±1,20 | 22,15±3,42 | 24,96±2,22 | 22,21±2,08 | 0,6225 |
| Parâmetros bioquímicos | | | | | | | |
| TGL (mg dL ⁻¹) | 320,08±97,16 | 328,37±68,30 | 367,20±98,69 | 295,23±72,07 | 274,26±30,08 | 326,99±85,26 | 0,8600 |
| COL (mg dL ⁻¹) | 216,94±28,48 | 229,74±43,21 | 263,36±52,15 | 201,89±31,19 | 193,10±34,27 | 257,24±11,32 | 0,1459 |
| GLI (mg dL ⁻¹) | 92,84±11,66 | 94,57±16,64 | 94,04±12,44 | 97,93±16,70 | 97,15±13,49 | 97,44±9,43 | 0,3432 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P>0,05). Eri= eritrócitos totais; Hb= hemoglobina; HTC= Hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; TGL= Triglicerídeos; Col= Colesterol; Gli= Glicose plasmática.

Os peixes alimentados com as dietas contendo níveis crescentes de histidina não apresentaram alterações ($P>0,05$) para os valores de leucócitos e trombócitos totais. Os leucócitos oscilaram de 24147 a 30458 μL^{-1} , enquanto os trombócitos totais variaram de 22559 a 20233 μL^{-1} . Em relação ao diferencial de leucócitos, o maior percentual, foi observado para os linfócitos que oscilaram de 88,44 a 89,33%, seguido pelo percentual dos neutrófilos com variação de 8,44 a 9,55% e menor percentual de monócitos em torno de 1,77 a 2,88% (Tabela 7).

Tabela 5. Leucócitos totais, trombócitos totais, percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina

| Variáveis | Níveis de histidina (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|---------------------------|---|------------|---------------|---------------|---------------|------------|--------|
| | 4,2 | 6,0 | 6,5 | 8,9 | 9,8 | 11,5 | |
| Leuc (μL ⁻¹) | 28263±10318 | 30112±6272 | 26855±3976,49 | 30458±2974,78 | 26264±2418,94 | 24147±5543 | 0,2312 |
| Tromb (μL ⁻¹) | 20233±2940 | 22559±6597 | 20798±4263 | 26414±3588 | 21140±8631 | 22009±3995 | 0,3753 |
| Linf (%) | 89,22±1,47 | 88,88±2,02 | 89,33±1,73 | 88,55±1,81 | 88,44±2,12 | 88,77±2,16 | 0,7388 |
| Neut (%) | 8,44±1,34 | 8,44±1,74 | 8,88±0,92 | 9,55±0,88 | 8,66±3,31 | 8,77±1,39 | 0,1069 |
| Mon (%) | 2,33±0,94 | 2,66±0,5 | 1,77±1,20 | 1,88±1,16 | 2,88±1,89 | 2,44±1,13 | 0,4252 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P>0,05). Leuc = leucócitos totais; Tromb = trombócitos totais; Linf = linfócitos; Neu = neutrófilos; Mon = monócitos

Discussão

A determinação da exigência de aminoácidos é importante, pois essas moléculas são constituintes do organismo animal em todas as fases de desenvolvimento e são responsáveis pela formação de enzimas e hormônios (Wu, 2013), e ainda exercem importante papel estrutural, atuando no processo metabólico (NRC, 2011). A inclusão de concentrações adequadas de aminoácidos em dietas tem sido foco de muitos estudos na nutrição dos peixes, com intuito de diminuir o custo de produção e maximizar o desempenho produtivo.

Neste estudo, a inclusão de 8,9 g kg⁻¹ de histidina na dieta resultou em maior peso final e ganho em peso. De forma similar, uma melhor conversão alimentar e taxa de eficiência proteica também foram obtidas com esse mesmo nível.

No entanto, por meio da análise de regressão polinomial de segundo grau, para o máximo peso final e ganho em peso dos peixes, foi estimada exigência de 8,1 g kg⁻¹ de histidina (3,05% da proteína bruta da dieta). A melhor resposta de conversão alimentar também foi descrita por meio da regressão polinomial de segundo grau, em que foi estimada exigência de 8,3 g kg⁻¹ histidina, correspondente a 3,13% da proteína bruta da dieta. O manejo alimentar foi realizado de forma cuidadosa garantindo perda de ração muito baixa, mesmo sendo a alimentação praticada até a saciedade aparente, proporcionando resultados satisfatórios de conversão alimentar.

As informações a respeito das exigências nutricionais de histidina para tilápia do Nilo são escassas. Ainda que esse aminoácido apresente diversas funções metabólicas e seja um aminoácido essencial e potencialmente limitante, até o momento apenas um estudo foi conduzido com o objetivo de determinar suas exigências para tilápias do Nilo e foi conduzido por Santiago e Lovell (1988). Os autores, em contraste com o este estudo, encontraram valores inferiores de exigência em histidina, sendo 4,8g kg⁻¹, correspondente a 1,72% de proteína bruta da dieta para larvas de tilápia do Nilo por meio de utilização de dieta purificada. De acordo com Griffin et al. (1992), as dietas purificadas têm reconhecidamente menor aceitabilidade pelos peixes em comparação as dietas práticas, o que ocasiona menor ganho em peso. A exigência de histidina estimada no presente estudo, para o máximo ganho em peso (8,1 g kg⁻¹ de histidina; 3,05% da proteína bruta da dieta), é superior às exigências encontradas por Mukthar e Khan (2004), que ao avaliarem níveis de histidina em dietas de alevinos de *Labeo rohita*,

estimaram a exigência em 9,0 g kg⁻¹ de histidina (2,25% da proteína bruta da dieta). Da mesma forma, Zhao et al. (2012) determinaram a exigência de 7,8g kg⁻¹ de histidina (2,38% da proteína bruta da dieta) para juvenis de *C. carpio* para melhor crescimento e atividade de enzimas intestinais. Avaliando níveis de histidina para alevinos de *C. mrigala*, Ahmed e Khan (2005) determinaram exigência de 8,5g kg⁻¹ de histidina (2,12% da proteína bruta da dieta) para máximo ganho em peso. Enquanto Khan e Abidi (2009) sugeriram 4,0 a 4,2 g kg⁻¹ de histidina (1,0 a 1,05 da proteína bruta da dieta) para melhor crescimento e retenção de nutrientes, para alevinos de *C. gariepinus*. Já Akyama et al. (1985) estimaram a exigência de 7,0 g kg⁻¹ histidina (1,6% da proteína bruta da dieta) para alevinos de *Oncorhynchus keta*. Por outro lado, Khan e Abidi (2014) conduziram estudo com alevinos de *H. fossilis* e observaram máximo ganho em peso e melhora na hematopoiese em peixes que receberam dietas com 15,1 a 15,6 g kg⁻¹ de histidina (3,5 e 3,6 da proteína bruta da dieta), sendo superiores ao valor estimado para máximo ganho de peso dos peixes deste estudo.

A exigência nutricional dos peixes é influenciada por diversos fatores, entre eles o estado fisiológico, as condições ambientais, a densidade de estocagem, o tamanho e a idade dos animais (Wilson, 2002). As variações observadas na literatura em relação à exigência de histidina entre as espécies de peixes podem ser devidas às diferenças na composição e valor nutritivo das fontes proteicas das dietas, condições de cultivo (Benakappa e Varghese, 2003) e também ao modelo matemático aplicado para estimar as exigências (Abidi e Khan, 2004).

O menor ganho em peso relacionado com o consumo de histidina acima ou abaixo da exigência também foi relatado por diversos autores (Ahmed e Khan, 2005; Zhao et al., 2012; Farhat e Khan, 2013; Khan e Abidi, 2014). A deficiência de um único aminoácido essencial pode reduzir a síntese proteica, assim como o excesso de um único aminoácido pode causar desequilíbrio e consequente aumento no catabolismo dos aminoácidos dietéticos, causando redução na utilização da proteína, e consequentemente comprometendo o ganho em peso dos peixes (Coloso et al., 1999). O excesso de aminoácido na ração, além de suprir as necessidades da síntese proteica, é degradado e o nitrogênio obtido é excretado em maior parte pelas lamelas branquiais, sendo que o esqueleto de carbono pode ser usado para síntese da glicose, podendo ser convertido em gordura ou água, causando um aumento no metabolismo energético (Scott et al., 1982).

Neste estudo, os níveis crescentes de histidina não influenciaram o índice hepatossomático e gordura visceral dos peixes. Resultados distintos foram observados por Zehra e Khan, (2014) e Farhat e Khan, (2013), que relataram efeitos da histidina sobre o índice hepatossomático e índice viscerossomático em alevinos de *C. catla* e *H. fossilis*, respectivamente. O índice hepatossomático e a gordura visceral são frequentemente utilizados como indicadores da condição do estado nutricional dos peixes. Assim, alterações no estado nutricional bem como processos infecciosos, dentre outros, podem modificar o índice hepatossomático dos animais (Quintana, 2010).

Os níveis de histidina avaliados no presente estudo influenciaram ($P < 0,005$) o teor de proteína bruta corporal dos peixes. Resultados similares foram obtidos por Farhat e Khan (2013) na composição corporal de *H. fossilis*, bem como por Zehra e Khan (2014), para *C. Catla*, e por Khan e Abidi (2014) para *H. fossilis*, que observaram que a inclusão de histidina na dieta resultou em aumento na proteína corporal dos animais. Neste estudo, a suplementação de histidina na dieta pode ter otimizado a proteína corporal, por meio de uma melhor utilização dos aminoácidos para síntese proteica.

A presença de fibras com diâmetros menores que 20 μm indicam ocorrência do processo de hiperplasia, enquanto que fibras maiores que 50 μm estão relacionadas com o processo de hipertrofia no músculo esquelético dos peixes (Valente et al., 1999; Rowleron e Veggetti, 2001). Conduzindo estudos com juvenis e alevinos de *Piaractus mesopotamicus*, Almeida et al. (2008) observaram aumento na frequência de distribuição das fibras musculares menores que 20 μm de diâmetro em juvenis quando comparados com adultos, enquanto que a frequência de distribuição de fibras musculares maiores que 50 μm foram mais elevadas em adultos. No presente estudo, a frequência de distribuição de fibras entre 20 - 50 μm de diâmetro foi semelhante em todos os tratamentos, sugerindo que o crescimento muscular, nessa fase, ocorreu por meio dos processos de hipertrofia e hiperplasia. O processo do crescimento muscular por hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares é um mecanismo regulado por vários fatores, incluindo os de regulação miogênica (MRFs), entre os quais estão a MyoD e a miogenina (Watabe, 2001). A MyoD é considerada um fator de transcrição importante na formação da linhagem muscular, além disso, atua regulando positivamente a transcrição gênica da miostatina durante o processo de maturação do miócito (Bradley; Yaworsky; Walsh, 2008).

Estudos relacionando a interação da nutrição com a expressão gênica estão cada vez mais comuns na produção animal, no entanto, essa é a primeira pesquisa avaliando o efeito da histidina sobre a expressão gênica no músculo de tilápias do Nilo. Neste estudo, a expressão da MyoD e da miogenina foram mais elevadas nos peixes que receberam a dieta contendo 9,8 g kg⁻¹ em comparação com os animais alimentados com a dieta contendo 5,4 g kg⁻¹ de histidina, indicando uma elevada taxa de proliferação celular e diferenciação de células satélites relacionadas com o processo de hiperplásico e hipertrófico durante o crescimento muscular (Levesque et al., 2007).

Os níveis de mRNA da miostatina foram menores em todos os tratamentos em comparação com os níveis mRNA da MyoD e miogenina, não sendo observadas diferenças significativas nos níveis de mRNA da miostatina entre os tratamentos. Dessa forma, sugere-se que a adequada suplementação de histidina inibiu a expressão da miostatina, melhorando assim o desempenho produtivo dos peixes durante o período experimental.

