

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS AO CRESCIMENTO
MUSCULAR E FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS PRODUTORAS DE
MUCO DE BRÂNQUIAS E INTESTINO DE TILÁPIAS DO NILO
ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE TREONINA**

Autora: Jackeline M. Dallagnol Brum

Orientador: Dr. Wilson Massamitu Furuya

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

Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS AO CRESCIMENTO
MUSCULAR E FREQUÊNCIA DAS CÉLULAS PRODUTORAS DE
MUCO DE BRÂNQUIAS E INTESTINO DE TILÁPIAS DO NILO
ALIMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE TREONINA**

Autora: Jackeline M. Dallagnol Brum

Orientador: Dr. Wilson Massamitu Furuya

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

Fevereiro – 2016

B893e
2016

Brum, Jackeline Marcante Dallagnol
Expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular e frequência das células produtoras de muco de brânquias e intestino de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de treonina / Jackeline Marcante Dallagnol Brum ; orientador, Wilson Massamitu Furuya. -- 2016.
115 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.
Inclui bibliografia

1. Aminoácidos. 2. Peixe - Nutrição. 3. Tilápia (Peixe) - Criação. I. Furuya, Wilson Massamitu. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 20. ed. – 639.3



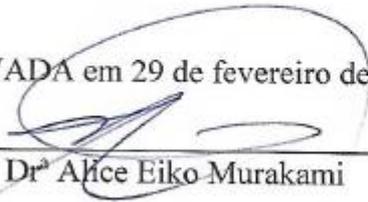
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR E FREQUÊNCIA DE
CÉLULAS PRODUTORAS DE MUÇO DE BRÂNQUIAS E
INTESTINO DE TILÁPIAS DO NILO ALIMENTADAS
COM NÍVEIS CRESCENTES DE TREONINA**

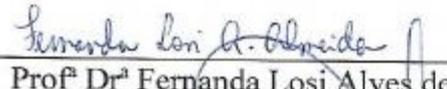
Autora: Jackeline Marcante Dallagnol Brum
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

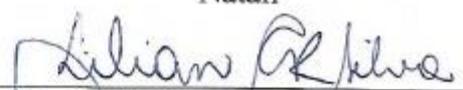
TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

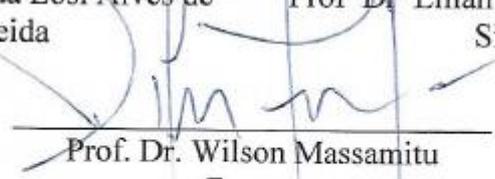
APROVADA em 29 de fevereiro de 2016.


Prof.ª Dr.ª Alice Eiko Murakami


Prof.ª Dr.ª Maria Raquel Marçal
Natali


Prof.ª Dr.ª Fernanda Losi Alves de
Almeida


Prof.ª Dr.ª Lillian Carolina Rosa da
Silva


Prof. Dr. Wilson Massamitu
Furuya
(Orientador)

“Há grandiosidade nesse modo de ver a vida, com suas diversas forças, tendo surgido a partir de umas poucas formas de vida ou de uma única; e que, enquanto este planeta tem orbitado de acordo com as leis fixas da gravidade, de um início tão simples, infinitas formas mais belas e maravilhosas evoluíram, e continuam a evoluir.”

Charles Darwin

Este trabalho é dedicado ao meu Pai Valmor Dallagnol,

Por estar ao meu lado durante toda essa caminhada, dedicando-se totalmente ou como podia para me auxiliar no desenvolvimento dos experimentos durante o Mestrado e o Doutorado. Meu eterno respeito, gratidão e amor. Muito obrigada!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar viva, ter saúde e ter a oportunidade de poder evoluir a cada dia;

À minha família, meus pais Solange e Valmor, minha irmã Tatiana e minha amada sobrinha e afilhada Rafaela e meu marido Rodrigo por me fazerem acreditar que lutar e se dedicar sempre vale a pena e por me incentivarem a sempre seguir em frente e por saber que a casa de nossa família sempre estará de portas abertas para quando eu quiser voltar;

À Universidade Estadual de Maringá-UEM, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ) e ao Departamento de Zootecnia (DZO);

À CAPES, pelo auxílio da bolsa;

Ao Professor, orientador e amigo, Dr. Wilson Massamitu Furuya, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos que levarei para minha vida e profissão, pela amizade e incentivo;

Ao Professor, coorientador e amigo, Dr. Wilson Rogério Boscolo, por todas as dicas, credibilidade, exemplo de profissionalismo, ensinamentos e incentivo na pesquisa.

À Professora Dr^a. Fernanda Losi Alves de Almeida, por todo empenho, dedicação, planejamento e colaboração durante todo o experimento, Obrigada!

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação Dra. Alice Eiko Murakami, Dr^a. Eliane Gasparino, Dr^a. Fernanda Losi de Almeida, Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, Dr^a. Maria Raquel Marçal Natali e Dr^a. Lilian Carolina Rosa da Silva, pelas valiosas sugestões durante a qualificação e defesa;

Aos professores, Wilson M. Furuya, Wilson R. Boscolo, Fernanda Losi de Almeida, Maria Raquel Marçal Natali, Maria Luiza R. S. Franco, Pitágoras Augusto Piana, Lauro

Vargas, Sheila Maria Rosin, Eriko Sengik, Alice Eiko Murakami e Paula Pintro, pelos ensinamentos adquiridos durante as disciplinas cursadas;

À professora Dr^a. Maeli Dal Pai-Silva e ao mestrando Bruno Duran, pelos ensinamentos e ajuda incondicional durante o período de análises da expressão de genes no Departamento de Morfologia do Músculo Estriado Esquelético- UNESP/*Campus* Rubião Júnior/Botucatu-SP.

Às Técnicas do Departamento de Histotécnica Animal, Maria Euride, Maria dos Anjos e Maria Ângela, pelo apoio, atenção durante as análises, ao técnico do laboratório de Apoio e Tecnologia do Pescado, Fernando, pelos incontáveis dias de paciência e companheirismo.

Ao Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental – InPAA/UNIOESTE/*Campus* Toledo-Pr., pela estrutura e funcionários e a Professora Doutora Maristela C. Makrakis, por ter disponibilizado o tanque de cultivo experimental, durante o segundo experimento;

Ao Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura-GEMAAq/UNIOESTE, pela disponibilidade das estruturas utilizadas durante os experimentos, aos Professores Doutores Wilson Rogério Boscolo, Altevir Signor, Aldi Feiden e Fábio Bittencourt, ao pessoal do LQA, Marcia Maluf, Jaina e Fabi e aos colegas de estudo e trabalho em especial ao pessoal que participou diretamente durante a execução dos meus experimentos: Daclei, Micheli, Tatiane, Juliana, Vaguinho, Vanessinha, César, Pedro, Edionei, Joana, Thibério, Gustavo, Tsiane, Fábio, Themis, Júnior, Jhonis, André, Rodrigo, Andréa e Maiara, Juliano, Grace Kelly, Rômulo, Yuri, Gláucia, Sidney, Kátia, PIBIC, Evandro, Dani, Bridi, Milena, Mariana, Luiz, Jean, Deivid, Matheus, Ortência, Lara e Joana Finkler.

Ao orientado da Professora Fernanda Losi de Almeida, aluno de PIBIC e graduando em Zootecnia/UEM Clayton Silva, pelo auxílio inestimável durante as análises de histologia.

Ao Pesquisador Dr. Giovani Sampaio Gonçalves e coorientada Leticia H. Higuchi, por ter realizado a ponte da aquisição e envio da farinha de glúten de São José do Rio Preto-SP;

Ao Engenheiro de Pesca e funcionário da Copacol/Cafelândia-PR. Wilson Mahl, pela doação da farinha de carne e ossos utilizada durante o segundo experimento;

Aos colegas de orientação Mariana Michelato, Micheli Zaminham, Dacley H. Neu, Gustavo Reis, Sidney Klein, Daniel Campelo, Tsiane Schmitt, Lorena Batista de Moura, Luiz Vítor de Oliveira Vidal e Tadeu Orlandi Xavier, pela ajuda na logística, análises e preocupações divididas;

Aos colegas que me deram abrigo durante toda essa jornada, agradecimento especial para Alis Bitarello, que me acolheu em Botucatu, Micheli, Juliana, Taciana, Gustavo, Vanessinha, César e ao senhor Sérgio Rorato e Dona Neuza (pais da Glaucia e (Ronan *in memoriam*)) em Maringá, Dona Cida, pela amizade e atenção de quase um ano de acolhida em sua pensão em Maringá;

À Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos LTDA – Divisão *Animal Nutrition*, pela parceria na realização deste projeto, em especial ao Edgar Ishikawa;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *Campus Toledo*, pela estrutura disponibilizada e ao *Campus* de Marechal Cândido Rondon, pela liberação dos equipamentos e uso dos laboratórios;

Ao Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica – PUC *Campus Toledo*, pela liberação do uso do micrótomo, em especial a secretária Márcia;

Ao Piscicultor Werner Rekowski, pela doação dos peixes utilizados no experimento da primeira fase.

MUITO OBRIGADA.

BIOGRAFIA

Jackeline Marcante Dallagnol, filha de Solange Anna Marcante Dallagnol e Valmor Dallagnol, nasceu em Toledo - PR, no dia 28 de junho de 1983.

Em março de 2001, ingressou no curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela Universidade Paranaense-UNIPAR/*Campus* Toledo. Em 01 de março de 2007, foi conferido o título de Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas.

Em novembro de 2009, foi conferido o certificado de conclusão do curso de Pós-Graduação *Lato Sensu*, Especialização em Controle de Qualidade, área de concentração em Alimentos, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE/*Campus* Cascavel.

Em fevereiro de 2008, ingressou no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível Mestrado, área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca da Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE/*Campus* Toledo, sendo que em fevereiro de 2010 obteve o grau de Mestre.

Em março de 2012, iniciou no curso de Pós-Graduação nível Doutorado em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, e em 17 de dezembro de 2015, obteve a qualificação, e na data de 29/02/2016, submeteu-se à 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	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
Espécie estudada.....	3
Proteínas e aminoácidos na nutrição de peixes	4
Estrutura, metabolismo e exigências de treonina	6
Tecido muscular estriado esquelético e Fatores de Regulação Miogênica (MRFs).....	10
Brânquias.....	14
Intestino	17
Hematologia	20
Referências bibliográficas	21
OBJETIVOS.....	36
GERAL.....	36
ESPECÍFICOS	36
II- Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular e frequência das células de muco neutro e ácido do epitélio branquial e da mucosa intestinal de juvenis de tilápia do Nilo	37
RESUMO	37
ABSTRACT	38
Introdução.....	38
Material e métodos	39

Resultados	48
Discussão	61
Referências	66
III – Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular, frequência do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal e avaliação hematológica de tilápia do Nilo na fase de crescimento	72
RESUMO	72
ABSTRACT	73
Introdução	74
Material e métodos	75
Resultados	85
Discussão	97
Referências	106
Considerações finais	115

LISTA DE TABELAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	3
Estrutura, metabolismo e exigências de treonina	6
Tabela 1: Estrutura da treonina (Wu, 2013).....	6
Tabela 2: Exigências de treonina para algumas espécies de peixes.	1
II– Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular e frequência das células de muco neutro e ácido do epitélio branquial e da mucosa intestinal de juvenis de tilápia do Nilo	37
Tabela 1. Composição (g kg ⁻¹) das dietas experimentais com níveis crescentes de treonina para juvenis de tilápia do Nilo.....	41
Tabela 2: Primers utilizados para a amplificação da <i>MyoD</i> , <i>Miogenina</i> e <i>β-actina</i> por RTq-PCR.....	46
Tabela 3. Desempenho produtivo dos juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina ¹	49
Tabela 4: Composição proximal (g kg ⁻¹) das dietas experimentais com níveis crescentes de treonina para juvenis de tilápia do Nilo.....	50
Tabela 5: Composição corporal de juvenis de tilápia do Nilo, alimentados com níveis crescentes de treonina com base na matéria mineral.....	51
Tabela 6. Frequência de distribuição das fibras musculares brancas de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de treonina ¹	53
Tabela 7: Frequência das células de muco neutro e ácido e quantificação das células de muco do epitélio branquial de tilápia do Nilo, submetidas a dietas com níveis crescentes de treonina ¹	57

Tabela 8: Frequência das células de muco neutro e ácido da mucosa intestinal de tilápias do Nilo submetidas a níveis crescentes de treonina na dieta.....	60
III – Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular, frequência do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal e avaliação hematológica de tilápia do Nilo na fase de crescimento-terminação	72
Tabela 1. Formulação das dietas experimentais com níveis crescentes de treonina para tilápias do Nilo.	77
Tabela 2: Composição das dietas experimentais (g kg ⁻¹ , base na matéria seca) ¹	78
Tabela 3: Primers utilizados para a amplificação da MyoD, Miogenina e β-actina por RT-qPCR.	83
Tabela 4. Desempenho produtivo de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina ¹	87
Tabela 5. Composição corporal de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de treonina, com base na matéria mineral.	88
Tabela 6: Frequência de distribuição das fibras musculares em três classes de diâmetros (<20µm, entre 20 e 50 µm e >50 µm) em tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina ¹	90
Tabela 7: Frequência e quantificação das células secretoras de muco neutro e ácido do epitélio branquial de tilápia do Nilo, alimentadas com níveis crescentes de treonina na dieta ¹	93
Tabela 8: Frequência e quantificação das células caliciformes de muco neutro e ácido da mucosa intestinal de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de treonina na dieta	94

LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	3
Figura 1: Diferentes vias metabólicas no catabolismo de aminoácidos. Adaptada de Nelson & Cox (2011).	5
Figura 2: Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>), após a reação de Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Tetrazolium Redutase NADH-TR, demonstrando a musculatura distribuída nos compartimentos vermelho (V), intermediário (I) e branco (B). Adaptado de Aguiar <i>et al.</i> (2005).....	12
Figura 3: Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia.	13
Figura 4: Enguia-europeia (<i>Anguilla anguilla</i>) (Hematoxilina-Eosina) Brânquia.....	16
II– Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular e frequência das células de muco neutro e ácido do epitélio branquial e da mucosa intestinal de juvenis de tilápia do Nilo	37
Figura 1: Níveis de expressão da MyoD (unidades arbitrárias) no músculo branco da tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) detectados por RT-qPCR.....	55
Figura 2: Níveis de expressão da Miogenina (unidades arbitrárias) no músculo branco da tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) detectados por RT-qPCR. Letras distintas indicam diferença significativa a nível de ($P>0,05$) de significância.....	55
Figura 3: Imagem representativa de corte longitudinal da brânquia de exemplar de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) alimentada com dietas contendo níveis crescentes de treonina.	58
III – Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular, frequência do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal e avaliação hematológica de tilápia do Nilo na fase de crescimento	72
Figura 1: Níveis de expressão do gene MyoD (unidades arbitrárias) detectados no músculo branco da tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) RT-qPCR. Letras distintas indicam diferenças pelo teste ANOVA e Tukey em 5%.....	91

Figura 2: Níveis do gene Miogenina (unidades arbitrárias) detectados no músculo branco da tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) RT=qPCR.	92
---	----

RESUMO

Dois experimentos foram realizados para determinar as exigências dietéticas de treonina para tilápia do Nilo durante duas fases de cultivo por meio do desempenho produtivo, avaliação do crescimento muscular, expressão dos genes MyoD e Miogenina, respostas hematológicas e produção de muco no epitélio branquial e da mucosa intestinal. No primeiro experimento, 216 tilápias do Nilo ($10,77 \pm 2,54$ g) foram distribuídas em 18 aquários de fibra de vidro com capacidade de 250 litros cada. Os peixes foram alimentados com dietas extrusadas isoproteicas (35,88 % de proteína bruta) e isocalóricas ($3420 \text{ kcal.kg}^{-1}$ bruta) contendo 9,05; 12,34; 16,95; 21,21; 24,54 e 27,95 g kg^{-1} de treonina. Os níveis crescentes de treonina não influenciaram o ganho de peso e a composição corporal dos peixes. Peixes alimentados com 12,34 g kg^{-1} de treonina apresentaram crescimento predominantemente por hipertrofia, maior expressão da miogenina e maior produção de células secretoras de muco. Concluiu-se que dieta com 9,05 g kg^{-1} de treonina atende a exigência para desempenho produtivo, mas a máxima produção de células secretoras de muco ocorre em tilápias alimentadas com 12,34 g kg^{-1} de treonina. No segundo experimento, 270 tilápias do Nilo ($54,5 \pm 1,7$ g), distribuídos em 18 tanques-rede de $1,5\text{m}^3$ cada. Foram elaboradas cinco dietas extrusadas contendo 14,1 MJ kg^{-1} de energia bruta e 293,6 g kg^{-1} de proteína bruta e 8,6; 10,7; 13,6; 15,6 e 18,1 g kg^{-1} de treonina. Peixes alimentados com 10,7 g kg^{-1} de treonina apresentaram maior ganho de peso, taxa de eficiência proteica, consumo, crescimento muscular predominantemente por hipertrofia muscular, expressão de MyoD e maior síntese de células secretoras de muco nas brânquias e tecidos intestinais. Concluiu-se que o nível de treonina de 10,7 g kg^{-1} é adequado para assegurar o desempenho produtivo, o crescimento muscular e maximizar a produção de células secretoras de muco de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: aminoácido, nutrigenômica, músculo, nutrição, peixe, saúde.

ABSTRACT

Two experiments were carried out to determine the dietary threonine requirements for Nile tilapia during two rearing phases through the growth performance, muscle growth, expression of MyoD and Myogenin, body composition, hematological evaluation and assessment of mucus production in the epithelium gill and intestinal mucosa. In the first experiment, 216 Nile tilapia (10.77 ± 2.54 g) were distributed into 18 fiberglass aquarium of 250 liters each. Fish were fed to with extruded isoproteic (35.88% crude protein) and isocaloric ($3.420 \text{ kcal.kg}^{-1}$ gross energy) diets containing 9.05, 12.34, 16.95, 21.21, 24.54 and 27.95 g.kg^{-1} threonine. No effects of graded level of dietary theronine on growth performance and body composition were observed. Fish fed 12.34 g kg^{-1} histidine showed increased muscle growth process by hypertrophy, higher Myogenin expression and higher mucus-secreting cells. It was concluded that 9.05 g.kg^{-1} threonine meet the dietary requirment for growth performance but maximized mucus-secreting cells occurs in fish fed 12.34 g kg^{-1} threonine. In the second experiment, 270 Nile tilapia (54.5 ± 1.7 g) were distributed into 18 floating net cages of 1.5m^3 each. Five extruded diets containing 14.1 MJ kg^{-1} gross energy and 293.6 g.kg^{-1} crude protein containing 8.6, 10.7, 13.6, 15.6 and 18.1 g kg^{-1} threonine were used. Fish fed 10.7 g kg^{-1} threonine showed improved weight gain, protein efficiency ratio, feed intake, muscle growth enhanced by muscle hypertrophy and expression of MyoD and higher synthesis of mucus-secreting cells in gills and intestinal tissues. It was concluded that the threonine level of 10.7 g kg^{-1} is appropriate to ensure productive performance, muscle growth and maximize mucus-secreting cells of Nile tilapia.

Key words: amino acid, nutrigenomics, muscle, nutrition, fish, health.

INTRODUÇÃO GERAL

Devido a suas características zootécnicas favoráveis, a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, L. é considerada a espécie mais importante entre as linhagens de tilápia, representando aproximadamente 70% da produção de peixes cultivados (Fitzsimmons, 2004). É a segunda espécie de peixe mais cultivada no mundo, seguidas das carpas, compreendendo 6,3% da produção global da aquicultura (FAO, 2014).

A produção global de pescado ultrapassou o crescimento da população mundial e o setor da aquicultura continua sendo o que apresenta maior crescimento na produção de alimentos. Em 2012, a produção da aquicultura se manteve em alta, fornecendo quase a metade de todo pescado consumido na alimentação humana. Esta porcentagem deverá aumentar para 62% em 2030 (FAO, 2014). As tilápias são peixes onívoros, capazes de se alimentar de algas e detritos e utilizar eficientemente alimentos de origem vegetal. Reproduzem-se com facilidade e podem chegar ao tamanho comercial dentro de uma mesma estação de crescimento (Wang & Lu, 2015).

A proteína é o principal componente visceral e estrutural do organismo animal, sendo necessário seu contínuo suprimento para atender as exigências de manutenção e produção (Furuya, 2010). A unidade das proteínas são os aminoácidos e os peixes não possuem exigência nutricional em proteína somente, mas de quantidades e proporções adequadas de aminoácidos na dieta para a deposição de proteína muscular e corporal (Wilson, 2002).

A treonina é um aminoácido essencial, sendo o terceiro limitante em dietas para a tilápia do Nilo (Bodin *et al.*, 2008). Boa parte da exigência é destinada a atender a manutenção do organismo (Fuller, 1994). A treonina atua no desempenho dos peixes e rendimento do filé, está envolvida com a síntese proteica, é precursora de aminoácidos não essenciais como a serina e a slicina (Lemme, 2003; Michelato *et al.*, 2015). É responsável pela produção de mucina, sintetizada em grande quantidade pelos peixes no trato digestório e para o recobrimento da pele (Tibaldi e Tulli, 1999). Em condições normais, o intestino utiliza mais treonina do que outros aminoácidos essenciais (Stool *et al.*, 1998). Em caso de deficiência de treonina dietética, a síntese de mucina intestinal é especificamente reduzida (Faure *et al.*, 2005).

Com os avanços nas pesquisas relacionadas ao melhoramento genético e exigências nutricionais de peixes, têm-se desenvolvido espécies com maior desempenho produtivo (Mohammad, 2006). O crescimento muscular dos peixes ocorre a partir da ativação, proliferação e diferenciação de células satélites responsáveis pelos mecanismos de crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans & Akster, 1995). Nos peixes, as contribuições relativas da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular são variáveis, dependendo da espécie, fase de crescimento e tipo de músculo (Dal Pai *et al.*, 2000; Johansen & Overturf, 2005; Aguiar *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2008, 2010).

Alguns genes envolvidos com a proliferação e diferenciação das células satélites têm sido identificados em várias espécies de peixes. Entre esses genes estão os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) (Rescan, 2001). Durante o crescimento muscular, as células satélites quiescentes são ativadas e os MRFs primários, MyoD e Myf5, determinam a sua proliferação, enquanto a expressão dos fatores secundários, Miogenina e MRF4, estão relacionados com a diferenciação das células satélites em fibras musculares maduras (Megney & Rudnicki, 1995; Rudnicki & Jaenisch, 1995; Watabe, 1999, 2001). Poucos são os estudos sobre a expressão dos MRFs durante o crescimento muscular de peixes.

Nos peixes, a taxa de crescimento muscular pode ser afetada por diversos fatores, incluindo os nutricionais. É necessário o conhecimento dos nutrientes que compõem as rações, pois os alimentos possuem diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de aminoácidos, que são os principais constituintes das proteínas apresentando diversas funções no organismo dos peixes (Wilson, 1994).

Apesar do crescimento acelerado na área de nutrição de tilápias, poucos são os trabalhos relacionados com a determinação da exigência nutricional da treonina em dietas para a tilápia do Nilo como aminoácido funcional, considerando o desempenho produtivo aliado a estudos relacionados com a expressão gênica e a saúde e dos peixes. A avaliação da inclusão da treonina pode influenciar a taxa de crescimento muscular, controlada por meio da expressão dos fatores de regulação miogênica (tempo de proliferação e diferenciação de mioblastos), o diâmetro e a frequência das fibras musculares brancas e a frequência das células de muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal quando submetidas a essas dietas.

REVISÃO DE LITERATURA

Espécie estudada

Tilápia é o nome genérico dado ao grupo de ciclídeos constituído por três gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. São nativas do Oriente Médio e África, atualmente, todos os gêneros são comercialmente importantes, sendo o gênero *Oreochromis* o mais cultivado, e 90% desse cultivo, é proveniente da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Wang & Lu, 2015).

Segundo a Organização das Nações Unidas (FAO, 2013), 98% das tilápias são cultivadas fora de seu habitat original (Shelton, 2002). Seguidas das carpas, a tilápia é a espécie mais cultivada no mundo, com 3,95 milhões de toneladas, comparada a produção da aquicultura global de 6,3% (FAO, 2014), e os países que se destacam na produção são: China, Egito, Indonésia, Filipinas e Tailândia (FAO, 2013).

A tilápia possui carne com boas características sensoriais e filés ausentes de espinhas em “Y” (Souza *et al.*, 2004). Possui grande potencial na aquicultura pela facilidade de obtenção de grande número de larvas por meio de desova natural e possibilidade de criação em tanques de terra, tanques-rede, tanques de recirculação e “raceways”. De baixo nível trófico, aceita alimento artificial desde a fase larval e utiliza eficientemente os carboidratos, possibilitando utilização de alimentos alternativos (Tengjaroenkul *et al.*, 2000) para elaborar rações práticas de mínimo custo (Pezzato *et al.*, 2002). Devido a todas essas características, encontram-se difundidas em todo o mundo, em vários países de clima tropical e/ou subtropical e, a partir da década entre 1920 a 1950, passaram a ser cultivadas de forma intensiva (Moreira *et al.*, 2001). No Brasil, a partir de 2002, essa espécie se destacou como a mais cultivada na piscicultura continental (Boscardin, 2008; MPA, 2014).

O Brasil possui condições favoráveis para incrementar a sua produção aquícola. Existem mais de 3,5 milhões de hectares de lâmina d’água em reservatórios de usinas hidrelétricas (ANEEL) e propriedades particulares no interior do país. Atualmente o país produz aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado, sendo 40% cultivados (MPA, 2015). De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2014), atualmente cada região brasileira vem se especializando na criação de determinadas espécies de peixes. Nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, a tilápia tem

grande destaque na aquicultura. A legislação brasileira limita a criação de espécies exóticas nos diferentes corpos d'água, exceto quando a espécie já esteja comprovadamente detectada em uma bacia hidrográfica, de acordo com a Portaria do Ibama nº 145/N, de 29 de outubro de 1998, de 29 de outubro de 1998.

A criação de peixes é a área da produção animal que mais se desenvolve no Brasil. Para atender a expansão desta agroindústria, as técnicas de produção demandam maior nível de intensificação (Furuya, 2010). No entanto, ainda não estão plenamente definidas as exigências da tilápia em todas as fases do seu crescimento, levando em consideração a saúde, segurança alimentar, além da sustentabilidade na produção.

Proteínas e aminoácidos na nutrição de peixes

As proteínas são polímeros resultantes da desidratação de aminoácidos. São as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Ocorrem em todas as células e são responsáveis pela informação genética expressa. São constituídas com o mesmo conjunto de 20 aminoácidos, ligados covalentemente em sequências lineares características (Nelson & Cox, 2002).

Os aminoácidos podem ser classificados em cinco classes principais, tendo como base as propriedades dos seus grupos *R*, em particular sua polaridade, ou tendência para interagir com a água em pH biológico (pH próximo a 7). A polaridade dos grupos *R* pode variar amplamente, desde um comportamento totalmente não polar ou hidrofóbico até um altamente polar ou hidrofílico. Nos grupos *R* não polares e alifáticos (hidrofóbicos) encontram-se a alanina (Ala), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), prolina (Pro) e valina (Val), nos grupos *R* aromáticos: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), grupos *R* não carregados, mas polares: asparagina (Asn), cisteína (Cys), glutamina (Gln), serina (Ser) e treonina (Thr), grupos *R* carregados positivamente: arginina (Arg), histidina (His) e lisina (Lys), e grupos *R* carregados negativamente: aspartato (Asp) e glutamato (Glu) (Wu, 2013).

Devido aos diferentes grupos *R*, cada aminoácido apresenta uma via catabólica única. No entanto, o catabolismo de muitos aminoácidos apresenta uma série de passos em comum, que podem gerar intermediários do ciclo de ácido cítrico. A principal função do ciclo de ácido cítrico é gerar $\text{NADH} + \text{H}^+$ e FADH_2^- , no processo também é gerado CO_2 e GTP. Os intermediários do ciclo de ácido cítrico, formados a

partir da desaminação dos aminoácidos ou originados da glicólise dos carboidratos, também podem ser utilizados como precursores para a biossíntese de novos aminoácidos (Hepher, 1988) (Figura 1).

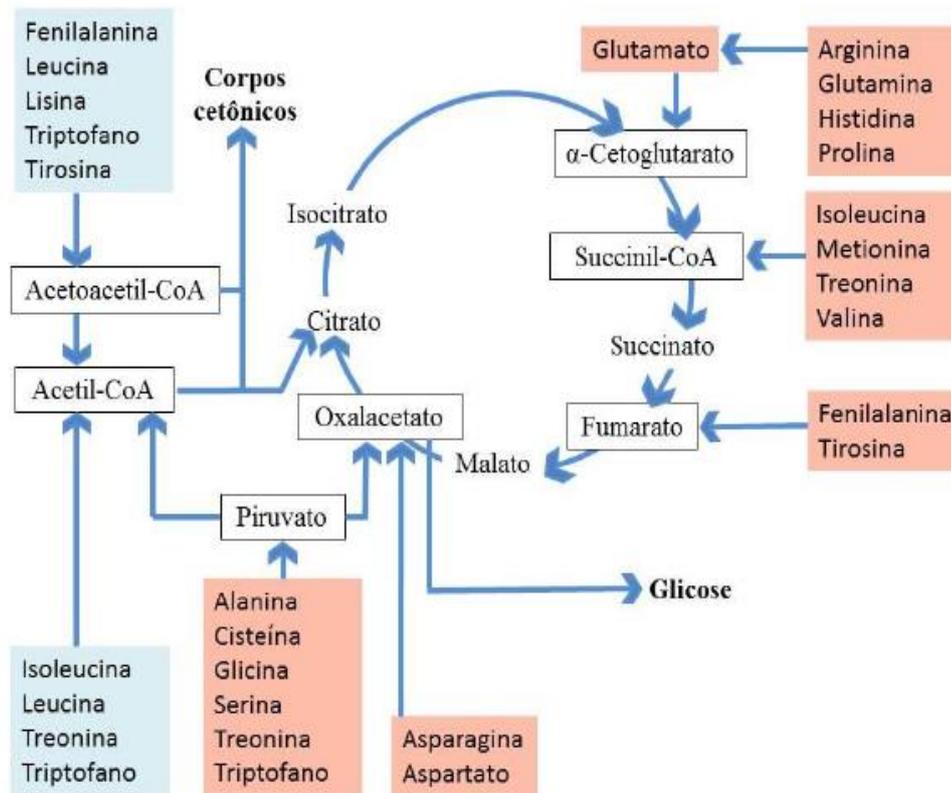


Figura 1: Diferentes vias metabólicas no catabolismo de aminoácidos. Adaptada de Nelson & Cox (2011).

A exigência em proteína para peixes é usualmente expressa como porcentagem da dieta. O nível dietético de proteína deve assegurar quantidade adequada de aminoácidos para atender uma espécie em particular, permitindo que o organismo sintetize suas próprias proteínas para manutenção do desenvolvimento e crescimento adequados (Portz & Furuya, 2012). A exigência em proteína diminui à medida que o peixe cresce, podendo variar de acordo com o regime de criação (Carneiro *et al.*, 1999).

A eficiência de síntese proteica é determinada pelo aminoácido mais limitante, sendo os aminoácidos em excesso degradados e excretados principalmente na forma de amônia (Verstegen & Jongbloed, 2003). Os peixes não possuem uma exigência verdadeira em proteína, mas de dietas com quantidades e proporções adequadas de

aminoácidos essenciais e não essenciais. Assim como outros animais, os peixes exigem dietas com valores adequados dos aminoácidos essenciais: lisina, metionina, treonina, triptofano, arginina, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina (Portz & Furuya, 2012).