A miostatina desempenha papel de forma negativa na regulação da miogênese, pois silencia a ativação dos fatores de transcrição (Langley et al., 2002). Nebo et al. (2013), avaliando a expressão de genes relacionados ao crescimento muscular durante a restrição alimentar e realimentação em juvenis de tilápia do Nilo, observaram um aumento na expressão da miostatina, após um curto período de jejum. Após a realimentação, os níveis da miostatina diminuíram, enquanto que um aumento na expressão da MyoD foi observado, sendo possível inferir que em condições normais de alimentação a expressão da miostatina permanece baixa.

De forma similar a este estudo, outras pesquisas foram conduzidas com intuito de avaliar a expressão dos MRFs em peixes em resposta aos fatores nutricionais. Nesse sentido, Campos et al. (2010) testaram níveis crescentes de lipídeos na dieta para linguados (*Solea senegalensis* Kaup) e demonstraram que os peixes que receberam a dieta com o maior nível de lipídeos apresentaram a menor expressão gênica dos MRFs como a MyoD, MRF4 e miogenina, quando comparados aos animais que receberam a menor porcentagem de lipídeos na dieta. Testando duas dietas com diferentes fontes de vegetais e aminoácidos para juvenis de truta arco-íris, Alami-Durante et al. (2010) observaram maior expressão do MyoD no músculo branco nos peixes que receberam a dieta controle. Contudo, a expressão da MyoD no músculo vermelho não apresentou alterações nos animais que receberam ambas as dietas. Isso demonstrou que as

diferentes fontes de aminoácidos fornecidas na dieta podem influenciar na expressão de genes músculo específicos.

O estudo dos componentes sanguíneos e as suas funções são de grande importância para o conhecimento das condições do equilíbrio basal e patológicas nos animais, auxiliando na determinação de situações que possam afetar a homeostase, influenciadas tanto pelas dietas, quanto por enfermidades e outras situações de estresse ambiental, colaborando com possíveis diagnósticos de condições adversas (Tavares-Dias et al., 1999; Tavares-Dias e Moraes, 2004; Tavares-Dias e Moraes, 2007). As informações sobre a influência da histidina sobre os parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo ainda são escassas na literatura. No presente estudo, os níveis de histidina avaliados não afetaram na eritropoiese dos peixes e os valores mantiveram-se dentro do intervalo de referência estabelecido para a espécie (Hrubec e Smith, 2010; Hrubec, 2000), e ao obtido para tilápias híbridas em condições experimentais (Araújo et al. 2011; Jerônimo et al. 2011).

Han et al. (2013) testaram a combinação dos aminoácidos arginina e histidina na dieta de juvenis de *P. olivaceus* e não observaram diferenças nos parâmetros da série vermelha do sangue. Por outro lado, Farhat e Khan (2013) verificaram que o incremento de histidina na dieta de alevinos de *H. fossilis* resultou em aumento na contagem total de eritrócitos, taxa de hemoglobina e percentual de hematócrito, até o nível de $9,4 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina na dieta (2,48% da proteína bruta da dieta), não apresentando melhoras a partir deste nível. Da mesma forma, Zehra e Khan (2014) observaram melhoras no perfil hematológico de alevinos de *C. Catla* e estimaram exigência de 6,3 a $6,8 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina (1,91 a 2,06% de histidina da proteína bruta na dieta), como o ideal para uma melhor eritropoiese. Neste estudo, os níveis de histidina testados não influenciaram a eritropoiese, mantendo-se semelhante nos peixes de todos os tratamentos.

Os valores médios dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) são empregados para determinar e classificar os quadros anêmicos, uma condição em que é reduzida a capacidade do sangue em transportar o oxigênio. De uma forma geral, as anemias são caracterizadas pela diminuição do número de eritrócitos, juntamente com a taxa de hemoglobina e percentual de hematócrito (Ranzani-Paiva et al., 2013). No presente estudo, os índices hematimétricos não foram alterados pelo conteúdo de histidina da dieta. Tais índices estão dentro da amplitude de variação e são considerados normais para peixes teleósteos, como descrito por Tavares-Dias e Moraes (2004).

A composição bioquímica do plasma e soro sanguíneo auxiliam na avaliação da situação metabólica dos tecidos animais. Por meio delas é possível detectar alterações no funcionamento dos órgãos e a adaptação do animal diante dos desafios nutricionais, fisiológicos e desequilíbrios metabólicos, (González e Silva 2006). No presente estudo, as variáveis bioquímicas das tilápias alimentadas com níveis crescentes de histidina não foram influenciadas pelo nível dietético de histidina na dieta. A concentração de triglicérides observadas nesse estudo variou de 274,26 a 367,20 mg dL⁻¹, enquanto que o colesterol total variou de 193,10 a 263,36 mg dL⁻¹, sendo esses valores considerados normais para a tilápia do Nilo (Hrubec et al., 2000).

A glicose pode ser utilizada para indicar um quadro de estresse nos peixes, sendo que os seus níveis plasmáticos variam de acordo com o tipo e a duração do estresse e estão relacionados à alteração de temperatura, manejo e transporte (Martins et al., 2004; Urbinati et al., 2004). No presente estudo, os valores médios de glicose mantiveram-se dentro da faixa considerada normal para a tilápia (Hrubec, 2000), apresentando variações de 92,84 a 97,93 mg dL⁻¹, resultados esses já esperados, pois os peixes não foram submetidos a nenhum desafio e o manejo dos animais foi realizado de forma a não induzir qualquer quadro de estresse.

Os leucócitos são células que atuam no sistema de defesa do organismo animal, utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou lesões teciduais (Tavares-Dias e Moraes, 2003). São diferenciados morfologicamente pela presença ou ausência de granulações, assim como pelas suas características morfológicas e tintoriais (Satake et al., 2009). Já os trombócitos são células análogas às plaquetas dos mamíferos e atuam na coagulação sanguínea. No presente estudo, as células da série branca do sangue das tilápias do Nilo e os trombócitos totais não foram influenciadas pelos diferentes níveis de histidina na dieta. Os valores dos leucócitos totais oscilaram entre 24147 a 30458 μL^{-1} e os trombócitos totais variaram entre 22559 a 20233 μL^{-1} . De acordo com a literatura, as médias de leucócitos totais para tilápias sadias variam de 21600 a 154700 μL^{-1} no sangue (Hrubec et al., 2000). Da mesma forma, o número de trombócitos totais permaneceu dentro da faixa considerada normal para peixes hígidos. O número médio de trombócitos em teleosteos de água doce pode variar de 2.000 a 68.400 μL^{-1} no sangue (Tavares-Dias e Moraes, 2004)

Os tipos celulares de leucócitos circulantes mais abundantes encontrados neste trabalho foram os linfócitos, sendo essas células as mais numerosas na circulação sanguínea em diversas espécies de teleosteos (Ranzani & Paiva e Silva & Souza 2004),

incluindo a tilápia. Estes resultados corroboram os encontrados por Ugwem et al., 2011; Ighwela et al., 2012; Barros et al., 2014 em condições experimentais para a tilápia do Nilo. A imunidade inata, que corresponde à primeira linha de defesa, é composta por neutrófilos e macrófagos (Tizard, 2002). Quando ocorre invasão por patógenos no organismo dos animais, as células que aparecem em maior porcentagem são os neutrófilos, pois estes atuam no combate das infecções, portanto a caracterização e a identificação deste parâmetro são importantes na avaliação das alterações do estado fisiológico dos peixes (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Deste modo, pode-se inferir que os peixes permaneceram saudáveis e que a adição de histidina na dieta não causou alterações no diferencial de leucócitos. Além disso, o percentual de linfócitos mais elevado entre todos os tratamentos refletiu o estado de saúde entre os animais.

Os resultados desse estudo demonstraram que os níveis de histidina dietéticos podem influenciar o ganho em peso, a conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, expressão dos genes MyoD, miogenina e a frequência de distribuição das fibras musculares de tilápias do Nilo nessa fase de estudo. A partir do ajuste dos dados ao modelo de regressão polinomial de segundo grau, a exigência de histidina foi estimada em $8,1\text{g kg}^{-1}$, correspondente a 3,05% da proteína bruta da dieta.

Referências bibliográficas

- Abe H., Ohmama, S., 1987., Effect of starvation and seawater acclimation on the concentration of free L-histidine and related dipeptides in the muscle of eel, rainbow trout and Japanese dace. *Comp. Biochem. Physiol.* 88, 507-511.
- Abidi, S.F., Khan, M.A., 2004. Dietary histidine requirement of fingerling indian Major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *ISR J Aquacult Bamid.* 56, 200-208.
- Ahmed, I., Khan, M., 2005., Dietary histidine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aqua Nutr.* 11, 359-366.
- Akiyama, T., Arai, S., Murai, T., 1985., Threonine, histidine and lysine requirements of chum salmon fry. *B. Jnp. Soc. Sci. Fish.* 51, 635-639.
- 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. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 156, 561-568.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae,

Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron* 39, 1306-1311.

- Almeida, F.L.A.; Pessotti, N.S.; Pinhal D.; Padovani, C.R.; Leitão, N.J.; Carvalho, R.F.; Martins, C.; Portella, M.C.; Dal Pai-Silva, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*, 41, 997-1004, 2010.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th. ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- Araújo, D.M., A.C. Pezzato., M.M. Barros., L.E. Pezzato., Nakagome, F.K., 2011. Hematologia de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. *Pesqui. Agropec. Bras.* 46, 294-302.
- Barros, M.M., Falcon, D.R., Orsi, R.O., Pezzato, L.E., Fernandes-Jr., A.C., Guimarães, I.G., Fernandes-Jr., A., Padovani, C.R., Sartori, M.M., 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 188-195.
- Benakappa, S., Varghese, T.J., 2003. Isoleucine, leucine, and valine requirement of juvenile Indian major carp, *Cirrhinus cirrhosus* (Bloch, 1795). *Acta Ichthyol. Pisc.* 33, 161-172.
- Bradley, L., Yaworsky, P.J., Walsh, F.S., 2008. Myostatin as a therapeutic target for musculoskeletal disease. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65, 2119-2124.
- Brown, M.L., Nematipour, G.R., Gatlin, D.M., 1992. Dietary protein requirements of Sunshine bass at different salinities. *Progressive Fish Culturist* 54, 148-156.
- Campos, C., Valente, L.M.P., Borges, P., Bizuayehu, T., Fernandes, J.M.O., 2010. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegale sole (*Solea senegalensis* Kaup). *J. Exp. Biol.* 213, 200-209.
- Collier, H.B., 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.* 50, 550-552.
- Coloso R.M., Murillo-Gurrea D.P., Borlongan I.G., Catacutan M.R., 1999. Sulphur amino acid requirement of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 54-58.
- Farhat, Khan, M.A., 2013. Effects of varying levels of dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition in fingerlings stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture* 404-405, 130-138.
- Furuya, W.M., 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. GFM, Toledo, Paraná.