A maior demanda de farinha de peixe no mercado mundial para atender as exigências de aminoácidos resultou aumento na procura de fontes alternativas economicamente viáveis para o futuro desenvolvimento na produção de peixes (Bodin *et al.*, 2008), principalmente os de origem vegetal. No entanto, podem apresentar aminoácidos limitantes (Gatlin *et al.*, 2007). Os aminoácidos mais limitantes nos alimentos de origem vegetal são a lisina, metionina e a treonina (Borlogan *et al.*, 2003). Neste sentido, há necessidade de avaliar aminoácidos cristalinos para atender as exigências nutricionais dos peixes, objetivando o melhor desempenho produtivo e saúde dos peixes de forma ambientalmente sustentável.

Estrutura, metabolismo e exigências de treonina

O aminoácido L-treonina (α -amino- β -hydroxybutyric acid) foi isolado a partir de uma proteína por pesquisadores em 1925. Dez anos depois, W. Rose e colaboradores identificaram a treonina como um componente da hidrólise ácida da caseína. A partir desta descoberta, foi possível elaborar dietas purificadas e semipurificadas contendo aminoácidos na forma cristalina para estudos de nutrição (Wu, 2013).

A estrutura química da treonina foi determinada em 1935 e apresenta dois átomos de carbono assimétricos e uma cadeia lateral polar neutra (sem carga líquida), que confere características hidrofílicas que permite o radical polar formar ligações de hidrogênio com a água (Tabela 1).

Tabela 1: Estrutura da treonina (Wu, 2013).

Nome	Símbolo	Fórmula estrutural em pH neutro
Treonina	Thr [T]	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$

A treonina é um aminoácido glicogênico, atuando no processo de formação de glicose que ocorre nos rins e no fígado a partir de precursores não carboidratos. É precursora de aminoácidos não essenciais como a glicina e a serina (Nelson & Cox 2011; Moyes & Schulte, 2010). Com a treonina, ao contrário da maioria dos aminoácidos, não ocorre o processo de transaminação. A treonina é desaminada no fígado, em que o grupo α -amino é separado do esqueleto carbonado, e assume vias metabólicas distintas, porém interconectadas (Davis & Austic, 1982).

Em peixes, o metabolismo da treonina envolve a produção de amônia, conversão dos esqueletos de carbono em glicose, gordura, energia, CO_2 e H_2O e ainda, na formação de derivados não proteicos (Kidd *et al.*, 1996). A amônia produzida por este processo metabólico pode ser utilizada para a biossíntese de aminoácidos ou nucleotídeos, ou ter seu excesso diretamente excretado pelas brânquias. Os esqueletos de carbono resultantes do catabolismo da treonina podem ser direcionados para a gliconeogênese ou para a cetogênese (Figura 1), ou ainda serem completamente oxidados a CO_2 e H_2O . Na via cetogênica, o acetil-CoA é produzido a partir da degradação da treonina que é posteriormente convertida em β -hidroxibutirato (Davis & Austic, 1982).

A amônia é o centro do metabolismo dos aminoácidos. Ela é utilizada na síntese dos aminoácidos por meio de reações que adicionam a amônia ao esqueleto de carbono para criar um aminoácido que pode ser utilizado na biossíntese de proteínas. Quando as proteínas são degradadas, os aminoácidos são quebrados para produzir esqueletos de carbono que podem ser usados para o metabolismo energético. Peixes de água doce normalmente são amoniotélicos e gastam menos energia necessária para metabolizar o resíduo nitrogenado na forma de amônia (Moyes & Schulte, 2010).

A treonina é um aminoácido essencial e limitante em dietas para tilápias, e a exigência dietética varia de 11,1 g/kg (3,96% da proteína bruta) a 13,5 g/kg (5,51% da proteína bruta) (Furuya, 2010; NRC, 2011), sendo o primeiro aminoácido limitante para a produção de imunoglobulinas e mucina, sintetizada em grande quantidade pelos peixes no trato digestório e no recobrimento da pele (Tibaldi & Tulli, 1999).

Segundo D'Mello (2003), os valores médios exigidos de treonina relatados para diferentes espécies de peixes variam entre 2,0 a 5,0% da proteína bruta da dieta, demonstrados em estudos estabelecidos para diversas espécies peixes como bagre do canal, (*Ictalurus punctatus*), carpa comum, (*Cyprinus carpio*), tilápia do Nilo, "Mrigal carp", (*Cirrhinus mrigal*), catfish indiano, (*Heteropneustes fossilis*), carpa indiana,

(*Labeo rohita*), salmão do Atlântico, (*Salmo salar*) e truta arco-íris, (*Oncorhynchus mykiss*) (NRC, 2011).

Santiago & Lovell, (1988) determinaram a exigência de 1,05% na dieta ou 3,75% da proteína da dieta treonina para alevinos de tilápia do Nilo. Valores próximos foram descritos para a truta arco-íris, de 3,4% da proteína da dieta (Ogino, 1980), carpa, 3,9% da proteína e enguia, 4,0% da proteína (Nose, 1979). Porém, valores inferiores foram descritos para o bagre do canal, (2,21% da proteína) e salmão chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), 2,25% (Wilson *et al.*, 1978), e de 2,93% para a tilápia moçambica (*Oreochromis mossambicus*) (Jaunsey *et al.*, 1983). Na tabela 2, encontram-se as exigências de treonina de algumas espécies de peixes.

Tabela 2: Exigências de treonina para algumas espécies de peixes.

Nome comum	Nome científico	Thr (g/ kg dieta)	Thr (%PB dieta)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Referência
Tilápia do Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	10,5	3,85	0,2	0,9	Santiago & Lovell (1988)
Tilápia do Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	11,1	4,0	1,6	21,5	Bomfim <i>et al.</i> (2008)
Tilápia do Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	13,5	5,0	37,6	351,5	Silva <i>et al.</i> (2006)
Tilápia do Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	11,5	4,0	563,3	785,6	Michelato <i>et al.</i> (2015)
Carpa maior da Índia	<i>Cirrhinus mrigala</i>	18,0	4,5	0,5	1,8	Ahmed <i>et al.</i> (2004)
Carpa maior da Índia	<i>Labeo catla</i>	15,1	3,8	0,6	1,8	Abidi & Khan (2008)
Carpa maior da Índia	<i>Catla catla</i>	14,1	4,3	0,6	6,9	Zehra & Khan (2014)
Carpa chinesa	<i>Cyprinus carpio</i>	16,2	5,2	13,6	50,7	Feng <i>et al.</i> (2013)
Truta arco-íris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	8,0	2,1	1,8	5,3	Bodin <i>et al.</i> (2008)
Salmão do Atlântico	<i>Salmo salar</i>	8,0	2,1	0,8	1,9	Bodin <i>et al.</i> (2008)
Salmão do Atlântico	<i>Salmo salar</i>	13,1	2,5	79,4	165,7	Helland & Helland (2011)
Salmão do Atlântico	<i>Salmo salar</i>	13,3	2,4	39,3	89,9	Helland <i>et al.</i> (2013)
Catfish indiano	<i>Heteropneustes fossilis</i>	12,7	3,2	3,6	10,2	Ahmed (2007)
Corvina amarela	<i>Larmichthys crocea</i>	19,6	4,2	6,0	17,8	He <i>et al.</i> (2015)

Thr= treonina; PB=proteína bruta

Estudos relacionados à exigência de treonina para suínos (Stoll *et al.*, 1998; Burrinet *et al.*, 2001; Bertolo *et al.*, 1998) descreveram que cerca de 40-50% do consumo de treonina é metabolizado no intestino. Isso implica que boa parte da exigência de treonina não está associada com a deposição de proteína muscular, e sim com as funções metabólicas do intestino. Segundo Le Bellego *et al.* (2002), grande fração de treonina dietética é absorvida na parte superior do intestino. Esta absorção é muito importante, pois elevados teores de treonina são exigidos durante o processo digestivo, por meio das secreções digestivas (células caliciformes). A camada de muco secretado pelas células caliciformes espalhadas ao longo das vilosidades do intestino, atuando na proteção deste tecido, contra danos físicos e da ação das enzimas digestivas, durante a passagem do bolo alimentar. O muco é composto principalmente de água (95%) e mucinas (5%). As mucinas possuem peso molecular elevado e são ricas em treonina (Corfield *et al.*, 2001).

Considerando que existem poucas informações sobre as exigências de treonina para tilápias relacionadas a estudos mais detalhados sobre a expressão dos genes e associadas ao crescimento muscular, é importante determinar a exigência de treonina para a tilápia do Nilo, uma vez que a deficiência ou excesso de treonina afetam negativamente a utilização de aminoácidos essenciais e não essenciais e, conseqüentemente a retenção de proteína corporal e o crescimento dos peixes.

Tecido muscular estriado esquelético e Fatores de Regulação Miogênica (MRFs)

O tecido muscular estriado esquelético é um tecido complexo, dinâmico e possui características peculiares de adaptação morfológica, metabólica e funcional frente aos mais variados estímulos (Acosta *et al.*, 2005; Pette & Staron, 2000). Essas características tornam o músculo extremamente importante para a adaptação dos organismos ao seu habitat.

Em peixes, a maior parte da massa corporal é representada pelo tecido muscular estriado esquelético que constitui de 40 a 60% do peso total do animal, além de representar um mecanismo específico para a adaptação desses animais ao meio aquático (Bone, 1978). Também serve como reserva de proteína, que pode ser utilizada em atividades que requer grande demanda energética (Weatherley & Gill, 1985).

O músculo dos peixes teleósteos é formado pelos músculos axiais, responsáveis pela movimentação durante a natação, em que flexionam a coluna

vertebral e a região caudal. Estão divididos em porção epaxial e hipoaxial por meio de um septo lateral ou transverso (horizontal), de tecido conjuntivo, localizado na região do nervo da linha lateral (Alexander, 1969; Videler, 2011).

Na maioria das espécies de peixes, o músculo esquelético é constituído por unidades morfofuncionais, os miômeros, que possuem formato em “W” e se repetem ao longo de todo o corpo, estando inseridos por curtos tendões em bainhas de tecido conjuntivo, os chamados miosseptos (Alexander, 1969). Essa disposição em “W” confere a esses animais maior mobilidade e destreza durante a realização dos movimentos natatórios (Van Leeuwen, 1999).

As fibras musculares são classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas (Ogata, 1958). O compartimento vermelho, normalmente, corresponde entre 10% e 30% de toda a musculatura miotomal, é constituído por fibras musculares vermelhas com velocidade de contração lenta, alta concentração de mioglobina, apresenta um excelente suprimento sanguíneo, e metabolismo oxidativo, caracterizado por fibras de pequeno diâmetro (entre 25 e 45 μm) (Greer-Walker & Pull, 1975; Bone, 1978; Johnston, 1981; Sanger & Stoiber, 2001). Pode estar localizado na regiao subdermal, como uma camada fina e uniforme ao longo de todo o corpo do animal (Egginton & Johnston, 1982; Dal Pai-Silva *et al.*, 1995) ou apresentar uma distribuiao mais localizada, aparecendo somente na regiao do nervo da linha lateral, em que assume um aspecto triangular (Hoyle *et al.*, 1986; Sanger & Stoiber, 2001).

O compartimento branco (musculatura branca) corresponde a aproximadamente 70% do volume total do tecido muscular (Sanger e Stoiber, 2001). Essa proporao varia ao longo do comprimento do peixe com maior proporao na regiao anterior do animal e com grande declnio em direao a regiao caudal (Zhang *et al.*, 1996). As fibras musculares brancas possuem velocidade de contraao rapida e metabolismo glicoltico, poucas mitocôndrias e lipídeos, apresentam maiores diâmetros (entre 50 e 100 μm) e menor suprimento de capilares sanguíneos; possuem baixa concentraao de mioglobina e poucas mitocôndrias (Sanger e Stoiber, 2001). A musculatura contendo fibras musculares brancas e recrutada nos movimentos bruscos de nataao, como a captura de alimento e fuga de predadores (Altringham e Johnston, 1981).

O compartimento intermediário (musculatura intermediária) possui fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias em relaao as das fibras musculares brancas e vermelhas caracterizadas pela contraao rapida e metabolismo

oxidativo/glicolítico (Johnston, 1981). O diâmetro destas fibras musculares pode variar, dependendo da arquitetura do músculo de cada animal, conforme observado na Figura 2.

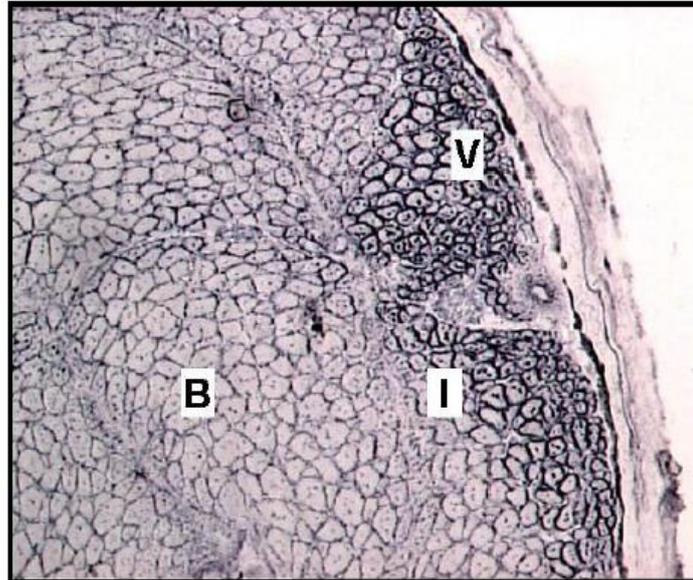


Figura 2: Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo (*O. niloticus*), após a reação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazolium Redutase NADH-TR, demonstrando a musculatura distribuída nos compartimentos vermelho (V), intermediário (I) e branco (B). Adaptado de Aguiar *et al.* (2005).

O crescimento muscular nos peixes ocorre mediante a proliferação e a diferenciação dos mioblastos (Alfei *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 2000). A formação das primeiras fibras musculares ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, já nos mamíferos a hiperplasia cessa em um curto período após o desenvolvimento embrionário (Goldspink *et al.*, 1972; Johnston *et al.*, 2000).

Quando ativados por sinais celulares ou extracelulares, os mioblastos proliferam-se, diferenciando-se e os núcleos são internalizados as fibras musculares pré-existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, esse processo é conhecido como hipertrofia, e ocorre o aumento no diâmetro ou área das fibras (Koumans & Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowlerson & Veggetti, 2001). Por outro lado, os mioblastos em proliferação podem agregar-se à superfície de fibras musculares pré-existentes e formar novos miotubos multinucleados, esse processo é

conhecido como hiperplasia, e os miotubos se separam das fibras, originando novas fibras musculares (Johnston, 1999; Johnston *et al.*, 2000) (Figura 3).