- Furuya, W.M., Fujii, K.M., dos Santos, L.D., Silva, T.S.de C., da Silva, L.C.R., Sales, P.J.P., 2008. Exigência de fósforo disponível para juvenis de tilápia-do-nilo. R. Bras. Zootec. 37, 1517-1522.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosius, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. Am. J. Clin. Path. 56, 35-39.
- Gomes, L.C., ChipparI-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Roubach, R., Araujo-Lima, C.A.R. M., 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. J. World Aquacult. Soc. 32, 426-431.
- Gonçalves, F.M., Corrêa, M.N., Anciuti, M.A., Gentilini, F.P., Zanusso, J.T., Rutz, Fernando., 2009. Artigo de Revisão. Nutrigenômica: situação e perspectivas na alimentação animal. Rev. Port. Cienc. Vet. 104, 569-572.
- González, F.H.D., Silva, S.C., 2006. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Griffin, M.E.; Brown, P.B., Grant, A.L. 1992. The dietary lysine requirement of juvenile hybrid striped bass. J. Nutr. 22, 1332-1337.
- Han, Y., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., 2013. Interactive effects of dietary arginine and histidine on the performances of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. Aquaculture, 414-415, 173-182.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Haematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet. Clin. Patol. 29, 7-12.
- Hrubec, T.C.; Smith, S., 2010. Hematology of fishes, in: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Ed). Schalm's veterinary hematology. USA: Wiley-Blackwell, pp 994-1003.
- Ighwela, K.A., Ahmad, A.B., Abol-Munaf, A.B., 2012. Haematological Changes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed with Varying Dietary Maltose Levels. j. fish. mar. sci. 4, 376-381.
- Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M., Martins, M.L., 2011. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. Braz. J. Biol. 3, 719-725.
- Johnston, I.A., 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. J. Exp. Biol. 209, 2249-2264.
- Jones, A. L., Hulett, M. D., Parish, C. R., 2005. Histidine-rich glycoproteins: a novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. Immunol. Cell. Bio, Adelaide, 83, 106- 118.
- Khan M.A., Abidi S.F., 2009. Dietary histidine requirement of fry African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). Aqua. Res. 40, 1000-1010.
- Khan, F.M.A., 2013. Effects of varying levels of dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition

- in fingerling stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture*, 404-405, 130-138.
- Khan, M.A., Abidi, S.F., 2014. Dietary histidine requirement of Singhi, *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch). *Aqua. Res.* v.45, p. 1341-1354.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., e Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49831-40.
- Levesque, H.M., Shears, M.A., Fletcher, G.L., Moon, T.W., 2007. Myogenesis and muscle metabolism in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) made transgenic for growth hormone. *J. Exp. Biol.* 211, 128–137.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Martins, M. L., Pilarsky, F., Onaka, E.M., Nomura, D.T., Fenerick JR., J., Ribeiro, K., Myiazaki, D.M.Y., Castro, M.P., Malheiros, E.B. 2004. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca.* 30, 71-80.
- National Research Council – NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Nebo, C., Portella, M.C., Carani, F.R., Almeida, F.L.A., Padovani, C.R., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2013. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 164, 268–274.
- Pezzato, L.E., Barros, M.M., Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P., 2004. Nutrição de peixes. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: Tecart. Pp. 75-169.
- Ranzani-Paiva, M.J., Silva-Souza. A.T. 2004. Hematologia de peixes brasileiros. In: Ranzani-Paiva, M.J., Takemoto, R. M., Lizama, M.A.P. (Eds.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, pp. 89-120.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Benites de Pádua, S., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. *Eduem, Maringá, Paraná*.
- Rosenfeld, G., 1947. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, 20, 329-334.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: *Muscle Development and Growth*. (Johnston, I.A. ed.). pp. 103–139. Academic Press, London.

- Scott, M. L.; Nesheim, M. C.; Young, R. J. 1982. Nutrition of the chicken. 3. ed. Ithaca. 562 p.
- Santiago, B.C., Lovell, R.T. 1988. Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *J. Nutr.* 118, 1539-1546.
- Satake, F.; Pádua, S. B. de; Ishikawa, M. M., 2009. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, pp.330-345.
- Tavares-Dias M., Tenani, R.A., Gioli, L. D., Faustino, C.D., 1999. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.* 16, 423 – 431.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F. R., 2003. Características Hematológicas de Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *J. Biosci.* 19, 107- 114.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress.
- Tavares-Dias, M; Moraes, F. R., 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *J. Fish. Biol.* 71, 383–388.
- Tizard, I.R., 2002. Imunologia veterinária: uma introdução. 6. ed. São Paulo: Roca.
- Ugwem, G.U., Akinrotimi, O.A., Eseimokumo, F., 2011. Hematological responses of wild Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after acclimation to captivity. *Jordan j. biol. Sci.* 4, 225 – 230.
- Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S., Landines, M.A., 2004. Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*, 229, 389-400.
- Valente, L.M.P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., 1999. Growth dynamics of white and red Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press London, pp. 19-41.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55, 1–18.
- Wilson, R.P., 2002. Amino acids and proteins, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press. New York, pp. 143-179.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematol. Leipzig*, 51, 32-49.
- Wu, G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. 37, 1-17.

- Zehra, S., Khan, M.A., 2014. Dietary histidine requirement of fingerling *Catla Catla* (Hamilton) based on growth, protein gain, histidine gain, RNA/DNA ratio, haematological indices and carcass composition. *Aquac. Res.* 1-12.
- Zhao, B., Feng, L., Liu, Y., Kuang, S., Tang, L., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W.D., Li, S.H., Zhou, X.Q., 2012. Effects of dietary histidine levels on growth performance, body composition and intestinal enzymes activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquacul. Nutr.* 18, 220–232.

4.0 CAPÍTULO II

Exigência de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina, parâmetros hematológicos e crescimento muscular ²

Resumo: O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de níveis crescentes de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápias do Nilo com base no desempenho produtivo, morfometria das fibras musculares, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina e miostatina) e parâmetros hematológicos e bioquímicos. Foram utilizados 288 juvenis de tilápia do Nilo com peso médio inicial de 64,15 (\pm 0,49 g), distribuídos em 24 caixas de fibra de vidro com capacidade de 500 litros, em um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, por um período de 65 dias. Foram elaboradas seis dietas isoproteicas (267,3 g kg⁻¹ de proteína bruta) e isoenergéticas (4048 kcal kg⁻¹ energia bruta) contendo níveis crescente de inclusão de histidina digestível (3,50; 5,50; 7,50; 9,50; 11,50 e 13,50 g kg⁻¹ da matéria seca). Os peixes foram alimentados com dietas extrusadas, até a saciedade aparente. Os melhores resultados (P<0,05) de ganho em peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foram observados em peixes que receberam as dietas com 9,50 a 11,50 g kg⁻¹ de histidina digestível em comparação com os peixes que receberam dieta contendo 3,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. Com base no modelo de regressão polinomial de segunda ordem a exigência de histidina foi estimada em 10,0 g kg⁻¹ e não foi observado aumento no ganho em peso a partir desse nível de inclusão de histidina. A composição corporal e os parâmetros hematológicos e bioquímicos não foram influenciados (P>0,05) pelos diferentes níveis de histidina digestível na dieta. O crescimento muscular ocorreu por hiperplasia e hipertrofia entre todos os tratamentos. Os peixes que receberam dietas com 9,50 a 13,50 g kg⁻¹ de histidina digestível apresentaram maior expressão dos níveis de mRNA para o gene MyoD em comparação aos peixes que receberam a dieta contendo 3,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. A maior expressão dos níveis de mRNA para o gene miogenina foi observada nos peixes alimentados com a dieta contendo 9,50 a 11,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. No entanto, a maior expressão dos níveis de mRNA do gene miostatina foi observada nos peixes que receberam dietas contendo 3,5 a 9,5 g kg⁻¹ de histidina

² Manuscrito redigido de acordo com as normas da Aquaculture

digestível. Conclui-se que a exigência de histidina digestível para juvenis de tilápia do Nilo para o máximo ganho em peso foi estimada em 10,0 g kg⁻¹, correspondente a 3,7% da proteína da dieta.

Palavras-chave: Aminoácidos essenciais, expressão gênica, hiperplasia e hipertrofia.

Digestible histidine requirement in diets for Nile tilapia juveniles based on growth performance, expression of MyoD, myogenin and myostatin genes, hematological parameters, and muscle growth

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the effects of the increasing levels of digestible histidine supplementation in diets for Nile tilapia juveniles based on growth performance, muscle fibers morphometry, expression of muscle growth-related genes (MyoD, myogenin and myostatin), and hematological and biochemical parameters. Two hundred and eighty-eight Nile tilapia juveniles with initial average weight of 64.15 (\pm 0.49 g) were distributed in 24 fiberglass boxes with 500 liters capacity in a completely randomized design with six treatments and four replications, for a period of 65 days. Six isoproteic (267,3 g kg⁻¹ of crude protein) and isocaloric diets (4048 kcal kg⁻¹ of gross energy) were prepared containing increasing levels of digestible histidine inclusion (3.50; 5.50; 7.50; 9.50; 11.50 and 13.50 g kg⁻¹ of dry matter). The fish were fed with extruded diets, manually and at ease. The best results ($P < 0.05$) of weight gain, feed conversion and protein efficiency ratio were observed in the fish fed with diets containing 9.50 to 11.50 g kg⁻¹ of digestible histidine, compared to fish fed with the diet containing 3.50 g kg⁻¹ of digestible histidine. Based on the polynomial regression of the second order the histidine dietary requirement for maximum weight gain of tilapia juvenis was estimated at 10.0 g kg⁻¹, and there was no increase in weight gain from this level of inclusion of histidine. Body composition and hematological, biochemical parameters were not affected ($P > 0.05$) by the different levels of digestible histidine in the diet. Muscle growth occurred by hyperplasia and hypertrophy among all treatments. Fish fed diets containing 9.50 to 13.50 g kg⁻¹ of digestible histidine presented higher expression of mRNA levels for MyoD gene compared to fish fed diet containing 3.50 g kg⁻¹ of digestible histidine. The increased expression of mRNA levels for myogenin gene was observed in the fish fed the diet containing 9.50 to 11.50 g kg⁻¹ of digestible histidine. However, the highest expression of the myostatin gene mRNA levels was observed in the fish fed diets containing 3.5 to 9.5 g kg⁻¹ of digestible histidine. The conclusion is that the requirement of digestible histidine for a maximum

weight gain of Nile tilapia juveniles was estimated at 10.0 g kg⁻¹, corresponding to 3.7% of the diet crude protein.

Keywords: Essential amino acids, gene expression, hyperplasia and hypertrophy.

Introdução

A tilápia do Nilo é a segunda espécie de maior importância para aquicultura continental mundial. No Brasil, é a espécie mais cultivada, principalmente na piscicultura intensiva. Nesse sistema de cultivo, os peixes exigem dietas completas, uma vez que o alimento natural disponível no ambiente aquático não atende as suas exigências nutricionais.

Dentre os nutrientes, a proteína é o componente principal e também o mais oneroso na formulação de dietas para animais aquáticos (Wilson, 2002). É importante maximizar a eficiência de utilização da proteína dietética (Verstegen e Jongbloed, 2003). Portanto, os aminoácidos devem estar presentes em quantidades e proporções adequadas, de forma a evitar a presença de aminoácidos limitantes, antagonismos e toxidez.

A deficiência de um único aminoácido na dieta pode limitar a utilização da proteína pelos peixes. Além disso, a digestibilidade dos aminoácidos é bastante variável entre os ingredientes, sendo importante considerar a digestibilidade dos aminoácidos para formular dietas mais precisas (Furuya et al., 2001). Considerando que ainda são poucas as informações sobre as exigências de aminoácidos digestíveis para a tilápia do Nilo, é importante apresentar a exigência na forma de aminoácido digestível para permitir a adequada utilização da fração proteica da dieta e maximizar a síntese proteica pelos animais.

A histidina é considerada um aminoácido essencial e desempenha diversas funções biológicas e catalíticas vitais no organismo (Wu, 2013). Também se encontra em abundância na hemoglobina, sendo precursora direta da histamina e uma fonte importante de átomos de carbono na síntese de purinas (NRC, 2011). Diversos pesquisadores determinaram a exigência de histidina total para inúmeras espécies de peixes, incluindo a truta arco-íris *O. mykiss* (Ogino, 1980); bagre do canal *I. punctatus* (Wilson, 1980); carpa maior da Índia *Cirrhinus mrigala* (Ahmed e Khan, 2005); bagre africano *C. gariiepinus* (Khan e Abidi, 2009); Catla *C. catla* (Zehra e Khan, 2013);

bagre *H. fossilis* (Farhat e Khan, 2013); tilápia do Nilo *O. niloticus* (Santiago e Lovell, 1988), contudo, a maioria dos estudos não levou em consideração as alterações fisiológicas, a morfometria das fibras musculares e a expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular, provocadas pelos nutrientes das dietas.

O estudo sobre a expressão gênica é considerado promissor para o entendimento das respostas às diferentes condições às quais os animais são submetidos, incluindo as mudanças ocasionadas por diferentes dietas fornecidas aos peixes (Sánchez-Vázquez et al., 2001; Lilleeng et al., 2007). Assim, o conhecimento sobre a expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs), como a MyoD e a miogenina, que regulam os mecanismos de hiperplasia e hipertrofia muscular nos peixes, podem ser utilizadas para a compreensão da influência dos fatores nutricionais sobre o crescimento animal e auxiliar na formulação de dietas específicas para as espécies de interesse comercial. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar as exigências de histidina digestível em dietas para juvenis de tilápia do Nilo com base no desempenho produtivo, parâmetros hematológicos, bioquímicos, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina, miostatina) e morfometria muscular.

Material e métodos

Peixes e condições experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMAQ) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – *campus* Toledo, e foi aprovado pelo comitê de ética da mesma instituição sob o protocolo N°20/2014 de 20 de outubro de 2014. Foram utilizados 288 juvenis de tilápia do Nilo revertidos sexualmente durante a fase larval, com peso médio inicial $64,15 \pm 0,49$ g, provenientes da piscicultura Dalbosco – Toledo-PR. Os peixes foram distribuídos em 24 caixas circulares de fibra de vidro com capacidade de 500 litros, dotadas de um sistema de recirculação de água com um biofiltro central, aeração constante por meio de soprador de ar central e aquecimento constante através de termostato. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada unidade experimental composta por 12 peixes. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados diariamente com o aparelho YSI

Professional *Plus Multiparameter Water Quality Meter*: temperatura da água ($28,05 \pm 0,12$ °C), oxigênio dissolvido ($5,20 \pm 0,23$ mg.L⁻¹), pH ($7,12 \pm 0,19$) e condutividade elétrica ($129,31 \pm 5,48$ μS.cm⁻¹).

Dietas experimentais

Foram elaboradas seis dietas experimentais com aproximadamente 267,3 kg⁻¹ de proteína bruta e 4048 kcal kg⁻¹ de energia bruta, contendo níveis crescentes de suplementação de L -histidina (Ajinomoto – Divisão de Nutrição Animal, SP, Brasil) de 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 g kg⁻¹, onde foram obtidas dietas com 3,50; 5,50; 7,50; 9,50; 11,50 e 13,50 g kg⁻¹ de histidina digestível (baseados nos valores propostos por Guimarães et al., 2008a; 2008b) (Tabela 1). Os ingredientes selecionados foram moídos individualmente em moinho tipo martelo (Vieira, MCS 280, Tatuí-SP, Brasil) com peneira de malha 0,3 milímetro de diâmetro. As rações foram processadas da forma extrusada (Extec, Ex-Micro, Ribeirão Preto-SP, Brasil) para terem peletes com diâmetros de aproximadamente 3,0 milímetros. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia (8h00, 11h00, 14h00 e 17h00) até a saciedade aparente. A composição dos aminoácidos essenciais e não essenciais encontram-se na (Tabela 2). As análises foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*) no Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. – *Animal Nutrition*, São Paulo, Brasil.

Tabela 1. Formulação e composição química das dietas experimentais (g kg⁻¹ matéria seca).

| | Níveis de histidina digestível | | | | | |
|---|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 3,50 | 5,50 | 7,50 | 9,50 | 11,50 | 13,50 |
| Quirera de arroz | 654,70 | 654,70 | 654,70 | 654,70 | 654,70 | 654,70 |
| Farinha de vísceras de aves | 145,50 | 145,50 | 145,50 | 145,50 | 145,50 | 145,50 |
| Farinha de penas | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Farinha de carne e ossos 45% | 50,00 | 50,00 | 50,00 | 50,00 | 50,00 | 50,00 |
| Óleo de soja | 5,80 | 5,80 | 5,80 | 5,80 | 5,80 | 5,80 |
| Sal comum | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 | 3,00 |
| L - alanina | 15,00 | 13,00 | 11,00 | 9,00 | 7,00 | 5,00 |
| L -lisina | 6,40 | 6,40 | 6,40 | 6,40 | 6,40 | 6,40 |
| L -treonina | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| DL -metionina | 4,50 | 4,50 | 4,50 | 4,50 | 4,50 | 4,50 |
| L -triptofano | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 |
| L -histidina | 0,00 | 2,00 | 4,00 | 6,00 | 8,00 | 10,00 |
| Supl. mineral e vitamínico ¹ | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| Vitamina C | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Antifúngico | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Antioxidante | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Composição analisada com base na matéria seca (g kg ⁻¹) | | | | | | |
| Matéria seca | 924,4 | 923,9 | 923,7 | 924,9 | 924,3 | 924,8 |
| Energia bruta kcal kg ⁻¹ | 4047,8 | 4047,8 | 4047,8 | 4047,8 | 4047,8 | 4047,8 |
| Proteína bruta | 265,5 | 266,5 | 267,7 | 267,4 | 268,1 | 268,8 |
| Lípideos totais | 44,3 | 44,9 | 44,2 | 44,7 | 44,2 | 44,9 |
| Fibra bruta | 2,1 | 2,1 | 2,0 | 2,2 | 2,1 | 2,0 |

¹Suplemento mineral e vitamínico: níveis de garantia por kg do produto - Premix (DSM-Roche®): Vit_A, 24.000 UI; Vit_{D3}, 6.000 UI; Vit_E, 300 mg; Vit_{K3}, 30 mg; Vit_{B1}, 40 mg; Vit_{B2}, 40 mg; Vit_{B6}, 35 mg; Vit_{B12}, 80 mg; Ác. fólico, 12 mg; Pantotenato Ca, 100 mg; Vit. C, 600 mg; Biotina, 2 mg; Colina, 1.000 mg; Niacina; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg.

Tabela 2. Composição dos aminoácidos das dietas experimentais (g kg⁻¹ da matéria seca)¹

| | Dietas | | | | | |
|-----------------------------------|--------|------|------|------|-------|-------|
| | 3,50 | 5,50 | 7,50 | 9,50 | 11,50 | 13,50 |
| <i>Aminoácidos essenciais</i> | | | | | | |
| Arginina | 17,4 | 18,4 | 17,4 | 18,4 | 17,8 | 18,4 |
| Fenilalanina | 12,8 | 13,2 | 13,2 | 13,4 | 12,8 | 12,9 |
| Histidina | 5,1 | 7,2 | 9,1 | 11,4 | 13,9 | 15,8 |
| Isoleucina | 11,0 | 10,8 | 10,9 | 10,7 | 10,5 | 10,1 |
| Leucina | 20,9 | 20,7 | 20,8 | 20,9 | 20,9 | 20,6 |
| Lisina | 17,7 | 17,5 | 17,6 | 18,1 | 17,3 | 17,7 |
| Metionina | 9,3 | 9,6 | 9,9 | 10,0 | 9,8 | 9,7 |
| Treonina | 13,3 | 13,4 | 13,3 | 13,7 | 13,3 | 12,9 |
| Triptofano | 3,2 | 3,2 | 3,2 | 3,34 | 3,0 | 3,3 |
| Valina | 14,4 | 15,2 | 15,2 | 14,9 | 14,3 | 14,7 |
| <i>Aminoácidos não essenciais</i> | | | | | | |
| Ácido aspártico | 21,6 | 21,3 | 21,3 | 21,7 | 21,3 | 20,8 |
| Ácido glutâmico | 37,2 | 36,4 | 36,6 | 38,1 | 37,1 | 36,5 |
| Alanina | 31,7 | 29,1 | 25,6 | 22,5 | 19,0 | 16,2 |
| Cistina | 6,0 | 5,9 | 6,1 | 5,94 | 5,8 | 6,1 |
| Glicina | 24,2 | 24,4 | 24,5 | 25,0 | 24,9 | 24,7 |
| Serina | 16,8 | 16,9 | 16,7 | 16,9 | 16,9 | 17,7 |
| Tirosina | 8,8 | 8,9 | 9,3 | 9,3 | 8,7 | 8,6 |

¹Análises realizadas pela *Ajinomo Animal Nutrition*

Coleta de dados e desempenho produtivo

Após o período experimental de 65 dias, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, para o esvaziamento do trato gastrointestinal, posteriormente os animais foram insensibilizados em benzocaína na dose de 100 mg L⁻¹, seguindo o protocolo de Gomes et al., 2001, para realização das medidas individuais de peso e coleta de sangue. Três animais de cada unidade experimental foram eutanasiados na dose de 250 mg L⁻¹ (Gomes et al., 2001) para retirada do fígado. Para as análises de composição corporal seis animais de cada tanque, após a eutanásia, foram encaminhados para o Laboratório de Controle de Qualidade do Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura – GEMAq e acondicionados em freezer, para realização de análises.

Para o desempenho produtivo, os seguintes parâmetros foram avaliados para todos os animais: o peso final médio (g); ganho em peso (peso corporal final – peso corporal inicial); conversão alimentar aparente (dieta consumida/ganho em peso); taxa

de eficiência proteica (ganho de peso/proteína consumida); sobrevivência (100(número de peixes final/número de peixes inicial)) e índice hepatossomático (100 (peso fígado, g) / (peso corporal final, g)).

Análises hematológicas e bioquímicas

Para as análises hematológicas e bioquímicas, três peixes de cada tanque foram capturados e anestesiados, e por punção da veia caudal o sangue foi coletado com seringas e agulhas banhadas com EDTA (10%). Com o sangue total foram realizadas as análises de contagem de eritrócitos totais em câmara de Neubauer, utilizando-se o líquido de Hayen na proporção de 1:200. O percentual de hematócrito foi realizado utilizando-se o método do microhematócrito, de acordo com Goldenfarb et al. (1971). A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se “kit” comercial (Gold Analisa Diagnóstica[®], Belo Horizonte-MG, Brasil), proposta por Collier (1944). A partir dos dados obtidos, foram calculados os índices hematimétricos como (volume corpuscular médio), (hemoglobina corpuscular média) e (concentração de hemoglobina corpuscular média), utilizando-se as formulações estabelecidas por Wintrobe (1934): Volume corpuscular médio (fL) = [(hematócrito × 10)] /eritrócitos; hemoglobina corpuscular média (pg) = [(hemoglobina × 10)] /eritrócitos e concentração de hemoglobina corpuscular média (gdL⁻¹) = [(hemoglobina ×100)] / hematócrito.

Foram feitas extensões sanguíneas em lâminas de vidro com extremidades foscas, secas ao ar e coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 100x, utilizando óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos foram realizadas pelo método indireto (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Para a contagem do diferencial de leucócitos foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular (linfócitos, neutrófilos e monócitos). A contagem foi realizada no corpo da extensão, percorrendo-se todo o material, movimentando-se a lâmina em “zig-zag”. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.500 rpm por dez minutos (Quimis, T2, Diadema-SP, Brasil) para obtenção do soro que foi utilizado para a

quantificação de proteínas plasmáticas totais (g dL^{-1}), triglicerídeos (mg dL^{-1}), colesterol total (mg dL^{-1}) e glicose plasmática (mg dL^{-1}). As análises foram realizadas com o uso de “kits” específicos colorimétricos comerciais (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte-MG, Brasil) e procedidas conforme instruções do fabricante, sendo a leitura processada em espectrofotômetro.