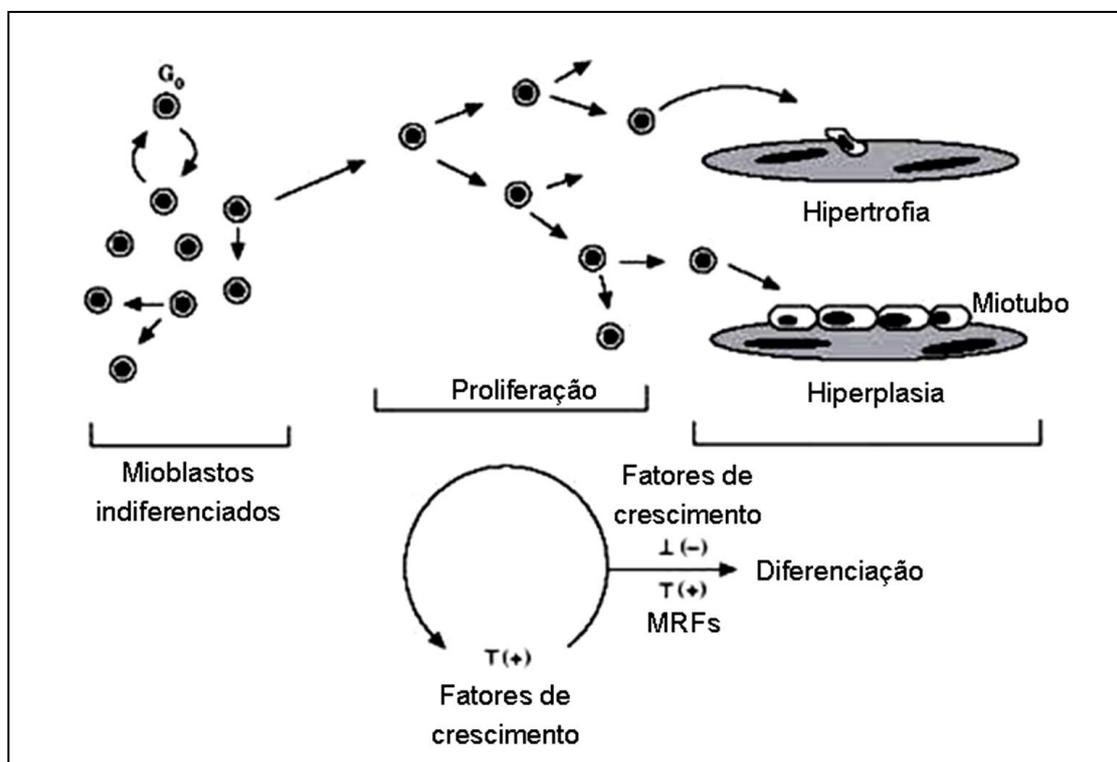


Figura 3: Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia. A população de mioblastos indiferenciados contribui para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético sob a influência dos Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) e dos Fatores de Crescimento. (Adaptado de Johnston, 1999).

A relativa contribuição para o crescimento muscular por meio dos processos de hiperplasia e hipertrofia tem sido estudada em muitas espécies de peixes, sendo verificado que nas espécies de crescimento rápido e que atingem tamanho final maior, a hiperplasia das fibras persiste por um período de tempo maior (Kiessling *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001; Carani *et al.*, 2008) em que novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento (Weatherley *et al.*, 1988; Alami-Durante *et al.*, 1997; Rowleron & Veggetti, 2001). Por outro lado, nas espécies que atingem menor tamanho, a hiperplasia das fibras cessa nos estágios iniciais de desenvolvimento e a hipertrofia ocorre por meio das fibras formadas nas fases iniciais da embriogênese (Veggetti *et al.*, 1993; Koumans & Akster, 1995).

Alguns genes envolvidos com a proliferação e diferenciação dos mioblastos têm sido identificados em várias espécies de peixes. Entre esses, estão os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) (Rescan, 2001), que são fatores de transcrição, dos quais fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4, que compartilham um domínio altamente conservado, conhecido como *basic helix-loop-helix* (bHLH). Os MRFs reconhecem, por meio de seu domínio básico, uma sequência consenso no DNA conhecida como *E-box* (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo específicos (Lassar *et al.*, 1989; Murre *et al.*, 1989; Blackwell & Weintraub, 1990). A região HLH dos MRFs constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47 (Murre *et al.*, 1989). A ligação do heterodímero MRF-proteína E ou de homodímeros dos MRFs sequência *E-box* ativa a transcrição de genes músculo específicos, levando a sua expressão (Murre *et al.*, 1989, Lassar *et al.*, 1991).

Durante o crescimento muscular, os mioblastos quiescentes são ativados e os MRFs primários, MyoD e Myf5, determinam a sua proliferação, enquanto a expressão dos fatores secundários, Miogenina e MRF4, está relacionada com a diferenciação das células satélites em fibras musculares maduras (Megoney & Rudnicki, 1995; Rudnicki & Jaenisch, 1995; Watabe, 1999, 2001).

Poucos são os estudos sobre a expressão dos MRFs durante o crescimento muscular de tilápias. Nos peixes, a taxa de crescimento muscular pode ser afetada por diversos fatores ambientais, incluindo os nutricionais (Johnston, 2006). O balanceamento de aminoácidos de uma dieta pode alterar a taxa de miogênese (tempo de proliferação e diferenciação de mioblastos), o número e diâmetro das fibras musculares brancas e os padrões de expressão de genes relacionados com o desenvolvimento muscular na fase inicial da vida dos peixes podendo refletir em mudanças no crescimento do animal adulto (Alami-Durante *et al.*, 2010).

Brânquias

As brânquias são constituídas de filamentos que se apoiam em arcos cartilagosos (arcos branquiais). Nesses arcos ainda se apoiam os rastros branquiais, que são estruturas especializadas na retenção e seleção dos alimentos encontrados na

água que se comunicam diretamente com a faringe. Nelas se ramifica uma extensa rede capilar sanguínea, protegida por uma delgada membrana (Moreira *et al.*, 2001).

A maioria dos teleósteos usam as brânquias como a principal superfície respiratória. Os peixes teleósteos possuem quatro pares de arcos branquiais que se estendem desde o assoalho até o teto da cavidade bucal. Cada um dos quatro pares é sustentado por um esqueleto cartilaginoso com músculos estriados abdutores, facilitando a movimentação dos arcos branquiais para favorecer a função respiratória (Genten *et al.*, 2009). Cada arco branquial contém um vaso sanguíneo aferente e um eferente. O vaso sanguíneo ramifica-se em uma série de vasos capilares filamentosos aferentes que passam ao longo dos filamentos, carregando sangue para as superfícies respiratórias. Os capilares convergem então em vasos filamentosos eferentes que carregam sangue oxigenado de volta para o vaso sanguíneo eferente no arco branquial (Moyes & Schulte, 2010).

Para a passagem da água, a água entra pela boca, percorre a faringe, passa através dos arcos branquiais e sai pela abertura do opérculo; à medida que a água passa pelos filamentos branquiais, o oxigênio (O_2) nela dissolvido penetra nos capilares que irrigam esse filamento, ao mesmo tempo em que o gás carbônico (CO_2) passa do sangue para a água (Moreira *et al.*, 2001).

Como na maioria dos epitélios de transporte, o epitélio das brânquias dos peixes possui diversos tipos de células envolvidas no controle do equilíbrio hídrico e iônico, além de células secretoras de muco espalhadas sobre a superfície das brânquias (Moyes & Schulte, 2010). O muco produzido pelos peixes faz parte de seu próprio mecanismo de defesa. O muco contém substâncias que inibem o crescimento e o desenvolvimento de muitos parasitos, bactérias e fungos (Moraes & Martins, 2004).

As glândulas mucosas produzem secreção densa e viscosa (mucina), ajudando na formação de uma cobertura protetora sobre o revestimento de órgãos ocos que se comunicam com o exterior do corpo. Essa cobertura protetora chama-se muco e contém restos de células epiteliais e de leucócitos, além de mucina. As células das unidades secretoras de muco são repletas de mucinógeno, o precursor da mucina. Os núcleos encontram-se deslocados na direção da parte basal da célula e, em geral, achatados contra a membrana celular (Eurrell & Frappier, 2012).

As células mucosas são uma característica proeminente do epitélio branquial. A importância biológica da interface rica do muco entre os peixes e seu ambiente aquoso abrange funções tão diversas como, a regulação iônica, a proteção mecânica e

imunológica. Outras células encontradas nos filamentos branquiais incluem melanócitos, linfócitos, macrófagos e células neuroepiteliais (Genten *et al.*, 2009).

No epitélio branquial são encontradas as células pavimentosas que são as mais numerosas; as células mucosas, que são responsáveis pela secreção de mucosubstâncias, e as células-cloreto, que são as responsáveis pela absorção de íons Cl^- e Ca^{2+} nos peixes de água doce (Sakuragui *et al.*, 2003) Figura 4.

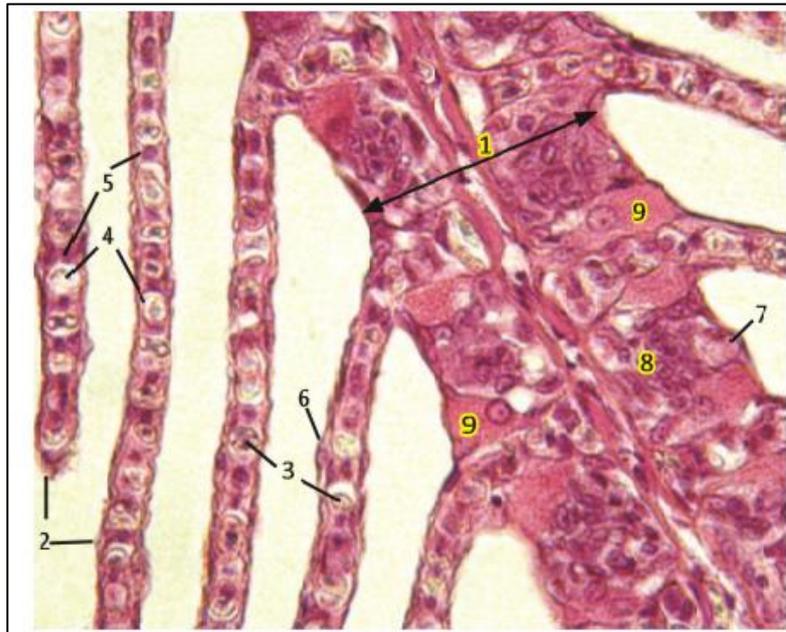


Figura 4: **Enguia-europeia (*Anguilla anguilla*) (Hematoxilina-Eosina) Brânquia.** Corte longitudinal entre a lamela primária e secundária. 1. Filamento primário ou secundário branquial – 2. Lamela secundária com capilar central – 3. Lúmen capilar e eritrócitos na lamela secundária – 4. Lacuna (lúmen capilar) 5. Células pilares (forma oval) – 6. Células epiteliais (epitélio respiratório) – 7. Célula mucosa – 8. Células não diferenciadas – 9. Células de cloreto (com núcleo arredondado mostrando o nucléolo proeminente) Adaptado de Genten *et al.* (2009).

Alterações que possam comprometer a função respiratória ocorrem em virtude dos efeitos diretos e indiretos de contaminantes do meio aquático (Mazon *et al.*, 2002b; Fernandes *et al.*, 2007). As alterações mais comuns encontradas nas brânquias dos peixes e previamente descritas são: (a) elevação epitelial, que se trata de uma elevação ou destacamento do epitélio lamelar e ocorre como primeiro sinal de patologia, (b) hiperplasia, proliferação de células do epitélio filamentar, que conduz, por vezes, à fusão parcial ou total das lamelas branquiais, esse aumento do epitélio pode ser pela proliferação de células de cloreto e de células indiferenciadas, (c) telangectasias, que consistem em um extravasamento de sangue no interior da lamela (Halver *et al.*, 1975;

Lim & Lovell, 1978; Cavichio *et al.*, 2000). Essas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa, porque diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1985; Erkemen & Kolankaya, 2000). Essas respostas dificultam o acesso do poluente ao sangue prejudicando, contudo, a realização de trocas gasosas (McDonald & Wood, 1993).

Uma série de agentes parasitários também podem causar problemas em criações de tilápias. A pele e as brânquias são os locais mais comuns de infestação parasitária. (Anderson & May, 1979). Protozoários do gênero *Trichodina sp.*, além de monogenoideos podem ocasionar problemas em criações desta espécie e são de grande importância, principalmente em intensas infestações quando o ambiente se encontra favorável para sua reprodução, ou seja, em situações em que ocorre deterioração ambiental que condiciona a redução do pH e do oxigênio dissolvido (Moraes e Martins, 2004), podendo, assim, causar espoliações junto às brânquias e pele dos animais, predispondo-os a problemas respiratórios e infecções secundárias (Zanolo & Yamamura, 2006).

As brânquias possuem uma camada de muco secretada pelas células de muco espalhadas ao longo dos filamentos branquiais, que são responsáveis pela proteção do tecido, contra agentes parasitários, bem como, atuam na proteção contra a abrasividade da contínua passagem da água filtrada durante a oxigenação do sangue. As células de muco são ricas em treonina esta por sua vez, é constantemente requerida para as funções metabólicas do peixe. Estudos sobre a inclusão de treonina em dietas para peixes com o intuito de avaliar a frequência de células de muco são escassos, e a inclusão de treonina na dieta pode ser uma importante ferramenta de proteção, otimizando o desempenho produtivo e garantindo maior proteção aos peixes.

Intestino

O intestino dos peixes apresenta grande diversidade estrutural, variando até mesmo em espécies com hábitos alimentares semelhantes (Buddington *et al.*, 1997; Reifel & Travill, 1979). De acordo com estes hábitos, os peixes podem ser classificados em: fitoplantofagos, zooplantofagos, predadores, iliófagos, herbívoros e onívoros (Rotta, 2003).

De forma geral, intestinos mais longos, ocorrem em espécies que se alimentam de itens pouco digestíveis como as herbívoras e detritívoras, ao passo que intestinos mais curtos são encontrados em espécies carnívoras. Em peixes onívoros, o comprimento intestinal é intermediário e varia conforme a proporção dos diferentes tipos de alimentos consumidos (Kapoor *et al.*, 1975).

A tilápia do Nilo possui hábito alimentar fitoplanctófago, com tendência onívora, ingerem todo o tipo de material orgânico disponível na água. Possuem boca de tamanho mediano, comem moluscos, sementes, vegetais, crustáceos e na falta de alimentos sólidos, podem filtrar e ingerir organismos planctônicos (Moreira *et al.*, 2001).

O tubo digestivo inicia-se na boca e termina no orifício anal. Dilatações e estreitamentos desse tubo determinam seus diferentes compartimentos ou partes constituintes. Podemos dividi-lo em três partes: (a) Intestino cefálico (cavidade bucofaríngea), (b) Intestino anterior (esôfago e estômago) e (c) Intestino posterior (inicia-se na região pilórica ou região dos cecos pilóricos (quando presentes), e corresponde ao intestino verdadeiro, em que ocorrem os processos químicos da digestão e absorção de alimentos, no final do intestino médio, encontramos uma região mais delgada, que corresponde ao reto, terminando no ânus ou cloaca (Moreira *et al.*, 2001).

Nos peixes, o trato digestório consiste em um tubo composto por lúmen e uma parede formada basicamente por quatro camadas distintas: (a) Muscular da mucosa: é composta por um revestimento epitelial e lamina própria (tecido conjuntivo frouxo, vascularizado, contendo nervos e leucócitos), (b) Submucosa: que consiste em uma camada adicional de tecido conjuntivo, (c) Túnica muscular: é formada por camadas longitudinais e circulares de músculo estriado, (d) Serosa: é uma camada de tecido frouxo, rica em vasos sanguíneos e revestida por células mesoteliais (Genten *et al.*, 2009; Wilson e Castro, 2011).

A maior concentração de células mucosas e o espessamento da camada muscular no intestino distal estão relacionados com a lubrificação e condução do bolo fecal, respectivamente (Reifel e Travill, 1979). Já o maior desenvolvimento da mucosa na região proximal do intestino indica predomínio da absorção de nutrientes nesta porção (Rodrigues *et al.*, 2010; Seixas Filho *et al.*, 2001)

Os peixes vivem em um ambiente rico em microrganismos oportunistas e a camada de muco recobre a superfície da pele, brânquias e intestino, tem funções mecânicas protetoras (Anbuezhian *et al.*, 2011). O epitélio do trato digestório dos

peixes é altamente revestido por substâncias mucosas variadas, de grande importância fisiológica nos processos digestivos e na proteção contra injúrias mecânicas e químicas (Kapoor *et al.*, 1975).