Morfometria da fibra muscular

Para a coleta do tecido muscular, três exemplares de cada unidade experimental foram capturados, e eutanasiados em benzocaína 250 mg L^{-1} . Posteriormente, foi retirada uma amostra do músculo branco do lado esquerdo do peixe, abaixo da nadadeira dorsal e acima da linha lateral. As amostras foram imediatamente fixadas em formol tamponado 10% por 24 horas, e em seguida conservadas em álcool 70% até o momento da realização das análises. As amostras passaram pelo processo de inclusão em parafina e posteriormente foram realizados os cortes dos blocos de parafina em micrótomo (MICROM, International GmbH 69190, Walldorf, Alemanha) com lâmina de vidro. Seções transversais de $5 \mu\text{m}$ foram obtidos e submetidos à técnica de coloração hematoxilina e eosina (HE). As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico (400x) acoplado a uma câmera digital, sendo documentadas digitalmente. Para a morfometria das imagens digitalizadas, utilizou-se um sistema de análise de imagens, e foi determinado o menor diâmetro de 200 fibras musculares, por animal, que foram agrupadas em classes de diâmetros ($< 20 \mu\text{m}$, $20\text{-}50 \mu\text{m}$ e $> 50 \mu\text{m}$) para avaliar a contribuição da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular (Almeida et al., 2008). Essas análises morfológicas e morfométricas do músculo branco das tilápias foram realizadas no Laboratório de Histologia Animal do Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Expressão gênica

As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural, Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR.

Foram coletados fragmentos da musculatura branca dorsal dos mesmos peixes utilizados para análise de fibra muscular. As amostras foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer – 80 °C até o processamento. A expressão dos genes da MyoD, miogenina e miostatina foi realizada por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR), seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (Bustin, 2009). O RNA total das amostras congeladas foi extraído com TRIzol™ (Invitrogen Life Technologies), seguindo-se o protocolo do fabricante.

Para verificar a integridade do RNA obtido, 1 µL de solução de RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração de RNA, em ng/µL, foi determinada através de espectrofotômetro a 260 nm de absorvância. A pureza do RNA foi confirmada pela obtenção da razão entre as absorvâncias 260/280 nm igual a 2. Para eliminar os resíduos de DNA genômico contaminante, as amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com a enzima DNase, conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies). Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante, e o DNA complementar (cDNA) resultante foi armazenado em freezer a -20°C e utilizado nas reações de RT-qPCR. Os níveis de expressão dos genes alvo MyoD e miogenina foram detectados por 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 18S ribossomal DNA (*18SrDNA*).

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando-se o Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. Um conjunto de primers senso e antisenso, 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 1: GU246722.1; miogenina: GU246725.1, 18S ribossomal DNA (*18SrDNA*) (Tabela 3). Todos os conjuntos de primers foram sintetizados pela s.

As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, utilizando-se as condições de termociclagem: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao término de cada reação, a amplificação

específica de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo Método do CT, após sua validação, e foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 3. Primers utilizados para amplificação da MyoD, Miogenina, Miostatina e 18S ribossomal DNA (18SrDNA) por PCR em tempo real

| Gene name | GenBank | Primer sequence (5'-3') |
|--------------------------------------|----------|---|
| Myogenic Factor (<i>MyoD</i>) | GU246722 | Forward: CCACCTGTCAGACAACCAGA Reverse: ACTGCGTTCGCTCTTCAGAC |
| Myogenin | GU246725 | Forward: CTCAACCAGCAGGACACTGA Reverse: ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT |
| Myostatin 1 | FJ972683 | Forward: TCCACATGACCCTGCAGAC Reverse: TGCACCACACATACTCCTCATC |
| 18S ribosomal DNA (<i>18SrDNA</i>) | JF698683 | Forward: GACACGGAAAGGATTGACAG Reverse: GTTCGTTATCGGAATTAACCAGA |

Análise proximal

No início do período experimental, seis peixes foram eutanasiados e ao final três peixes de cada tanque foram utilizados para a determinação da composição corporal. A composição centesimal dos animais seguiu o método preconizado pela AOAC (2005) para análises de umidade (pré-secagem a 55°C por 72 horas, seguida de secagem a 105°C por oito horas), proteínas (método de Kjeldhal; Modle MA-036, Piracicaba-SP, Brasil), extrato etéreo (extrator de Soxhlet com éter como solvente; Model TE-0,44, Piracicaba-SP, Brasil), e matéria mineral (calcinação das amostras a 550°C por 6 horas; Modle 2000B, Belo Horizonte-MG, Brasil).

Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando foram observadas diferenças significativas, aplicou-se teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5% de significância. Para verificação dos dados das fibras musculares foi aplicada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Para a determinação da exigência da histidina foi aplicada a análise de regressão polimomial de segunda ordem. As análises foram efetuadas por meio do programa computacional *Statistic 7.1* (Statsoft, 2005).

Resultados

Desempenho produtivo e composição proximal

Foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para as variáveis de ganho em peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica. Contudo, o consumo das dietas contendo histidina não influenciou ($P > 0,05$) o parâmetro de sobrevivência (Tabela 4).

O ganho em peso foi maior ($P < 0,05$) para os peixes que receberam a dieta com $11,50 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina digestível, porém, não diferiu estatisticamente dos peixes que receberam a dieta com $9,50$ de histidina digestível. Peixes que consumiram dieta com $11,50 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina digestível apresentaram melhor taxa de eficiência proteica. Foi observada melhor conversão alimentar para em peixes que receberam a dieta com $9,50$ e $11,50 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina, contudo, não diferiu ($P < 0,05$) dos peixes que receberam dieta com $7,50 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina digestível, que por sua vez não diferiu dos peixes que receberam a dieta com $13,50 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina digestível. A pior conversão alimentar foi observada nos peixes que receberam as dietas contendo $3,50$ e $5,50 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina digestível.

Tabela 4. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina (g kg⁻¹ da matéria seca).

| Variáveis | Níveis de histidina digestível (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|-----------------------------|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------|
| | 3,50 | 5,50 | 7,50 | 9,50 | 11,50 | 13,50 | |
| Peso inicial (g) | 63,9±0,25 | 64,0±0,46 | 64,1±0,49 | 64,2±0,63 | 64,0±0,33 | 64,4±0,83 | 0,8146 |
| Ganho em peso (g) | 123,5 ±7,64 ^d | 129,5± 8,13 ^{cd} | 136,4± 2,95 ^{bcd} | 163,6± 4,68 ^{ab} | 170,9±10,09 ^a | 154,07±0,25 ^{bc} | 0,0002 |
| Conversão alimentar | 1,2±0,10 ^b | 1,1±0,9 ^b | 1,1± 0,4 ^{ab} | 1,0± 0,3 ^a | 1,0 ±0,1 ^a | 1,0±0,2 ^{ab} | 0,0008 |
| Taxa de eficiência proteica | 1,9±0,09 ^b | 2,0±0,12 ^b | 2,1±0,04 ^{ab} | 2,5±0,08 ^a | 2,6±0,17 ^a | 2,3±0,26 ^{ab} | 0,000940 |
| Sobrevivência (%) | 97,9±4,8 | 95,8±4,8 | 97,9±4,8 | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 100,0±0,0 | 0,3489 |
| | Equação | | | | | | P |
| Ganho em peso | $Y = - 0,8424x^2 + 17,701x + 65,115; R^2 = 0,75; His = 10,5 \text{ g kg}^{-1}$ | | | | | | 0,001 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

O melhor ajuste matemático foi obtido por meio do modelo de regressão polinomial de segundo grau, para o máximo ganho em peso dos peixes, em que foi estimada exigência de $10,5 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina (Figura 1).

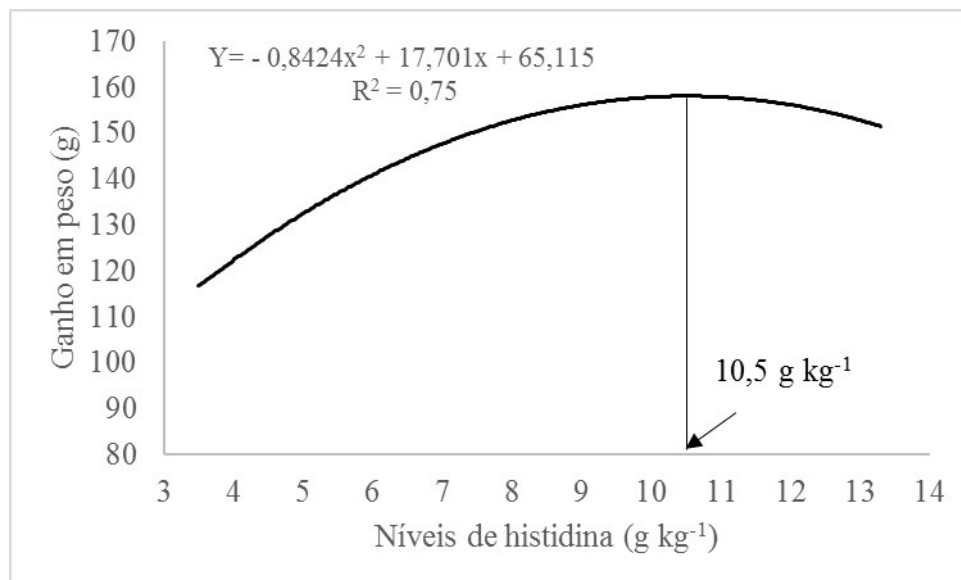


Figura 1. Ganho em peso de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de histidina digestível.

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para a composição corporal dos peixes para os parâmetros de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral (Tabela 5).

Tabela 5. Composição corporal de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina.

| Variáveis | Níveis de histidina digestível (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|-----------------|--|-------------|------------|------------|------------|------------|--------|
| | 3,50 | 5,50 | 7,50 | 9,50 | 11,50 | 13,50 | |
| Umidade | 72,89±0,55 | 71,92±0,51 | 72,22±0,50 | 72,72±0,50 | 72,21±0,51 | 72,61±0,53 | 0,1724 |
| Proteína bruta | 14,50±0,38 | 15,376±0,44 | 14,19±0,98 | 15,18±0,50 | 15,06±0,60 | 15,03±0,71 | 0,5093 |
| Extrato etéreo | 9,99±0,26 | 9,39±0,31 | 9,93±0,53 | 9,780,80 | 9,92±0,13 | 9,83±0,41 | 0,5093 |
| Matéria mineral | 4,68±0,37 | 4,61±0,52 | 4,80±0,44 | 5,10±0,50 | 4,40±0,47 | 4,72±0,37 | 0,4305 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições.

Morfometria muscular

Os níveis dietéticos de histidina não influenciaram ($P>0,05$) a frequência da ocorrência de fibras musculares brancas entre os tratamentos (Figura 2).