O muco é secretado por meio das células caliciformes (Tytgat *et al.*, 1996). A camada de muco contém grande quantidade de moléculas de mucina, que formam um gel viscoso que protege o epitélio gastrointestinal contra-ataque constante de fluidos digestivos, microrganismos e toxinas (Forstner *et al.*, 1995). Além disso, esse muco forma uma camada que protege o epitélio de infecções provenientes de bactérias patogênicas (Linden *et al.*, 2008). É constituído primariamente por glicoproteínas, porém numerosas substâncias têm sido identificadas, incluindo compostos químicos como: citocinas, peptídeos, lisozimas, lipoproteínas, lectinas, proteases e anticorpos. Muitos destes componentes atuam na defesa contra agentes patogênicos diretamente ou indiretamente, possuindo atividade antimicrobiana natural (Cain & Swan, 2011).

O muco também favorece o estabelecimento e manutenção de uma microbiota que antagoniza bactérias potencialmente patogênicas. A espessura final, a composição, e efeito protetor do muco são determinados pelo equilíbrio dinâmico entre processos anabólicos (secreção a partir de células caliciformes) e catabólicos (física e degradação proteolítica) (Faure *et al.*, 2006).

A treonina, glutamina, glutamato, arginina, e cisteína estão envolvidos em muitos processos de manutenção, em particular, no sistema de vigilância imunológica e nos processos de reparação da mucosa intestinal. O intestino possui uma barreira de antígenos contra bactérias provenientes dos alimentos. Grandes quantidades de glutatona que são sintetizados pelo intestino para proteção contra danos oxidativos (Jahoor *et al.*, 1995) e grandes quantidades de mucina são secretadas para criar uma barreira para a translocação de bactérias (Wu *et al.*, 1996).

Comparado com outras proteínas intestinais, o muco intestinal é particularmente rico em treonina (acima de 30%) (Neutra & Forstner, 1987), sugerindo que este aminoácido está diretamente relacionado com o funcionamento e manutenção intestinal, que por sua vez, ocasiona elevada retenção deste aminoácido pelo intestino, podendo causar prejuízo para a síntese proteica (Fraure *et al.*, 2005)

Estudos avaliando a inclusão da treonina em dietas para peixes e sua atuação sobre a frequência de células secretoras de muco intestinal ainda não foram reportados até o momento na literatura, podendo ser utilizados como fonte de referência em estudos envolvendo a utilização da treonina como aminoácido funcional em peixes.

Hematologia

A hematologia vem se tornando um importante instrumento no conhecimento das alterações fisiológicas dos peixes (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004), revelando informações importantes para o diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes (Tavares-Dias, 2003).

O peixe, sob efeito de agente estressor, desencadeia respostas denominadas respostas ao estresse que podem ser divididas em primárias (que são mediadas pelos hormônios catecolaminas e cortisol que atingem todo o organismo, provocando os efeitos secundários) (Wedemayer, 1996; Bartom, 2002). As respostas secundárias compreendem os vários efeitos bioquímicos e fisiológicos associados com o estresse, tais como: hiperglicemia, aumento das proteínas totais e modificação hematológica (Affonso *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2007). As respostas terciárias atingem o organismo como um todo, comprometendo o crescimento, a reprodução e o sistema imunológico do organismo (Cavichiolo, 2009).

O estudo hematológico é uma ferramenta auxiliar para avaliar as alterações dos padrões hematológicos de referência, utilizada também como ferramenta para o diagnóstico de estresse animal, no desequilíbrio influenciado pelo meio ambiente ou pela presença de agentes infecciosos, bem como, distúrbios morfológicos nas células sanguíneas (Bicudo *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2009).

O sangue é responsável pela distribuição de calor, equilíbrio ácido-básico e osmótico dos tecidos, transporte de gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo. A presença, quantidade e proporção das diferentes células presentes no sangue periférico (vascular) refletem no estado fisiológico do organismo, apresentando ampla variação em função de fatores externos e internos (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004; Junqueira & Carneiro, 2011).

O sangue é um tecido líquido, móvel, do tipo conjuntivo, contido num compartimento fechado, o aparelho circulatório, que o mantém em movimento regular e unidirecional, devido essencialmente as contrações rítmicas do coração (Junqueira & Carneiro, 2011). É constituído por células em suspensão em um fluido intercelular denominado, plasma (fase líquida), formado por 90% de água, 7% de proteínas (globulinas e albumina) e 3% de solutos, como eletrólitos. A fase sólida é composta por elementos figurados, como os glóbulos vermelhos (eritrócitos) e os glóbulos brancos

(linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e célula granulocítica especial) e trombócitos (Feldman *et al.*, 2000).

Os principais tipos de células sanguíneas dos peixes são os glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos) e os trombócitos. Em peixes, como em outros vertebrados não mamíferos, os eritrócitos possuem forma oval e contêm sempre um núcleo. O citoplasma contém a hemoglobina. O número de eritrócitos varia de acordo com as espécies, bem como a idade do indivíduo, da estação e condições ambientais (Genten *et al.*, 2009).

O volume de sangue dos peixes (sem estresse) é em torno de 1,5 a 3,0% do peso vivo em teleósteos e cerca de 6,0% nos elasmobrânquios (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004). Diferentemente dos mamíferos, os peixes têm vários centros hematopoiéticos (rim cefálico, baço, fígado, entre outros). Caso uma enfermidade comprometa o principal centro hematopoiético, outros órgãos podem assumir a produção de células, tornando-se mais complexa a caracterização do quadro leucocitário dos peixes com lesão dos órgãos (Feldman *et al.*, 2000).

Em sistemas aquícolas as situações de estresse são bastante comuns, seja pelas variáveis naturais como as condições ambientais e climáticas, ou mesmo em sistemas controlados, resultando em consequências negativas para a produção de peixes, tais como: redução no desempenho, aparecimento de doenças e até alterações morfológicas que comprometam estruturas vitais dos peixes. (Cavichiolo, 2009). Assim, o estudo hematológico pode ser uma excelente ferramenta com o propósito de monitoramento e diagnóstico de alterações na saúde, bem como de suas possíveis correlações com o estado nutricional e o desempenho dos peixes.

Referências bibliográficas:

- Abidi, S.F & Khan, M.A (2008) Dietary threonine of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Research*; **39**, 1498-1505.
- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., Gonzalez, O., Estrada, M.P. (2005) Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of Biotechnology*.**119**, 324-331.
- Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Corrêa, C.F., Mazon, A.F., Araújo, M.R.R., Moraes, G., Rantin, F.T. (2002) Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma*

- macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry. Physiology*, **133**, 375-382.
- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L. E., Dal Pai-Silva, M. (2005) Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of Fish Biology*.**67**, 1-12.
- Aguiar, D.H., Bock, C., Padovani, C.R., Dal Pai-Silva, M. (2008) MyoD, Myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research*, **39**,1673-1679.
- Ahmed, I. (2007) Dietary amino acid L-threonine requirement of fingerling Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) estimated by growth and biochemical parameters. *Aquacult Interact*; **15**, 337-350.
- Ahmed, I., Khan, M., Jafri, A.K. (2004) Dietary threonine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton).*Aquaculture Research*; **35**, 162-170.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A.M., Bergot, P. (1997) Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth rate. *Journal of Fish Biology*.**50**, 1285-1302.
- Alami-Durante, H., Wrutniak-Cabello, C., Kaushik, S.J., Médale, F. (2010) Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **156**, 561–568.
- Alexander, R. (1969) The orientation of muscle in the myomers of fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom***49**, 263-290
- Alfei, L., Onali, A., Spano, L., Columbari, P.T., Altavista, P.L. and De Vita, R. (1994) PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). *European Journal of Histochemistry*.**38**, 151-162.
- 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. (2010) Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*, **41**, 997-1004.
- Altringham, J. D. & Johnston, I. A. (1981) Quantitative histochemical studies of the peripheral innervation of cod (*Gadus morhua*) fast myotomal muscle fibres.*Journal of Comparative Physiology*, **143**(1), 123-127.

- Anbuezhian, R., Gobinath, C., Ravichandran, S. (2011) Antimicrobial Peptide from the Epidermal Mucus of Some Estuarine Cat Fishes. *World Applied Sciences Journal*, **12**, 256-260.
- Anderson, R.M. & May, R.M. (1979) Population biology of infectious disease: part I. *Nature*, **280**, N.5721, 361-367.
- Andrade, J.I.A., Ono, E.A., Menezes, G.C., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Tavares-Dias, M., Marcon, J.L., Affonso, E.G. (2007) Influence of diet supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry Physiology*, **146A**: 576-580.
- Araújo, C.S.O, Tavares-Dias, M., Gomes, A.L.S., Andrade, S.M.S., Lemos, J.R.G., Oliveira, A.T., Cruz, W.R., Affonso, E.G. (2009) Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: Tavares-Dias, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 389-424.
- Barton, B.A. (2002) Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids, *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 517-525.
- Bertolo, F. P., C. Z. L. Chen, G. Law, P. B. Pencharz, R. O. Ball. (1998) Threonine requirement of neonatal piglets receiving total parenteral nutrition is considerably lower than that of piglets receiving an identical diet intragastrically. *Journal Nutrition*, **128**, 1752-1759.
- Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Cyrino, J.E.P. (2009) Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. *Aquaculture Research*, **40**, 486-495.
- Blackwell, T. & Weintraub, H. (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, **250**, 1104-1110.
- Bodin, N., Mambrini, M., Wauters, J.B., Abboudi, T., Ooghe, W., Boulenge, E.L., Larondelle, Y. & Rollin, X. (2008) Threonine requirements for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the fry stage are similar. *Aquaculture*, **274**, 353-365.
- Bomfim, M.A.D., Lanna, E.A.T., Dozele, J.L., Quadros, M., Ribeiro, F.B., Araújo, W.A.G. (2008) Exigência de treonina, com base no conceito de proteína ideal, de alevinos de tilápias do Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **37**, 2077-2084.
- Bone, Q. (1978) Locomotor muscle. *Fish physiology*, **7**, 361-424. Elsevier.
- Borlongan, I.G., Eusebio, P.S., Welsh, T. (2003) Potential of feed pea (*Pisum sativum*) meal as a protein source in practical diets for milkfish (*Chanos chanos* Forskal). *Aquaculture*. **225**, 89-98.

- Boscardim, N.R. (2008) Potencial para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil. *In: Ostrensky, A., Borguetti, J.R., Soto, D. Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer.* Brasília, 276p.
- Buddington, R.K., Krogdahl, A., Bakke-Mckellep, A.M. (1997) The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica*, **167**, 67-80.
- Burrin, D. G., B. Stoll, J. B. Van Goudoever, P. J. Reeds.(2001) Nutrients requirements for intestinal growth and metabolism in the developing pig. *In: Digestive physiology of pigs proceedings of the 8th symposium.* pp. 75-88. CABI Publishing.
- Cain, K. & Swan, C., (2011). Barrier function and immunology. *In*Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J.The multifunctional gut of fish: Fish Physiology: First Edition, Elsevier Inc. v.30, 2011.
- Campion, D.R. (1984)The muscle satellite cells. *Int. Ver. Cytol.* **87**, 225-251.
- Carani, F.R., Aguiar, D.H., Almeida, F.L.A., Gonçalves, H.S., Padovani, C.R., Dal-Pai Silva, M.(2008) Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). *Acta Scientiarum Biological Sciences.* **30**, 205-211.
- Carneiro, P.C.F., J.E.P. Cyrino, Castagnolli. (1999) Produção da tilápia vermelha da Flórida em tanques-rede. *Scientia Agricola.* **56**, 673-679.
- Castagnolli, N.Prefácio *In: Furuya, W.M. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias.* Toledo: GFM, 2010, 100p.
- Cavichiolo, F. (2009). Histologia: ferramenta importante para estudos em peixes cultivados *In: Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo – Tavares-Dias, M.; Embrapa Amapá; 1ª edição.* 724p.
- Cavichiolo, F., Vargas, L.D., Natali, M.R., Moreira, H,L.M., Ribeiro, R.P., Silva, L.C.R. (2000)Histologia de brânquias de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a diferentes níveis de vitamina C (ácido ascórbico) na dieta. *Braz. J. Morph. Sc.*, **17**, 88.
- Corfield, A., D. Caroll, N. Myerscough, C. Probert. (2001) Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease.*Frontiers in Bioscience*,**6**, 1321-1357.
- D’Mello, J. P. F. (2003) *Amino acids in farm animal nutrition.*Wallingford: CAB International, 379-389.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R. (2000) Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anatomy, Histology and Embriology*, **29**, 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R.F., Pellizzon, C. H., Dal Pai, V. (2003a). Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell.* **35**, 179-187.

- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Carvalho, R.F. (2005) Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho, H.F.; Collares-Buzato, C.B. (Eds.). *Células: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Manole, p. 83-94.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.L., Rodrigues, A.C. (1995) Histochemical study of muscle fiber types in (*Synbranchus marmoratus* Boch, 1795). *Annals of Anatomy* **177**, 65-70.
- Davis, A. T. & Austic, R. E. (1982) Threonine imbalance and the threonine requirement of the chicken. *Journal Nutrition*, **112**, 2170-2176.
- Eggington, S. & Johnston, I.A. (1982) Muscle fiber differentiation and vascularisation in the juvenile European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Cell Tissue Res.* **222**, 563-577.
- Erkmen, B. & Kolankaya, D. (2000) Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* (cyprinid fish) living in two tributaries of Kizilirmak River, turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **64**, 418-425.
- Eurell, J. A. & Frappier, B. L. *Histologia Veterinária de Dellmann* – 6^a ed. Barueri, SP: Manole, 2012, 400p.
- Faure, M., C. Mettraux, D. Moennoz, J. P. Godin, J. Vuichoud, F. Rochat, D. Breuille, C. Obled, Corthesy-Theulaz, I. (2006). Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sodium-treated rats. *Journal of Nutrition*. 136:1558–1564.
- Faure, M., Moennoz, D., Montigon, F., Mettraux, C., Breuille, D., Balleve, O. (2005) Dietary Threonine Restriction Specifically Reduces Intestinal Mucin Synthesis in Rats. *The Journal of Nutrition*, **135**, 486-491.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (2000) *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltda, 1347p.
- Feng, L., Peng, Y., Wu, P, Hu, K., Jiang, W., Liu, Jiang, J., Li, S., Zhou, X. (2013) Threonine Affects Intestinal Function, Protein Synthesis and Gene Expression of TOR in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Journal Pone*, **26**, 1-17.
- Fernandes, M.N., Moron, S.E., Sakuragui, M.M. (2007) Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: Fernandes, M.N., Rantin, T.F., Glass, M.L., Kapoor, B.G. (Ed.). *Fish respiration and environment*. Enfield, NH: Science Publishers, 2007. chap.6, 93-120.
- Fitzsimmons, K. (2004) Development of new products and markets for the global tilapia trade. In: *Proceeding of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, Manila, Philippines (ed. by R. Bolivar, G. Mair & K. Fitzsimmons), pp.624-633. BFAR, Philippines.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO) (2014) *The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges*. Rome, 243p.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)(2013) Food and Agriculture Organization of the United Nations FishStatJ: *A Tool for Fishery Statistics Analysis*, Version 1.0.1. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en> (Accessed 26 March 2013).
- Forstner, J.F., Oliver, M.G., Sylvester, F.A. (1995) Production, structure and biologic relevance of gastrointestinal mucins. *In*: Blaser, M.J., Smith P.D., Ravdin, J.I., Greenberg, H.B., Guerrant, R.L. editors. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: *Raven Press*, 71–88.
- Fuller, M.F. (1994) Amino acid requirements for maintenance, body protein accretion and reproduction in pigs. *In*: *Amino Acids in Farm Animal Nutrition* (D’Mello, J.P.F. ed), pp. 155-184. CABI Publishing, Edinburgh.
- Furuya, W.M. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 2010. 100p.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G.S., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, **38**, 551–579.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. (2009) Cellular components of blood. Pag.47-48 *in* F.Genten, E. Terwinghe, and A, Danguy, editors. *Atlas of fish histology*. Science Publishers, Enfield, NH. USA.
- Goldspink, G., Wilkes, D., Steven, E. (1972) Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth and adaptation. *In*: Johnston, I.A. (Ed). *Muscle Development and Growth*. London: *Academic Press*, 318p.
- Greer-Walker, M. & Pull, G.A. (1975) A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.* **7**, 295-300.
- Halver, J.E., Smith, R.R., Tolbert, B.M., Baker, E.M. (1975) Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. New York Acad. Sc.*, **258**, 81-102.
- He, Z., Mai, K., Cheng, Z., Ai, Q. (2015) Dietary threonine requirement of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture Research*; 1-9.
- Helland, B.G., Lemme, A. & Helland, S. (2013) Threonine requirement for maintenance and efficiency of utilization for threonine accretion in Atlantic salmon smolts determined using increasing ration levels. *Aquaculture*, **372**, 158-166.
- Helland, S. & Helland, B.G. (2011) Dietary threonine requirement of Atlantic salmon smolts. *Aquaculture*, **321**, 230-236.
- Hepher B (1988) *Nutrition of pond fishes*, Cambridge University Press.
- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H. (1986) Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellunge, *E. masquinongy* (Mitchill). *Journal of Fish Biology*, **28**, 393-401.

- Jahoor, F., Wykes, L.J., Reeds, P.J., Henry, J.F., Del Rosario, M.P. And Frazier, M.E. (1995) Protein deficient pigs cannot maintain reduced glutathione homeostasis when subjected to the stress of inflammation. *Journal of Nutrition*, **125**, 1462–1472.
- Jauncey, K., Tacon, A.G. J. & Jackson, A. J. (1983) The quantitative essential amino acid requirements of *Oreochromis* (Sarotherodon] *mossambicus*. In: *International Symposium on Tilapia in Aquaculture* (1st Proceedings, Nazareth, Israel) (Fishelson, L. & Yaron, Z., eds.). pp. 328-337, Tel Aviv University, Israel.
- Johansen, K.A. & Overturf, K. (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*, **7**, 576-587.
- Johnston, I. A., Mclay, H. A., Abercromby, M., Robins, D.(2000) Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellite cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. *The Journal of experimental biology*, **203**(Pt 17), 2539-52.
- Johnston, I.A. (1981) Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish (*Pleuronectes platessa*). *Cell and Tissue Research*, **214**, 369-379.
- Johnston, I.A. (1999) Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*, **177**, 99-115.
- Johnston, I.A. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*. **209**, 2249-2264.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. *Histologia Básica* – 11^a ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 524p.
- Kapoor, B.G., I.A. Verighina (1975)The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in Marine Biology***13**, 109-239.
- Karlsson-Norregren, L., Runn, P., Haux, C. (1985) Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, **27**, 81-95.
- Kidd, M.T., Kerr, B.J., Firman, J.D. & Boling, S.D. (1996) Growth and carcass characteristics of broilers fed low protein-threonine supplemented diets. *Journal Applied*.
- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T. (1991) Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*O. mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture*, **93**, 335-356.
- Koumans, J.T.M. & Akster, H.A. (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **110A**, 3-20.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Witkam, A., Osse, J.W.M. (1994) Number of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Fish Biology*, **44**, 391-408.

- Kubitza, F., Ono, E.A., Campos, J.L. (2007) Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, **17**, 102, 14-23.
- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H. (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, **58**, 823-831.
- Lassar, A.B.; Davis, R.L.; Wright, W.E.; Kadesch, T.; Murre, C.; Voronova, A.; Baltimore, D.; Weintraub, H. (1991) Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E-47- like proteins *in vivo*. *Cell*, **66**, 305-315.
- Le Bellego L., Relandeau C., Van Cauwenberghe S. (2002) Threonine requirement in pigs Benefits of L-threonine supplementation. Boletim Ajinomoto. Disponível em: http://ajinomoto-eurolysine.com/technical-bulletins_download.html?bulletin=26 Acesso em: 17/08/2015.
- Lemme, A. (2003) Reassessing amino acid levels for Peckin ducks. *Poultry International*, **42**.8-24.
- Lim. C., Lovel, R.T. (1978) Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Nutrition*, **108**, 1137-1146.
- Linden, S. K., P. Sutton, N. G. Karlsson, V. Korolik, McGuckin, M.A. (2008). Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology*, 1:183–197.
- Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N. (2002b) Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research*, **88**, n.1, 52-63.
- Mcdonald, D.G., Wood, C.M. (1993) Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: *Fish ecophysiology*. London: Chnpan & Hall, 297-321.
- Megeney, L.A. & Rudnicki, M.A. (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* **73**, 723-732.
- Michelato, M., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Graciano, T.S., Moura, V.R.B., Furuya, W.M. (2015) Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast-growing Nile tilapia. *Aquaculture Nutrition*.
- Ministério da Pesca e Aquicultura-MPA (2014) Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao> (Publicado: Quarta, 18 de Junho de 2014, 16h18 | Última atualização em Sexta, 04 de Julho de 2014, 10h58). Acesso em 24/08/2015.
- Ministério da Pesca e Aquicultura-MPA (2015) Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/especies-cultivadas> (Publicado: Quarta, 18 de Junho de 2014, 16h32 | Última atualização em Terça, 09 de Junho de 2015, 12h52). Acesso em 24/08/2015.

- Mohammad, T. R. (2006) Growth performance of three Nile tilapia strains at two densities. *Aquaculture Research*, **37**, 172-179.
- Moraes, F.R. & Martins, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. 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. cap.12, 343-386.
- Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro R.P. Fundamentos da moderna aquicultura – Canoas: Ed. ULBRA, 2001. 200p.
- Moyes, C. D.& Schulte, P. M. Princípios de fisiologia animal – 2ª ed. – Porto Alegre : Artmed, 2010, 792p.
- Murre, C., Mccaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Yan, J.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-544.
- National Research Council-NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academy Press, 2011. 376p.
- Nelson DL, Cox MM (2011) *Lehninger - princípios de bioquímica*, Artmed, Porto Alegre, Brazil.
- Nelson, David L. & Cox, Michel M. *Lehninguer princípios de bioquímica/Lehninguer*, Albert Lester, 1917-1986. Traduzido por Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi, 3ed., São Paulo, 2002.
- Neutra, M. R., & Forstner, J.F. (1987). Gastrointestinal mucus: Synthesis, secretion and function. Pages 975–1009 *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2nd ed. Raven Press, New York, NY.
- Nose, T. (1979) Summary report on the requirements for essential amino acids for carp. In: *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Halver, J. E. & Tiews, K., eds.), pp. 145-156, Heenemann and Co., Berlin.
- Ogata, T. (1958) A histochemical studies on red and white muscle fibres. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. *Acta Medica. Okayama*, **12**, 233-240.
- Ogino, C. (1980) Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bull./pn. Soc. Sci. Fish.* **46**, 171-174.
- Pette, D. & Staron, R.S. (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* **50**, 500-509.
- Pezzato, L. E., Miranda, E. C., Barros, M. M., Furuya, W. M., Pinto, L. G. Q., Pezzato, A. C. (2002) Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, **31**, n.4, 1595-1604.

- Portz, L. & Furuya, W.M. Energia, proteína e aminoácidos. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira / Fracalossi, D.M. & Cyrino, J.E.P. (2012) *Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática*, **23**, 375 p. *Poultry Research*, **5**, 180-190.
- Ranzani-Paiva, M.T.J. & Silva-Souza, A.T. Hematologia de Peixes Brasileiros. *In: Sanidade de Organismos Aquáticos* / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. – São Paulo: Editora Varela, 2004.
- Reifel.C.W., & Travill, A. A.(1979) Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in ten teleostean species. *Journal of Morphology*, **162**, 343-360.
- Rescan, P.Y., Jutel, I., Rallièrre, C. (2001) Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, **204**, 3523-3529.
- Rodrigues, A.P.O., Pauletti, L., Kindlein, E.F., Delgado, J.E.P., Cyrino, R., Machado-Neto. (2010) Intestinal histomorphology in *Pseudoplastistoma fasciatum* fed bovine colostrum as source of protein and bioactive peptides. *Scientia Agricola*, **67**, 524-530.
- Rotta, M.A. (2003) Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, ISSN 1517-1973, Dezembro, 2003.
- Rowlerson, A. & Veggetti, A. (2001) Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. *In: Johnston IA (ed) Muscle development and growth. Fish Physiology 18. San Diego: Academic Press*, pp 103-140.
- Rudnicki, M.A. & Jaenish, R. (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioassays*, **17**, 203-209.
- Sakuragui, M.M., Sanches, J.R., Fernandes, M.N. (2003) Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **173**, n.4, 309-317.
- Sänger, A.M. & Stoiber, W. (2001) Muscle fiber diversity and plasticity. *In: Muscle development and growth (I.A. Johnston, ed.)*, pp. 187-250. San Diego: *Academic Press*.
- Santiago, C.N.B. & Lovell, A.L. (1988) Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. American Institute of Nutrition. *JN-The Journal of Nutrition*. p. 1540-1546.
- Seixas Filho, J.T., J.M. Brás, A.T.M. Gomide, M.G.A Oliveira, J.L. Donzele, E. Menin (2001) Anatomia funcional e morfometria do intestino no teleósteo (pisces) de água doce surubim (*Pseudoplastistoma coruscans* – Agassiz, 1829). *Revista Brasileira de Zootecnia*, **30**, 1670-1680.
- Shelton W.L. (2002) Tilapia culture in the 21st century. *In: Proceedings of the International Forum on Tilapia Farming in the 21st Century (Tilapia Forum 2002)*,

- (ed. by R.D.I. Guerrero & M.R. Guerrero-Del Castillo), pp. 1–20. Philippines Fisheries Association Inc., Los Banos, Laguna, Philippines.
- Silva, L.C.R., Furuya, W.M., Santos, L.D., Santos, V.G., Silva, T.S.C. & Pinsetta, P.J. (2006) Níveis de treonina em rações para tilápias do Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **35**, 1258-1264.
- Souza, M.L.R., Baccarin, A.B., Viegas, E.M.M., Kronka, S.N. (2004). Defumação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inteira eviscerada e filé: aspectos referentes às características organolépticas, composição centesimal e perdas ocorridas no processamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.1, p.27-36, 2004.
- Stoll, B., Henry, J., Reeds, P.J., Yu, H., Jahoor, F., Burrin, D.G. (1998) Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *The Journal of Nutrition*, **128**, 606-614.
- Tavares-Dias, Marcos. Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal: Centro de Aquicultura, 2003.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Caceci, T., Smith, S.A. (2000) Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, **182**, 317-327.
- Tibaldi, E. & Tulli, F. (1999) Dietary threonine requirement of juvenile european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **175**, 155-166.
- Tytgat, K. M., F. J. Opdam, A. W. Einerhand, H. A. Buller, and J. Dekker. 1996. MUC2 is the prominent colonic mucin expressed in ulcerative colitis. *Gut* 38:554–563.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., E Fauconneau, B. (1999) Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast and slow growing strains of Rainbow trout . *Journal of Fish Biology*, **55**, 675-691.
- Van Leeuwen, J.L. (1999) A mechanical analysis of myomere shape in fish. *The Journal of Experimental Biology*, **202**, 3405-3414.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A. (1990) Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in (*Dicentrarchus labrax*): an ultrastructural and morphometric study. *Anatomy Embryology* **182**, 1-10.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A., Candia, C.M.D. (1993) Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish, (*Poecilia reticulata*) (Peters) (Atheriniformes, Poeciliidae): a histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. *Anatomy and Embryology*. **187**, 353-361.
- Verstegen M.W.A. & Jongbloed (2003) Crystalline amino acids and nitrogen emission. Pages 448-449 in J.P.F. D'Mello, editor. *Amino Acids in Animal Nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.

- Videler, J. J.(2011)An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. *Fish physiology and biochemistry*, **37**(2), 337-43.
- Wang, M. & Lu, M. (2015) Tilapia polyculture: A global review. *Aquaculture Research* p.1-12
- Watabe, S. (1999) Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of fish Biology*, **55**, 1-18.
- Watabe, S. (2001)Myogenic regulatory factors. *In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth*. London: Academic Press, 19-41.
- 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.*Journal of Fish Biology*.**33**, 851-859.
- Weatherley, A.H. & Gill, H.S. (1985) Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth.*Experientia*, **41**, 353-354.
- Wedemeyer, G. A. (1996) *Physiology of fish in intensive culture systems*. Nova York: Chapman & Hall.
- Wilson, J.M. & Castro, L.F.C. (2011) Morphological diversity of thegastrointestinal tract in fishes. Pages 2-55 *In: M. Grosell, A.P. Farrell, and C.J. Brauner, editors.The multifunctional gut of fish.Fish Physiology, Academic Press, New York, USA.*
- Wilson,R. P., Allen, O. W., Robinsone, H., Poe, W. E. (1978) Tryptophan and threonine requirements of fingerling channel catfish. *Nutrition*,**108**, 1595-1599.
- Wilson, R.P. (2002) Amino acids and proteins.Pages 143-179 *in* J.E. Halver, and R.W. Hardy, editors.*Fish nutrition*.Academic Press. Amsterdam, AM, The Netherlands.
- Wilson, R.P. Amino Acid Requirements of Finfish and Crustaceans. Cap. 23*In: Amino Acids in Animal Nutrition, Second Edition. D’Mello, J.P.F. (2003)*
- Wu, G., Meier, S.A. and Knabe, D.A. (1996) Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *Journal of Nutrition*,**126**, 2578-2584.
- Zanolo, R. & Yamamura, M.H. (2006) Parasitas em tilápias do Nilo criadas em sistema de tanques-rede. *Semina, Ciências Agrárias*, **27**, n.2, 281-288.
- Zehra, S. & Khan, M. (2014) Dietary threonine requeriment of fingerling Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton) estimated by growth, protein retention efficiency, threonine deposition, haematological parameters and carcass composition. *Aquaculture Research*, 1-13.
- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C. (1996) Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *Journal of Morphology*, **229**, 71-81.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular, desempenho produtivo e a frequência do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com níveis crescentes de treonina.

ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão dos genes MyoD e Miogenina de tilápia do Nilo entre 10 a 60g e 50 a 300g alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de treonina;
- Avaliar a contribuição da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento das fibras musculares, e frequência das células mucosas do epitélio branquial e intestinal de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes níveis de treonina;
- Analisar as respostas bioquímicas, hematológicas e da composição corporal de tilápia do Nilo alimentados com dietas com níveis crescentes de treonina.

II– Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular e frequência das células de muco neutro e ácido do epitélio branquial e da mucosa intestinal de juvenis de tilápia do Nilo¹

RESUMO: O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da inclusão de treonina em dietas de juvenis de tilápias do Nilo sobre o desempenho produtivo, expressão dos genes relacionados com o crescimento muscular (Miogenina e MyoD), morfometria das fibras musculares e frequência das células de muco neutro e ácido do epitélio branquial e da mucosa intestinal. Juvenis de tilápias do Nilo ($n = 216$; e $10,7 \pm 0,15$ g) foram aleatoriamente distribuídos em 18 aquários de fibra de vidro com capacidade de 250L com sistema de recirculação de água. Foram elaboradas seis dietas isonitrogenadas e isocalóricas com níveis crescentes de (9,05; 12,34; 16,95; 21,21; 24,54 e 27,95 g kg⁻¹). Não foram observadas diferenças no desempenho produtivo e composição corporal dos peixes alimentados com níveis crescentes de treonina. Concluiu-se que 9,05 g kg⁻¹ de treonina atende a exigência para o desempenho produtivo, mas dieta com 12,34 g kg⁻¹ de treonina estimula o crescimento das fibras musculares pelo processo hipertrófico sob a influência da expressão da Miogenina e contribui para o aumento da frequência de células produtoras de muco no epitélio branquial e na mucosa intestinal de juvenis de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: aminoácido, fase inicial, peixe, fibra muscular.

¹Artigo redigido de acordo com as normas de publicação da revista *Aquaculture Nutrition*. Fator de impacto = 1,395. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2095/issues](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2095/issues).