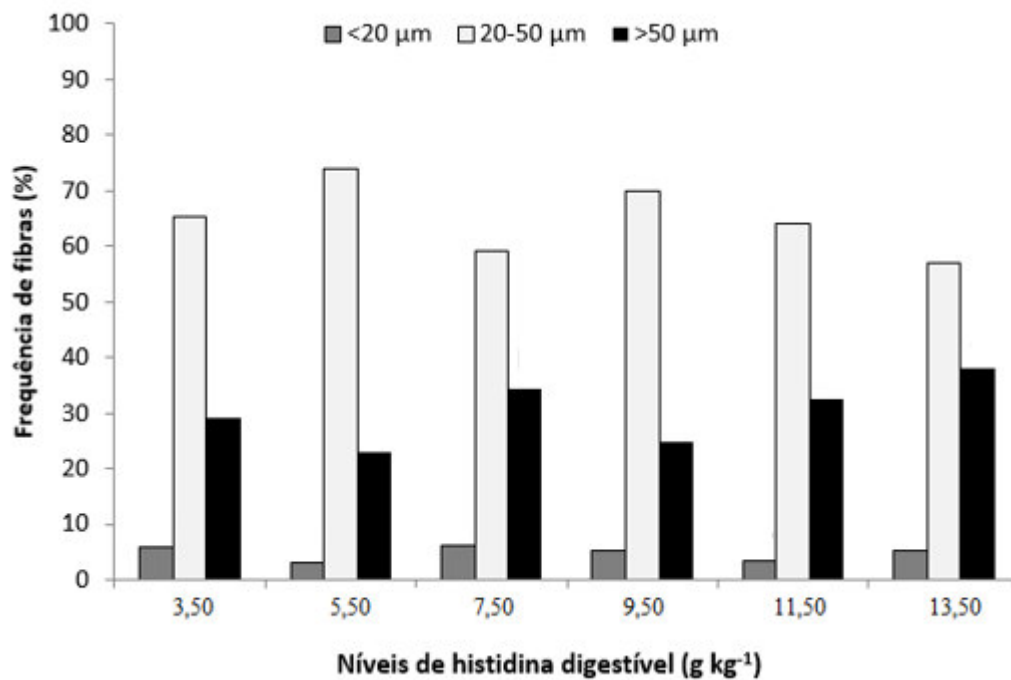


Figura 2. Frequência da distribuição das fibras musculares brancas de juvenis de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina digestível.

Expressão gênica

A expressão dos níveis de mRNA da MyoD, miogenina e miostatina foram influenciados ($P < 0,05$) pelos níveis de histidina digestível no músculo branco de juvenis de tilápia do Nilo (Figura 3). A suplementação de 9,50 a 13,50 g kg⁻¹ de histidina digestível proporcionou maior expressão ($P < 0,05$) dos níveis de mRNA da MyoD, quando comparada com os tratamentos contendo 3,50, 7,50 e 9,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. A maior expressão dos níveis de mRNA da miogenina foi observada para os peixes que receberam as dietas contendo 9,50 e 11,50 g kg⁻¹ de histidina digestível, quando comparada com os animais que receberam dietas com 3,50, 7,50 e 13,50 g kg⁻¹, porém, não diferindo dos peixes que receberam a dieta com 7,50 g kg⁻¹ de histidina digestível. A menor expressão ($P < 0,05$) dos níveis de mRNA da miostatina foi observada em peixes que receberam a dieta contendo 11,50 e 13,50 g kg⁻¹ de histidina digestível, enquanto que a maior expressão ($P < 0,05$) dos níveis de mRNA da miostatina ocorreu em peixes alimentados com a dieta contendo 3,50 a 9,50 g kg⁻¹ de histidina digestível.

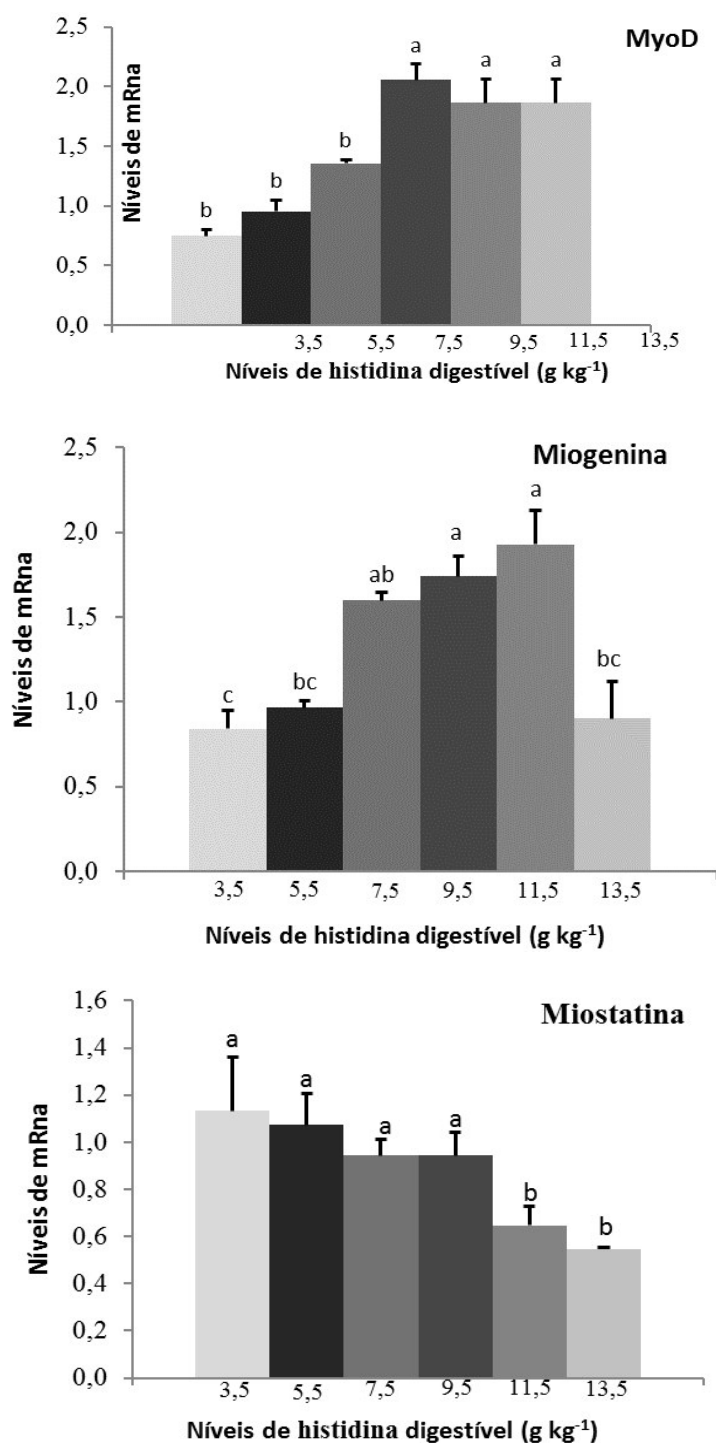


Figura 3. Quantificação da MyoD, miogenina e miostatina realizada no tecido muscular esquelético branco da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) detectados por RT-qPCR. Barras representam médias \pm Desvio padrão para cada tratamento (n=9) Letras distintas indicam diferença significativa a nível de (P>0,05) de significância pelo teste de Tukey.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) para as variáveis de contagem total de eritrócitos, taxa de hemoglobina, percentual de hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, triglicerídeos, colesterol total, proteínas plasmáticas totais e glicose plasmática dos juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina (Tabela 6). Da mesma forma, não foram observadas alterações ($P>0,05$) nos valores de leucócitos e trombócitos totais. Os leucócitos oscilaram de 46864,5 a 58306,5 μL^{-1} , enquanto os trombócitos totais variaram de 27256,13 a 43264,50 μL^{-1} . Em relação ao diferencial de leucócitos, o maior percentual, foi observado para os linfócitos que oscilaram de 88,87 a 89,5%, seguido pelo percentual dos neutrófilos com variação de 9,25 a 10% e menor percentual de monócitos, em torno de 1,12 a 1,50% (Tabela 7).

Tabela 6. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina

| Variáveis | Níveis de histidina digestível (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|---|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|
| | 3,50 | 5,50 | 7,50 | 9,50 | 11,50 | 13,50 | |
| Eri (10 ⁶ µL ⁻¹) | 2,05±1,10 | 2,03±0,92 | 2,12±0,82 | 2,10±1,14 | 2,10±1,12 | 2,07±1,11 | 0,7988 |
| Hb (g dL ⁻¹) | 10,27±2,0 | 10,30±0,82 | 10,95±2,28 | 11,01±1,40 | 11,74±1,79 | 11,67±1,16 | 0,3507 |
| Htc (%) | 38,50±0,9 | 38,70±0,7 | 39,52±1,30 | 39,12±0,83 | 39,23±0,75 | 38,25±0,70 | 0,0969 |
| VCM (fL) | 187,16±6,53 | 190,99±5,03 | 187,86±20,21 | 187,19±16,15 | 185,55±8,14 | 184,41±9,80 | 0,9268 |
| HCM (%) | 26,69±4,56 | 26,63±3,21 | 27,81±5,64 | 28,16±4,23 | 30,08±5,12 | 30,52±4,45 | 0,3544 |
| CHCM (g dL ⁻¹) | 50,17±5,38 | 50,89±2,46 | 52,19±5,24 | 52,51±3,77 | 55,80±4,23 | 56,17±3,01 | 0,6430 |
| Parâmetros bioquímicos | | | | | | | |
| TG (mg dL ⁻¹) | 253,05±40 | 210,66±38,48 | 275,11±33,15 | 215,70±17,79 | 257,5±38,57 | 237,33±40,78 | 0,0577 |
| COL (mg dL ⁻¹) | 200,44±32,20 | 164,68±34,57 | 162,11±38,60 | 167,54±42,80 | 197,94±37,80 | 175,84±43,60 | 0,2927 |
| PPT (g dL ⁻¹) | 4,18±0,55 | 3,89±0,68 | 3,90±0,60 | 4,08±0,88 | 4,38±0,92 | 4,02±0,83 | 0,6048 |
| GLI (mg dL ⁻¹) | 92,17±8,20 | 94,64±14,10 | 91,76±9,12 | 93,07±10,76 | 91,41±8,71 | 96,13±11,10 | 0,9656 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P>0,05). Eri= eritrócitos totais; Hb= hemoglobina; HTC= Hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; TG= Triglicerídeos; Col= Colesterol total; PPT= Proteínas plasmáticas totais; Gli= Glicose plasmática.

Tabela 7. Leucócitos totais, trombócitos totais, percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina

| Variáveis | Níveis de histidina digestível (g kg ⁻¹) | | | | | | P |
|---------------------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| | 3,50 | 5,50 | 7,50 | 9,50 | 11,50 | 13,50 | |
| Leuc (μL ⁻¹) | 58306±16810 | 48189±17169 | 46864±15054 | 52320±12119 | 50877±8164 | 54763±7799 | 0,2667 |
| Tromb (μL ⁻¹) | 33913±2371 | 28363±16052 | 37334±12848 | 43264±13980 | 38026±12870 | 27256±14543 | 0,7454 |
| Linf (%) | 89,37±1,30 | 89,12±1,45 | 89,5±0,92 | 89±1,51 | 88,87±0,83 | 89±0,78 | 0,8976 |
| Neut (%) | 9,25±1,03 | 9,62±1,06 | 9,37±1,19 | 9,75±1,08 | 10±1,16 | 9,5±1,09 | 0,6991 |
| Mon (%) | 1,5±0,98 | 1,25±0,77 | 1,12±0,82 | 1,25±0,78 | 1,37±0,91 | 1,5±0,88 | 0,9228 |

¹Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Médias na mesma linha com letras diferentes diferem pelo teste de Tukey (P>0,05). Leuc = leucócitos totais; Tromb = trombócitos totais; Linf = linfócitos; Neu = neutrófilos; Mon = monócitos.