II- Expression of genes MyoD and Myogenin, productive performance, muscle morphometry and frequency of neutral and acid mucus cells in gill epithelium and intestinal mucosa of Nile tilapia juveniles

ABSTRACT: This study was undertaken to evaluate the effects of inclusion of dietary threonine for Nile tilapia juveniles through growth performance, expression of genes related to muscle growth (Myogenin and MyoD), morphometry of muscle fibers, frequency of neutral and acid mucus cells in gill epithelium and intestinal mucosa. Nile tilapia juveniles ($n = 216$; $10.7 \pm 0.15\text{g}$) were randomly distributed into 18 fiberglass aquarium of 250-L each in a water recirculation system. Six extruded isonitrogenou and isocaloric diets with graded levels of threonine (9.05, 12.34, 16.95, 21.21, 24.4 and 27.95 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) were elaborated. No significant differences of growth performance and body composition of fish fed with graded levels of threonine were observed. It was concluded that 9.05 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of threonine meet the dietary theronine requirement for growth performance, but the inclusion 12.34 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ stimulates hypertrophic process of muscle fibers under Myogenin expression and increased frequency of mucus-secreting cells in gill and intestine of Nile tilapia juveniles.

Key words: amino acid, early stage, fish, muscle fiber.

Introdução:

Além de atuar positivamente no crescimento e conversão alimentar, os aminoácidos cristalinos têm sido utilizados para reduzir o custo de produção. Alguns aminoácidos, incluindo a treonina, possuem funções sobre o crescimento e saúde dos peixes. O termo aminoácido funcional é um termo usado para descrever os aminoácidos envolvidos nos processos celulares além da síntese proteica (Andersen *et al.*, 2016). A treonina é um aminoácido essencial e potencialmente limitante em dietas elaboradas com base em proteína do farelo de soja para peixes (NRC, 2011).

A treonina possui atua na síntese proteica e formação do ácido úrico, (Zhigang *et al.*, 2015). Em mamíferos e aves, a suplementação de treonina é associada com melhora na síntese de muco (Fraure *et al.*, 2006) que atua como imunomodulador na barreira intestinal (Azzan *et al.*, 2011). O muco sintetizado nos tecidos da cavidade bucal, intestino, brânquias e pele estão relacionados com o sistema de proteção, inibindo a colonização de micróbios e a eliminação de agentes patogênicos por meio do sistema imune inato e da imunidade adaptativa (Cain & Swan, 2011).

A maioria dos peixes de interesse comercial apresenta crescimento muscular indeterminado (Rowlerson & Veggetti, 2001). O crescimento muscular ocorre por meio da hiperplasia e hipertrofia, os quais contribuem por todo o período de crescimento pós-embrionário da musculatura estriada. A contribuição relativa da hiperplasia e da hipertrofia para o crescimento muscular varia de acordo com a espécie, fase de crescimento e tipo de músculo (Aguilar *et al.*, 2005; Dal Pai-Silva *et al.*, 2003).

A formação do tecido muscular estriado envolve a ação de diversos fatores regulatórios, atuando e regulando o processo de crescimento muscular por meio da ação de moléculas de sinalização. Estas moléculas se ligam a seus receptores e ativando ou reprimindo os fatores de transcrição intracelular (Du, 2004). Todos os eventos da miogênese são iniciados e controlados pela expressão diferencial de fatores transcricionais conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 (Watabe, 2001).

Ainda não há referências sobre os efeitos da suplementação de treonina sobre a expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e produção de células secretoras de muco em tilápias. Assim, o presente trabalho foi delineado com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de treonina sobre desempenho produtivo, crescimento muscular, expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular MyoD e Miogenina, frequência do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal e parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis de tilápias do Nilo.

Material e métodos:

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos de Manejo em Aquicultura (GEMAQ) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná –UNIOESTE/*Campus* Toledo-PR.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, através do Certificado Experimental no uso de Animais em Pesquisa-CEUA/Nº12/2015, sob o protocolo Nº13/13, 16 de agosto de 2015.

Condições experimentais

Foram utilizados 216 juvenis de tilápia do Nilo, com peso médio inicial de $10,7 \pm 0,15$ g, distribuídos em aquários de fibra de vidro de 250L, em um delineamento inteiramente ao acaso com seis tratamentos e três repetições. Os tanques foram mantidos em sistema *in door* de recirculação de água, com renovação diária de 10% do volume total, com biofiltro central e aeração individual constante por meio de soprador central. Semanalmente, foram realizadas coletas de dados de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), pH da água e condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$) de cada tanque, por meio de um aparelho multiparâmetro digital portátil Hanna®.

Dietas e manejo alimentar

Foi elaborada uma dieta controle com 38,33 % de proteína bruta e 3.420 kcal energia digestível/kg de forma a atender às exigências para juvenis de tilápia (Furuya, 2010; NRC, 2011), com exceção do nível de treonina (Tabela 1). A treonina foi suplementada na forma cristalina de L-treonina 98%, de forma a se obter dietas com 9,05; 12,34; 16,95; 21,21; 24,54; 27,95 g kg^{-1} de treonina total. As dietas foram balanceadas de acordo com valores de proteína digestível, energia digestível, fósforo disponível e aminoácidos digestíveis dos alimentos descritos por Furuya (2010). O aminoácido treonina foi suplementado em substituição aos aminoácidos: ácido glutâmico e alanina, de forma a manter as dietas isonitrogenadas.

Na elaboração das dietas, após pesagem e homogeneização dos ingredientes, a mistura foi extrusada em extrusora de rosca simples (Extrusora Ex-Micro®, Ribeirão Preto SP, Brasil) de forma a se obter grânulos com diâmetro aproximado de 1,2 mm, na Universidade do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo-PR. Após a extrusão, as dietas experimentais foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 12 horas. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia, às 8; 11 e 14 e 17 horas, por meio de arraçoamento manual e até saciedade aparente, por um período de 45 dias.

Tabela 1. Composição (g kg⁻¹) das dietas experimentais com níveis crescentes de treonina para juvenis de tilápia do Nilo.

Ingredientes	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)					
	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95
Milho	400,61	400,61	400,61	400,61	400,61	400,61
Farelo de soja	280,00	280,00	280,00	280,00	280,00	280,00
Farinha vísceras aves	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00
Glúten de milho	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
Óleo de soja	1,50	3,00	4,50	6,00	7,50	9,00
Calcário calcítico	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10
Fosfato bicálcico	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20
L-alanina	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
L-ácido glutâmico	70,00	64,50	59,00	53,50	48,00	42,50
L-treonina	0,00	4,00	8,00	12,00	16,00	20,00
L-lisina HCl	4,85	4,85	4,85	4,85	4,85	4,85
DL-metionina	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90
L- triptofano	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Sal comum	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Suplemento min. e vit.*	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

*Níveis de garantia por kg de dieta (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 de cálcio, 100 mg; vit. C, 600 mg; Biotina, 2 mg; Colina, 1.000 mg; Niacina, 2.500 mg; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg.

Desempenho produtivo e composição corporal

No início do experimento, todos os peixes foram insensibilizados em eugenol, na dose de 75,0 mg.L⁻¹(Deriggi *et al.*, 2006), pesados em balança de precisão digital (0,01g), e foram formados lotes homogêneos de 12 animais por caixa e distribuídos aleatoriamente em suas respectivas unidades experimentais.

Ao final do experimento, após jejum por 24 horas para esvaziamento do trato digestório, todos os peixes de cada unidade experimental foram insensibilizados em eugenol, na dose de 75,0 mg.L⁻¹(Deriggi *et al.*, 2006) para a realização das medidas individuais de peso (g) e comprimento (cm). Três peixes de cada unidade experimental foram insensibilizados em eugenol, na dose de 75,0 mg.L⁻¹, para a coleta de sangue e

posteriormente foram eutanasiados em superdosagem de benzocaína (1g/10 mL de álcool/ 10L de água) com posterior secção da medula cervical (Stoskopf, 1993), para as coletas dos dados para as análises de expressão gênica e morfometria das fibras musculares, frequência de muco do epitélio branquial e intestinal e desempenho produtivo, também foi realizada a coleta da gordura visceral e fígado. Três peixes de cada aquário foram sacrificados por secção da medula cervical, após serem anestesiados com benzocaína (1g/10 mL de álcool/ 10L de água) (Stoskopf, 1993), para a realização das análises bromatológicas.

Os dados de desempenho produtivo avaliados foram o peso inicial (g); peso final médio (g); ganho em peso= (peso corporal final (g) – peso corporal inicial (g)); conversão alimentar=(dieta consumida (g)/ganho em peso (g)); consumo alimento (g/kg)=ração consumida/((1/2*(número de peixes final+número peixes inicial))); taxa de eficiência proteica= ganho em peso (g)/proteína consumida (g); sobrevivência=(100(número de peixes final/número de peixes inicial)); índice hepatossomático=(100(peso fígado (g)/(peso corporal final, g)); gordura visceral=(100(peso gordura visceral (g)/peso corporal final (g)).

Análises laboratoriais

A composição corporal dos animais seguiu o preconizado pela AOAC (1995) para análises de umidade (pré-secagem em estufa a 55°C por 72 horas, seguida de secagem a 105°C por oito horas), proteínas (método de Kjeldhal/Tecnal, MA-036, Piracicaba, SP, Brasil) extrato etéreo (extrator de Soxhlet com éter como solvente/Tecnal, TE-044, Piracicaba, SP, Brasil),e matéria mineral (calcinação das amostras a 550°C por 6 horas/Tecnal, 2000B, Belo Horizonte, MG, Brasil), realizadas no Laboratório de Controle de Alimentos – LQA/GEMAq-UNIOESTE/*Campus* Toledo-Pr. As rações experimentais foram encaminhadas para o Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos, Animal Nutrition Division, para a realização de análises de aminoácidos, por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Hitashi L-8800, Tóquio, Japão). O triptofano foi determinado após hidrólise ácida.

Análise morfométrica das fibras musculares das tilápias

A análise morfométrica das fibras musculares das tilápias foi realizada no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá. Para essas análises, foram coletadas amostras de três peixes de cada repetição, totalizando um n amostral de 9 peixes por tratamento.

Fragments da musculatura branca dorsal dos exemplares de tilápia foram retirados e fixados em formol 10% durante 24 horas, posteriormente as amostras foram desidratadas em série ascendente de álcool, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina histológica, para a obtenção de cortes histológicos transversais semisseriados de 6 μ m. Os cortes histológicos foram submetidos a coloração hematoxilina-eosina para a avaliação do padrão morfológico das fibras musculares.

Os cortes histológicos foram analisados em Microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 (Manila, Filipinas) acoplado com a câmera *Olympus* PMC 35 B (Berlim, Alemanha), utilizando objetiva de 40X para capturar os campos de observação. Utilizando o sistema de análise de imagens *Image Pro-Plus* versão 4.5, em campos aleatórios da lâmina histológica, foi determinado o menor diâmetro de 200 fibras musculares, por animal, que foram agrupadas em classes de diâmetros (<20, 20-50 e >50 μ m) para avaliar a contribuição da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular (Almeida *et al.*, 2008, 2010) em cada tratamento.

Avaliação da expressão gênica da MyoD e Miogenina

As análises da expressão dos genes foram realizadas no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME) do Departamento de Morfologia, IBB, UNESP, Botucatu/SP.

As amostras do músculo branco dorsal foram dissecadas, logo abaixo da nadadeira dorsal, e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido, e transferidas para freezer a (-80°C), até o processamento em laboratório. Para essas análises, foram coletadas amostras de dois indivíduos de cada repetição, totalizando um n amostral de seis peixes por tratamento.

A expressão dos mRNAs dos genes MyoD e Miogenina 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). Foram utilizadas as seguintes metodologias:

Extração, quantificação e análise da integridade do RNA

O RNA total foi extraído das amostras musculares por meio do *TRIzol*® (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA), seguindo as orientações do fabricante. As amostras congeladas foram trituradas com o homogeneizador de tecidos *IKA*® *T-25 Digital Ultra-Turrax*® (IKA, Staufen, Baden-Württemberg, Germany) em 1 mL de *TRIzol*®/50-100 mg de tecido muscular. O homogeneizado foi transferido para um tubo de 1,5 mL e incubado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio e, posteriormente, os tubos foram agitados vigorosamente e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa formada após a centrifugação, foi coletada e o RNA foi precipitado por meio da incubação com 0,5 mL de álcool isopropílico, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4°C, e o pellet de RNA resultante foi lavado com 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado a 12000xG por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Após secagem, o pellet de RNA foi dissolvido em *UltraPure*TM *Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) e armazenado a -80°C.

Para a quantificação do RNA foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue*TM *Plus* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom), que forneceu a medida de absorvância a 260 nm (quantidade de RNA). Também foi realizada a medida de absorvância a 280 nm, que identifica a quantidade de proteínas e permite a análise da pureza do RNA extraído, garantida pela obtenção de uma razão 260/280 nm superior a 1.8. Foram utilizadas somente amostras com razão igual ou superior a 1.8.

A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A agarose foi dissolvida em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). Uma alíquota de 1 µL do RNA total foi adicionada a 5 µL de uma solução contendo o tampão de corrida Orange G e o corante *Gel Red*® (Biotium, Hayward, California, USA). Essa mistura foi aplicada no gel e submetida à corrida eletroforética a 120 V por cerca de 1 hora e 30 minutos. O gel foi fotografado

sob luz ultravioleta e a integridade do RNA total extraído foi confirmada pela presença das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

RT-qPCR

Os níveis de expressão dos genes MyoD e miogenina foram detectados por RTq-PCR, por meio da plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time RT-qPCR System* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Os níveis de expressão dos genes alvo foram normalizados pela expressão do gene referência *β-actina*, cuja expressão foi constante entre todas as amostras. As amostras de cDNA foram amplificadas utilizando o *Fast SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Os primers foram sintetizados pela Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, California), após terem sido desenhados por meio do *software Primer Express 3.0.1.®* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) (Tabela 2). Os primers foram diluídos em *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) e suas concentrações iniciais ajustadas para 5 μM. Conforme instruções do fabricante, foram utilizados 2 μL de cDNA, 2 μL de *Primer Forward*, 2 μL de *Primer Reverse*, 12,5 μL de *Fast SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) e 6,5 μL de *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA), totalizando um volume final de 25 μL de solução.

As reações foram realizadas em duplicata, nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Para cada amostra foi gerado um gráfico de amplificação, com o aumento da fluorescência (ΔRn) ao longo de cada ciclo da PCR. Em cada reação, foi realizada uma análise da Curva de Dissociação dos fragmentos ao término de cada reação, durante 20 minutos com temperatura da reação aumentada gradualmente de 60 para 95°C. O gráfico resultante da Curva de Dissociação possibilitou a avaliação da especificidade de amplificação de cada conjunto de primers, confirmada pela presença de um único pico de fluorescência. Após obtenção do C_t médio das duplicatas, foi calculado o valor de ΔC_t ($C_{t_{\text{gene alvo}}} - C_{t_{\text{gene endógeno}}}$) e de $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta C_{t_{\text{amostra}}} - \Delta C_{t_{\text{amostra calibradora}}}$). A quantificação relativa dos dados de expressão foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001), expressa em *fold-change*.

Tabela 2: Primers utilizados para a amplificação da *MyoD*, *Miogenina* e β -actina por RTq-PCR.

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>MyoD</i>	CATCCAGCCCCCGCTCCAAC	GTCTGACAGGTGGGGCCGTT
<i>Miogenina</i>	CTCAACCAGCAGGACACTGA	ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT
β -actina	GCCAACAGGGAGAAGATGAC CCA	ACAGGGACAGCACAGCCTGG AT

Frequência e quantificação das células de muco do epitélio branquial

Com o objetivo de verificar se as dietas com níveis de treonina influenciavam na frequência de muco, ao final do período experimental, foi coletado o segundo arco branquial (Srivastava *et al.*, 2012) do lado direito de três peixes de cada repetição, totalizando um *n* amostral de 9 peixes por tratamento.