Discussão

Tanto a deficiência como o excesso dietético de aminoácidos interferem negativamente sobre o desempenho produtivo, composição corporal e rendimento de filé dos peixes. Além disso, o excedente do nitrogênio é excretado para o meio aquático, sendo um dos elementos reponsáveis pela eutrofização excessiva nos ambientes de criação (Furuya et al., 2001). Portanto, é importante considerar cada aminoácido durante a formulação de dietas para propiciar adequada relação custo-benefício e desempenho produtivo dos peixes. Neste estudo, a suplementação de histidina digestível na dieta influenciou ($P < 0,05$) o ganho em peso, conversão alimentar e a taxa de eficiência proteica. O melhor ajuste matemático foi obtido por meio do modelo regressão polinomial de segundo grau, para o máximo ganho em peso dos peixes, em que foi estimada exigência de $10,0 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina (3,7% da proteína bruta da dieta).

Até o momento, ainda não há relatos de pesquisas sobre a exigência de histidina digestível para a tilápia do Nilo, sendo encontrada apenas uma pesquisa que determinou a exigência de histidina total utilizando dieta purificada, que foi realizada por Santiago e Lovell (1988). Os autores, em contraste com o este estudo, encontraram valores inferiores de exigência em histidina total, de $4,8 \text{ g kg}^{-1}$, correspondente a 1,72% de proteína bruta da dieta para larvas de tilápia do Nilo.

A exigência quantitativa de histidina obtida neste experimento para o máximo ganho em peso, de $10,0 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina digestível, é superior aos resultados obtidos por Zhao et al. (2012), que determinaram a exigência de histidina para juvenis de *C. carpio* de $7,8 \text{ g kg}^{-1}$ (2,38% da proteína bruta da dieta) para um melhor crescimento e atividade de enzimas intestinais. Os resultados são superiores também aos obtidos por Akyama et al. (1985), que estimaram exigência de histidina em $7,0 \text{ g kg}^{-1}$ (1,6% da proteína bruta da dieta) para alevinos de Chum Salmão. Em contrapartida, Khan e Abidi (2014), conduzindo estudos com alevinos de *H. fossilis* fry, observaram máximo ganho em peso e melhora na hematopoiese em peixes que receberam a dieta com 15,1 a $15,6 \text{ g kg}^{-1}$ de histidina (3,5 e 3,6% da proteína bruta da dieta). Esses valores são superiores quando comparados ao encontrado para *O. niloticus* do presente estudo. Deve-se levar em consideração que a exigência nutricional dos peixes pode ser influenciada por inúmeros fatores, incluindo a espécie, hábito alimentar, condições em que os animais foram criados, fase de desenvolvimento dos peixes, dietas, densidade de estocagem e

estado fisiológico, ainda, ao modelo matemático aplicado, entre outros fatores que possam alterar as exigências dos animais.

Uma melhora na conversão alimentar e na taxa de eficiência proteica ($P < 0,05$) foi observada com o aumento nos níveis de histidina nas dietas. A pior conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foi observada em peixes que receberam a dieta que não foi suplementada com histidina, semelhante aos resultados observados por Zehra e Khan (2014) para alevinos de *C. catla* alimentados com níveis crescente de histidina e também por Abidi e Khan (2004) para alevinos de *Labeo Rohita*. A taxa de eficiência proteica demonstra a capacidade que o animal tem em aproveitar a proteína da dieta. Neste estudo, foi possível observar que os animais que receberam as dietas suplementadas com histidina digestível apresentaram melhoras para esse índice em comparação aos peixes que receberam a dieta sem suplementação de histidina. Khan e Abidi (2009) também observaram melhor taxa de eficiência proteica para alevinos de *C. gariepinus*, alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina.

O aumento nos níveis de histidina digestível nas dietas não influenciou ($P > 0,05$) o teor de umidade, gordura corporal, proteína bruta e matéria mineral dos peixes. Esses resultados diferem dos obtidos por Zhao et al. (2012), que relataram modificações no conteúdo de proteína corporal, matéria mineral e lipídeos corporais de *C. carpio* devido ao aumento nos níveis de histidina na dieta. Porém, esses resultados corroboram os encontrados por Abidi e Khan (2014), que não observaram efeito na composição corporal de *H. fossilis fry* (Bloch), alimentados com dietas contendo níveis crescentes de histidina.

Por meio da análise morfométrica das fibras musculares, foi possível observar que entre todos os tratamentos o crescimento muscular ocorreu por hiperplasia e hipertrofia. As fibras que apresentam diâmetros menores que 20 μm sugerem a ocorrência do processo hiperplásico (recrutamento de novas fibras musculares), enquanto que as fibras com diâmetros maiores que 50 μm indicam o processo hipertrófico pelo aumento do diâmetro das fibras musculares (Valente et al., 1999; Rowleron e Veggetti, 2001).

Tanto o processo hiperplásico quanto o hipertrófico são mecanismos regulados por inúmeras moléculas, incluindo os fatores de transcrição miogênica (MRFs), entre os quais estão a MyoD e a miogenina (Watabe, 2001). Durante a miogênese, a MyoD e o myf5 determinam a proliferação dos mioblastos ou das células satélites, enquanto o processo de diferenciação dos mioblastos, durante as fases de fusão e diferenciação em

fibras musculares maduras, é regulado pela expressão da miogenina e MRF4 (Rescan, 2001; Watabe, 1999).

A maior expressão dos níveis de mRNA da MyoD foram observadas nos peixes que receberam a dieta contendo os maiores níveis de histidina digestível (9,50; 11,50 e 13,50 g kg⁻¹) em comparação com peixes alimentados com a dieta sem suplementação de histidina. Assim como a MyoD, a maior expressão dos níveis de mRNA da miogenina foi observada nos peixes que receberam as maiores inclusões de histidina digestível (9,50 e 11,50 g kg⁻¹). No entanto, peixes que receberam a dieta suplementada com 13,50 g kg⁻¹ de histidina apresentaram menor expressão dos níveis de mRNA de miogenina, ocorrendo o mesmo para peixes que receberam os menores níveis de histidina digestível (3,50 e 5,50 g kg⁻¹). Pode-se inferir que a histidina pode modificar a expressão dos genes MyoD e miogenina. O processo de proliferação dos mioblastos e a hiperplasia celular nos peixes podem ser induzidos pela maior expressão do gene MyoD, enquanto a expressão da miogenina está relacionada com os processos de diferenciação dos mioblastos e hipertrofia das fibras musculares (Johansen e Overturf, 2005). Esses resultados corroboram a análise morfométrica, onde o crescimento muscular dos peixes ocorreu tanto por hiperplasia como hipertrofia entre os tratamentos.

Assim como demonstrado na presente pesquisa, outros pesquisadores relataram que alterações dos nutrientes na dieta podem induzir a modificações na expressão de alguns fatores miogênicos na musculatura branca dos peixes. Nesse sentido, Campos et al. (2010) avaliaram a inclusão de lipídeos na dieta para linguados (*Solea senegalensis* Kaup) e observaram que os peixes que receberam o maior nível de ácidos graxos nas dietas apresentaram a menor expressão gênica dos MRFs como a MyoD, MRF4 e miogenina, quando comparados aos que receberam o menor percentual de lipídeos.

A miostatina é reconhecida por inibir a expressão dos fatores de transcrição miogênicos (MyoD e miogenina), atuando de forma negativa no crescimento muscular (Lopes, 2010). No presente estudo, a expressão dos níveis de mRNA da miostatina foi maior nos peixes que receberam a dieta contendo os menores níveis de histidina digestível (3,50; 5,50; 7,50 e 9,50 g kg⁻¹), enquanto que os peixes que receberam as dietas com a maior inclusão de histidina digestível (11,50 e 13,50 g kg⁻¹) apresentaram menor expressão dos níveis de mRNA da miostatina. Provavelmente, os níveis de histidina suplementados nas dietas inibiram a expressão da miostatina. Pela análise morfométrica, pode-se inferir que a miostatina não inibiu a expressão da miogenina e MyoD, pois em todos os tratamentos o crescimento ocorreu por hipertrofia e

hiperplasia. Os relatos sobre o comportamento da miostatina no crescimento muscular dos peixes ainda não foram totalmente esclarecidos, apresentando resultados contraditórios na literatura. Em estudos realizados com truta, Seiliez et al. (2012), observaram que a miostatina não inibiu a expressão da miogenina e MyoD. Por outro lado, Xu et al. (2003) relataram que a miostatina exerceu função inibitória sobre o crescimento muscular hiperplásico do zebrafish (*Danio rerio*).

A criação de tilápias tem se intensificado cada vez mais nos últimos anos em nosso país. Atrélado a esse crescimento, surgem problemas que estão relacionados com o estado de higidez dos animais, sendo que esses se tornam cada vez mais frequentes. Dessa forma, se faz necessário o controle do estado de saúde dos peixes que são criados em ambiente confinado.

Diante desse cenário, a hematologia desempenha um importante papel, atuando como ferramenta rápida e eficaz na avaliação das condições de defesa orgânica dos animais, expostos aos desafios durante a criação (Ranzani-Paiva et al., 2013). As informações sobre a influência da histidina sobre os parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo, ainda são escassas na literatura. No presente estudo, os níveis de histidina testados não afetaram na eritropoiese dos peixes, e os valores mantiveram-se dentro do intervalo de referência estabelecido para a espécie (Hrubec e Smith, 2010; Hrubec, 2000), e ao obtido para tilápias hígidas em condições experimentais (Araújo et al., 2011; Jerônimo et al., 2011). No entanto, os valores considerados padrão para os parâmetros hematológicos em peixes não foram totalmente padronizados. Muitos dados discrepantes são encontrados na literatura, devido ao fato de inúmeros fatores influenciarem significativamente as respostas hematológicas dos peixes, incluindo a idade, sexo, peso, condições ambientais manejo, método de colheita, anticoagulantes utilizados e a execução das análises.

A proteína hemoglobina é rica em histidina (Sebrell e McDaniel, 1952; NRC, 2011). Dessa forma, a exigência para uma melhor eritropoiese é geralmente maior quando comparada com a estimada para o crescimento, como demonstrado por Khan e Abidi (2014) ao testarem níveis de histidina para *H. fossilis*. Esses autores observaram que a exigência de histidina encontrada para a taxa de hemoglobina e para o percentual de hematócrito foi 4% maior do que a estimada para o máximo ganho em peso.

Os índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) são utilizados na determinação e classificação dos quadros anêmicos (Ranzani-Paiva et al., 2013). Além disso, podem ser utilizados para avaliação de um quadro de estresse. No presente

estudo, os valores obtidos para os índices hematimétricos não foram alterados pelo conteúdo de histidina da dieta. Tais variáveis estão dentro da amplitude de variação e são considerados normais para peixes teleósteos (Tavares Dias e Moraes, 2004).

O perfil bioquímico do plasma e soro sanguíneo fornecem informações importantes em relação às condições nutricionais, estado metabólico, clínico e produtivo dos animais (González e Silva, 2006). Deste modo, os parâmetros bioquímicos podem ser utilizados para avaliar a condição de saúde dos animais. As variáveis bioquímicas das tilápias alimentadas com níveis crescentes de histidina na dieta não diferiram nos peixes que receberam dietas com níveis crescentes de histidina. A concentração de triglicerídeos observada nesse estudo variou de 210,66 a 275 mg dL⁻¹, enquanto que o colesterol total apresentou oscilação de 162,11 a 200,44 mg dL⁻¹, sendo esses valores considerados normais para a tilápia do Nilo (Hrubec et al., 2000). Os triglicerídeos são utilizados no organismo principalmente como fonte de energia para realização dos distintos processos metabólicos. Contudo, alguns lipídeos, como o colesterol total, fosfolipídeos e uma pequena parcela dos triglicerídeos, são empregados na formação da membrana de todas as células e na realização de inúmeras funções celulares, que são vitais para o organismo animal (Guyton e Hall, 2011). A quantidade de gordura nas dietas pode alterar os níveis de triglicerídeos e colesterol total no sangue, podendo causar um incremento desses parâmetros na corrente sanguínea. As rações do presente experimento foram formuladas de forma a serem isoenergéticas e apresentarem o mesmo teor lipídico em todas as formulações. Portanto, essa condição pode ter influenciado os resultados obtidos para essas variáveis.

A glicose plasmática pode ser empregada como um indicador de distúrbio fisiológico nos animais, pois é uma das principais fontes de energia utilizada pelos peixes em situações consideradas desfavoráveis durante o cultivo (Morgan e Iwama, 1997). No presente estudo, os valores médios de glicose mantiveram-se dentro da faixa considerada normal para a espécie em estudo (Hrubec, 2000).

A concentração de proteínas plasmáticas totais neste estudo variou de 3,89 a 4,38 g dL⁻¹, sendo que esses valores estão dentro da amplitude de variação para tilápias saudáveis. De acordo com Chen et al. (2003) e Mauel et al. (2007), as médias de proteínas plasmáticas totais oscilam de 3,0 a 7,7 g dL⁻¹. Esse parâmetro sanguíneo reflete o estado nutricional, balanço hormonal, hídrico e as condições de saúde dos animais. Os principais constituintes das proteínas plasmáticas incluem a albumina, globulina e o fibrinogênio. Essas, por sua vez, desempenham inúmeros funções no

organismo animal, como transporte de nutrientes, hormônios e produtos de excreção, manutenção da pressão osmótica e viscosidade do sangue, regulação do pH e ainda participam da coagulação sanguínea. A redução das proteínas totais no plasma pode estar relacionada a falhas hepáticas, transtornos renais e intestinais e ainda deficiência na nutrição (González e Silva, 2006). Assim sendo, pode-se sugerir que os peixes permaneceram em condições experimentais e manejo apropriado.

Os leucócitos ou glóbulos brancos são considerados unidades móveis de proteção do sistema de defesa do organismo animal; utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis agentes agressores (Guyton e Hall, 2011; Tavares-Dias e Moraes, 2003). Nos peixes, os leucócitos incluem os linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e a célula granulocítica especial. Os trombócitos são células análogas aos mamíferos e desempenham importante papel na coagulação sanguínea e nos processos inflamatórios no organismo dos animais (Tavares e Moraes, 2004). No presente estudo, a contagem de células da série branca do sangue dos juvenis de tilápias do Nilo e os trombócitos totais não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos diferentes níveis de histidina avaliados. Os valores médios dos leucócitos totais oscilaram entre 46864 a 58306 μL^{-1} e os trombócitos totais variaram entre 27256 a 43264 μL^{-1} . Esses valores estão dentro da faixa considerada normal para tilápias saudáveis (Hrubec et al. 2000).

Foi observado que a suplementação de histidina influenciou o ganho em peso, a conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina e miostatina). A partir do ajuste dos dados ao modelo de regressão polinomial de segunda ordem, a exigência de histidina digestível para o máximo ganho em peso foi estimada em 10,5 g kg^{-1} correspondente a 3,7 % da proteína. Os resultados obtidos nessa pesquisa podem ser utilizados nas formulações de dietas comerciais para a tilápia do Nilo.

Referências bibliográficas

- Abidi, S.F., Khan, M.A., 2004. Dietary histidine requirement of fingerling indian Major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *ISR J. Aquacult. Bamid.* 56, 200-208.
- Ahmed, I., Khan, M., 2005. Dietary histidine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aqua. Nutr.* 11, 359–366.
- Akiyama, T., Arai, S., Murai, T. 1985. Threonine, histidine and lysine requirements of chum salmon fry. *B. Jnp. Soc. Sci. Fish.* 51, 635–639.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron.* 39, 1306-1311.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th. ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.
- Araújo DM, Pezzato AC, Barros MM, et al. (2011) Hematologia de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. *Pesqui Agropec Bras* 46, 294-302.
- Benakappa, S., Varghese, T.J., 2003. Isoleucine, leucine, and valine requirement of juvenile Indian major carp, *Cirrhinus cirrhosus* (Bloch, 1795). *Acta. Ichtyol .Pisc.* 33, 161–172.
- Campos, C., Valente, L.P.M., Borges, P., Bizauayehu, T., Fernandes, J.M.O., 2010. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *J. Exp. Biol.* 231, 200–209.
- Chapalamadugu, K.C., Robison, B.D., Drew, R.E., Powell, M.S., Hill, R.A., Amberg, J.J., Rodnick, K.J., Hardy, R.W., Hill, M.L., Murdoch, G.K., 2009. Dietary carbohydrate level affects transcription factor expression that regulates skeletal muscle myogenesis in trout. *Comp. Biochem. Physiol. B* 153, 66–72.
- Chen, C.Y., Wooster, G.A., Getchell, R.G., Bowser, P.R., Timmons, M.B., 2003. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, 218, 89-102.
- Collier, H.B., 1944).The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.* 50, 550-552.
- Farhat, Khan, M.A., 2013. Effects of varying levels of dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition in fingerlings stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture* 404-405, 130-138.

- Furuya WM (2010) Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. GFM, Toledo, Paraná.
- 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 para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Rev. Bras. Zootec. 30, 1143-1149.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. Am. J. Clin. Path. 56, 35-39.
- Gomes LC, ChipparI-Gomes AR & Lopes NP, (2001) Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. J. World. Aquacult. Soc. 32, 426-431.
- González, F.H.D., Silva, S.C., 2006. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- González-Rodríguez, Á., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royela, M., Fuertes, J.B., 2014. Effects of varying protein level in practical diets on survival, growth, feed utilization and body composition of juvenile tench (*Tinca tinca* L.). Aquacult. Int. 22, 1723-1735.
- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Margarida, M.M., Tachibana, L., 2008. Nutrient Digestibility of cereal Grain Products and By-products in extruded diets for Nile tilapia. J.World. Aquacult. Soc. 39, 781-789 a.
- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Margarida, M.M., 2008. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquac. Nut. 14, 396-404b.
- Guyton, AC & Hall JE (2011) Tratado de fisiologia médica. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1151p.
- Han, Y., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S. 2013. Interactive effects of dietary arginine and histidine on the performances of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. Aquaculture, 414-415, 173-182.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A. 2000. Haematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet. Clin. Patol. 29, 7-12.
- Hrubec, T.C.; Smith, S. 2010. Hematology of fishes, in: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Ed). Schalm's veterinary hematology. USA: Wiley-Blackwell, pp 994-1003.
- Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M., Martins, M.L. 2011. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. Braz. J. Biol. 3, 719-725.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mar. Biotechnol. 7, 576-587.

- Khan M.A., Abidi S.F. 2009. Dietary histidine requirement of fry African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aqua. Res.* 40, 1000–1010.
- Khan, F.M.A. 2013. Effects of varying levels of dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition in fingerling stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture*, 404-405, 130-138.
- Khan, M.A., Abidi, S.F. 2014. Dietary histidine requirement of Singhi, *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch). *Aqua. Res.* v.45, p. 1341-1354.
- Lilleeng, E., Froystad, M.K., Ostby, G.C., Valen, E.C., Krogdahl, A., 2007. Effects of diets containing soybean meal on trypsin RNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 147, 25-36.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Lopes, L.S., 2010. Aspectos fisiológicos e estruturais que influenciam o desenvolvimento do tecido muscular. *PUBVET, Londrina*, 4, Ed. 123, Art. 834.
- Mauel, M.J., Miller, D.L., Merrill, A.L., 2007. Hematologic and plasma biochemical values of health hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. *J. Zoo. Wildlife Med.* 38, 420-424.
- Morgan, J.D., Iwama, G.K., 1997. Measurements of stressed states in the field. In: Iwama, G.k., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., J.P., Schreck, C.B. (Ed). *Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series*, 62, Cambridge University Press, New York, p.247-270.
- National Research Council – NRC (2011) *Nutrient requirements of fish and shrimp.* Washington, D.C.: National Academy Press.
- Nose, T., 1979. Summary report on the requirements of essential amino acids for carp. In: J.E. Halver, K. Tiews (eds.). *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Vol. 1. Heenemann, Berlin. 145 pp.
- Ogino, C., 1980. Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 46, 171-174.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Benites de Pádua S, Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013 *Métodos para análise hematológica em peixes.* Eduem, Maringá, Paraná.
- Rescan, P.Y., 2001. Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 111–116.
- Rosenfeld, G. 1947. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem Inst Butantan* 20, 329-334.

- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Muscle Development and Growth. (Johnston, I.A. ed.). pp. 103–139. Academic Press, London.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Aranda, A., Madrid, J.A., 2001. Differential Effects of Meal Size and Food Energy Density on Feeding Entrainment in Goldfish. *J B R* 16, 58-65.
- Santiago, B.C., Lovell, R.T., 1988. Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *J. Nutr.* 118, 1539-1546.
- Sebrell, W.H., McDaniel, E.G., 1952. Amino acids in the production of blood constituents in rats. *J. Nutr.* 47, 477–486.
- Seiliez, I, Sabin, N., Gabillard, J-C., 2012. Myostatin inhibits proliferation but not differentiation of trout myoblasts. *Mol Cell Endocrinol* 351, 220–226.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: Villimpress.
- Valente, L.M.P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., 1999. Growth dynamics of white and red Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press London, pp. 19-41.
- Verstegen, M.W.A., Jongbloed, A.W. Crystalline amino acids and nitrogen emission. In: D’Mello, J.P.F, editor. Amino Acids in Animal Nutrition. 2nd Ed. CABI Publishing; Edinburgh: 2003. pp. 449–458.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish. Biol.* 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors. In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 19–41.
- Wilson, R.P., Poe, W.E., Robinson, E.H., 1980 Leucine, isoleucine, valine and histidine requirements of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 110, 627-633.
- Wilson, R.P., 2002 Amino acids and proteins, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press. New York, pp. 143-179.
- Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematol. Leipzig* 51, 32-49.
- Wu. G., 2013. Amino Acids: Biochemistry and Nutrition. CRC Press Boca Raton, London New York, 482p.
- Xu, C., Wu, G., Zohar, Y., Du, S.J., 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 206, 4067-4079.
- Zehra, S., Khan, M.A., 2014. Dietary histidine requirement of fingerling *Catla Catla* (Hamilton) based on growth, protein gain, histidine gain, RNA/DNA ratio, haematological indices and carcass composition. *Aquac. Res.* 1-12.

Zhao, B., Feng, L., Liu, Y., Kuang, S., Tang, L., Jiang, J., Hu, K., Jiang, W.D., Li, S.H., Zhou, X.Q., 2012. Effects of dietary histidine levels on growth performance, body composition and intestinal enzymes activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquacul. Nutr.* 18, 220–232.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piscicultura é uma das atividades agropecuárias em expansão no território nacional. A tilápia do Nilo inclui a espécie exótica mais cultivada no Brasil. Esse crescimento exige o uso de dietas balanceadas, pois apenas a alimentação natural não é o suficiente para garantir uma boa nutrição dos peixes. Assim, se faz necessária a determinação das exigências nutricionais para elaboração de dietas adequadas para cada espécie em foco, e para cada fase de desenvolvimento.

Nas condições em que o experimento foi realizado, a suplementação da histidina na forma sintética demonstrou ser importante na dieta dos peixes, pois em condições adequadas resultou em um bom desempenho produtivo dos animais, aumento no processo hipertrófico dos peixes e maior expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina, bem como manteve uma adequada homeostase dos peixes.

A suplementação de histidina para fase de alevinos de tilápia do Nilo foi estimada em 8,1 g kg⁻¹ para o máximo ganho em peso. Para fase de juvenis de tilápia do Nilo, a suplementação de histidina estimada foi em 10,5 g kg⁻¹ para o máximo ganho em peso.