As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade em Alimentos – LQA/GEMAq-UNIOESTE/Campus Toledo-Pr., e foram fixadas em solução de Bouin aquoso durante 48 horas, e posteriormente desidratadas em série crescente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, para obtenção de cortes longitudinais semisseriados de 5 μ m de espessura.

Para a evidenciação das células mucosas, as amostras foram submetidas à técnica histoquímica *Alcian Blue* pH 2,5+ ácido periódico de Schiff (PAS), para a evidenciação das células produtoras de muco ácido e muco neutro e posterior análise quantitativa. A coloração das lâminas foi realizada no Laboratório de Histologia/UEM.

Para avaliar a frequência das células secretoras de muco neutro e ácido, utilizou-se toda a extensão do filamento branquial, abrangendo as três regiões: proximal ao rastelo, denominada de região basal, posição intermediária e região apical do filamento, totalizando 40 imagens/animal, perfazendo um total de 360 imagens/tratamento, em que os dados foram expressos em porcentagem.

Para avaliar a quantificação total das células produtoras de muco neutro e ácido, utilizou-se a somatória total da contagem de muco neutro e ácido das imagens utilizadas para a avaliação da análise de frequência citada acima, totalizando 40 imagens/animal, perfazendo um total de 360 imagens/tratamento.

Esta análise foi realizada a partir de imagens capturadas com o auxílio de Microscópio Óptico P1 *Olympus CX 31* (Manila, Filipinas) e fotografados com a câmera *Olympus SC30* (Berlim, Alemanha), com objetiva de 40X. As análises foram realizadas utilizando o sistema de análise de imagem computadorizada *Image – Pró Plus*, versão 4.0 (Média Cibertecnicos).

Frequência das células caliciformes da mucosa intestinal

Para a análise de frequência das células caliciformes da mucosa intestinal, a coleta foi realizada no Laboratório de Apoio da UNIOESTE/*Campus Toledo/Pr.*, e foram coletadas porções de aproximadamente quatro centímetros de comprimento do intestino médio, sendo, primeiramente realizada a medida do comprimento total do intestino com o auxílio de uma trena de medidas, (abaixo da junção do estômago até o reto) e posteriormente coletado a porção média do mesmo. Foram coletadas amostras do intestino médio de três peixes por unidade experimental. As amostras foram lavadas com solução salina, fixadas em solução de *Bouin* por 4 horas, desidratadas em série ascendente de álcool, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina histológica, para a obtenção de cortes histológicos semisseriados de 7µm.

A coloração das lâminas foi realizada no Laboratório de Histologia/UEM. Para a visualização das células caliciformes no epitélio intestinal, foram preparadas duas lâminas por animal, e uma foi corada com Azul de Alcian, pH 2,5 (reação de AB pH 2,5, que evidencia glicoconjugados ácidos), e outra lâmina foi corada em PAS e contra corada em hematoxilina (reação de PAS, evidencia glicoconjugados neutros); (Romeis 1968). A captura de imagens foi realizada no Laboratório de Captura de Imagens UNIOESTE/*Campus Toledo-PR.* em fotomicroscópio *Olympus CX 31*(Manila, Filipinas) utilizando a câmera *Olympus SC30* (Berlim, Alemanha), em objetiva de 40X, as imagens foram analisadas por meio do sistema de imagens computadorizado (*Image Pro Plus – Versão 5.2- Media Cibernética*). A frequência das células de muco intestinal foi realizada por meio da média de 10 imagens/3 cortes (obj.40x)/animal perfazendo um total de 270 imagens por tratamento, os dados foram expressos em porcentagem.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com seis tratamentos e três repetições, sendo uma unidade experimental composta por um aquário de fibra de vidro com capacidade para 250L, contendo 12 peixes. Para a determinação da exigência de treonina, os dados de desempenho produtivo e da composição centesimal, foram submetidos a análise de regressão linear, ao nível de 5% de probabilidade. Os parâmetros de morfometria das fibras musculares, variáveis histológicas do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal e a expressão de genes foram analisados por meio de variância não paramétrica (Kruskal Wallis), seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, considerando o nível de 5% de significância por meio do programa computacional Statistic 7.1 (Statsoft 2005). As análises estatísticas da expressão dos genes foram efetuadas por meio do programa computacional GraphPad Software (1998).

Resultados

Desempenho Produtivo

Durante o período experimental foram observados valores médios de $27,4 \pm 1,1^\circ\text{C}$ para a temperatura; $5,8 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ para oxigênio dissolvido; $7,75 \pm 0,3$ para o pH e $120,12 \pm 2,1 \mu\text{S.cm}^{-1}$ para a condutividade elétrica da água. O consumo de dietas com diferentes níveis de treonina não influenciou ($P > 0,05$) o desempenho produtivo nos peixes (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho produtivo dos juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina¹.

	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)						Efeito*
	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95	
Peso inicial (g)	10,95	10,75	10,73	10,63	10,90	10,69	NS
Peso final (g)	54,03±4,22	57,24±2,46	62±2,98	62,28±1,5	56,43±2,16	62,55±2,94	NS
Ganho em peso (g)	43,07±4,4	46,43±2,49	50,88±3,01	51,60±1,60	45,53±2,25	51,86±3,04	NS
Consumo (g/kg)	54,99±1,44	59,73±0,80	62,77±1,73	57,10±4,15	53,32±0,32	61,47±1,84	NS
Conversão alimentar (g/g)	1,06±0,04	1,07±0,09	1,05±0,01	1,02±0,15	0,98±0,00	0,99±0,02	NS
Taxa eficiência proteica (%)	1,06±0,07	1,27±0,13	1,33±0,02	1,43±0,26	1,23±0,00	1,52±0,04	NS
Índice hepatossomático (%)	2,10±0,17	2,34±0,10	2,68±0,06	2,70±0,38	2,64±0,23	1,80±0,31	NS
Índice gordura visceral (%)	3,71±0,47	3,33±0,49	4,31±0,30	3,98±0,21	2,96±0,75	3,64±0,33	NS

*NS= Não significativo.

Tabela 4: Composição proximal (g kg⁻¹) das dietas experimentais com níveis crescentes de treonina para juvenis de tilápia do Nilo

	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)					
	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95
Composição proximal das dietas (%)						
Matéria seca ¹	91,38	92,06	91,27	92,47	93,12	92,86
Proteína bruta ¹	36,33	36,49	36,25	35,99	36,26	34,01
Matéria mineral ²	4,19	4,24	4,17	4,72	4,08	3,92
Extrato etéreo ²	1,74	2,24	0,29	0,05	1,68	2,39
Aminoácidos essenciais¹ (g kg⁻¹)						
Arginina	15,42	15,24	17,08	17,33	20,29	17,34
Fenilalanina	11,79	11,13	12,70	12,95	15,00	12,85
Histidina	6,26	5,45	6,76	6,78	7,70	6,42
Isoleucina	9,84	9,42	10,56	10,83	12,41	10,56
Leucina	21,31	20,14	22,69	23,38	25,62	22,75
Lisina	17,30	16,07	18,41	18,84	20,50	18,40
Metionina	5,11	5,12	5,58	5,56	5,74	5,70
Treonina	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95
Triptofano	3,50	3,43	3,46	3,56	3,71	3,45
Valina	11,00	10,63	11,90	12,19	13,68	11,90
Aminoácidos não essenciais¹ (g kg⁻¹)						
Ácido aspártico	22,78	21,88	24,42	25,17	29,41	24,44
Ácido glutâmico	103,23	94,59	98,59	95,30	88,40	78,68
Alanina	80,34	71,36	70,55	63,09	52,04	46,49
Cistina	3,23	3,08	3,55	3,63	3,77	3,53
Glicina	13,57	12,87	14,52	14,80	16,02	14,72
Serina	12,12	11,57	12,92	13,28	15,15	13,08
Tirosina	8,94	8,76	9,65	10,14	11,28	9,64

¹Análises realizadas pela *Ajinomoto Animal Nutrition*.

²Valores determinados no laboratório de Controle de Qualidade do GEMAq da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Composição corporal dos peixes

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) sobre a composição corporal em umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral de juvenis de tilápia do Nilo, alimentados com níveis de treonina (Tabela 5).

Tabela 5: Composição corporal de juvenis de tilápia do Nilo, alimentados com níveis crescentes de treonina com base na matéria mineral.

Variáveis (%)	Níveis de treonina (g kg^{-1})							Efeito*
	Inicial	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95	
Umidade	80,22±0,2	72,76±0,5	73,40±1,0	71,56±0,0	71,79±1,8	73,52±0,2	72,1±0,8	NS
Proteína	12,45±0,3	17,65±3,6	16,76±2,8	16,60±3,1	14,75±6,8	17,58±3,4	16,41±1,7	NS
Extrato etéreo	2,62±2,1	8,54±3,6	7,78±2,8	9,43±8,6	9,15±1,2	7,85±2,7	9,38±5,6	NS
Matéria mineral	3,89±3,3	2,97±5,0	3,09±6,8	3,02±20,4	2,85±5,2	3,02±4,9	3,10±3,8	NS

*NS=não significativo pela análise de regressão de linear e quadrática (%).

Morfologia e Morfometria das fibras musculares brancas

A morfologia da musculatura branca avaliada foi semelhante entre os peixes de todos os tratamentos, em que foi observada a presença de fibras em formato poligonal, organizadas em fascículos delimitados pelo perimísio e separadas pelo endomísio. A musculatura branca apresentou-se em padrão em mosaico, caracterizado com diferentes diâmetros, conforme análise morfométrica. A frequência das fibras musculares brancas, dividida em três classes, foi influenciada ($P < 0,05$) pelos níveis dietéticos de treonina (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de distribuição das fibras musculares brancas de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de treonina¹.

Classe de diâmetro (%)	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)						P ¹
	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95	
<20 µm	49,37±8,9 ^{aA}	36,55±10,4 ^{aAB}	31,06±7,9 ^{bBC}	28,85±6,8 ^{bBC}	30,38±8,2 ^{bBC}	22,00±5,5 ^{bC}	0,014
20-50 µm	50,62±8,8 ^{aC}	63,22±10,4 ^{aBC}	68,81±8,0 ^{aAB}	71,14±6,8 ^{aAB}	69,27±8,1 ^{aAB}	77,12±4,9 ^{aA}	0,011
>50 µm	0,0±0,0 ^{bB}	0,22±0,0 ^{bAB}	0,12±0,2 ^{cB}	0,14±0,2 ^{cB}	0,33±0,4 ^{cAB}	0,87±0,9 ^{cA}	0,001
P ²	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

¹Letras sobrescritas maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos em função do nível de treonina pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

²Letras sobrescritas minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as classes de fibra em função dos níveis de treonina pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Peixes alimentados com 9,05 e 12,34 g kg⁻¹ treonina não apresentaram diferenças na frequência de fibras com diâmetro <20 µm, demonstrando diminuição da frequência do processo de hiperplasia a partir do nível de inclusão de 16,95 g kg⁻¹ de treonina. No entanto, peixes alimentados com 16,95, 21,21, 24,54 e 27,95 g kg⁻¹ de treonina não apresentaram diferenças significativas na frequência de fibras musculares. A frequência de fibras na classe entre 20 e 50 µm foi menor em peixes que receberam a dieta com 9,05 g kg⁻¹ treonina. No entanto, não diferiu em peixes que receberam dietas com 16,95, 21,21, 24,54 e 27,95 g kg⁻¹ de treonina. Da mesma forma, não diferiu em peixes que receberam as dietas com 9,05 e 12,34 g kg⁻¹ treonina. Na classe de fibras com diâmetro >50 µm, não foram observadas diferenças significativas em peixes alimentados com 9,05 e 12,34, 16,95, 21,21, 24,54 g kg⁻¹ treonina. Por outro lado, peixes que receberam a dieta com 27,95 g kg⁻¹ treonina apresentaram maior frequência de fibras com diâmetro >50 µm em relação aos que consumiram dietas com 9,05, 16,95 e 21,21 g kg⁻¹ treonina. Dentro de cada nível de treonina, foi observado elevada frequência de fibras da classe <20µm, indicando que o processo de hiperplasia muscular ainda estava ocorrendo nos peixes.

Expressão gênica da MyoD e Miogenina

Não houve diferença (P=0,0775) entre os níveis de mRNA da MyoD estimados entre os tratamentos, segundo a análise de Kruskall Wallis e Dunn (Figura 1).

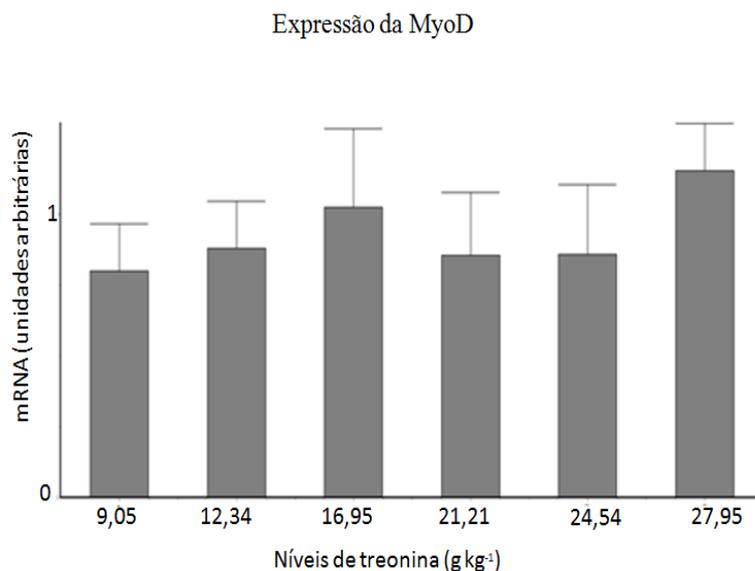


Figura 1: Níveis de expressão da MyoD (unidades arbitrárias) no músculo branco da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) detectados por RT-qPCR.

O consumo de dietas com diferentes níveis de treonina influenciou ($P < 0,05$) os níveis estimados de mRNA Miogenina (Figura 2).

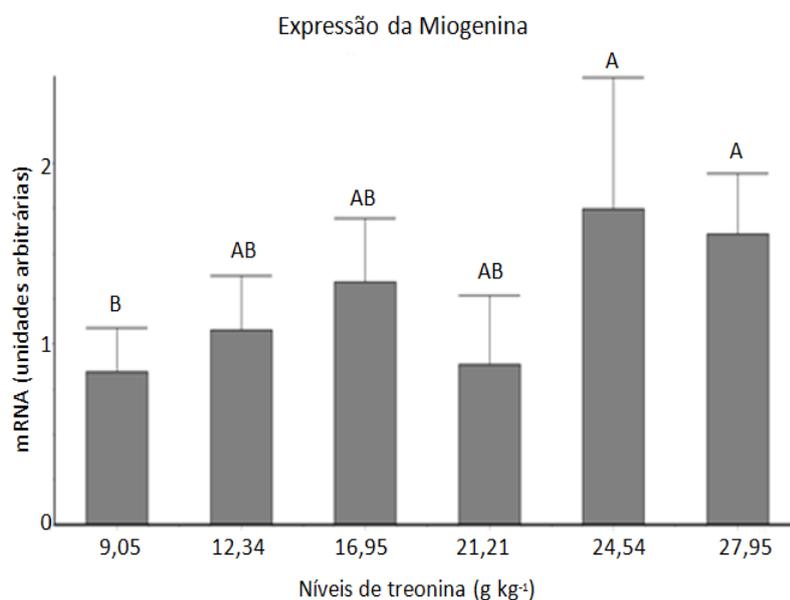


Figura 2: Níveis de expressão da Miogenina (unidades arbitrárias) no músculo branco da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) detectados por RT-qPCR. Letras distintas indicam diferença significativa a nível de ($P > 0,05$) de significância.

Pelos resultados da RT-qPCR os níveis de mRNA da Miogenina foram semelhantes ($P > 0,05$) entre peixes que receberam 24,54 e 27,95 g kg⁻¹ de treonina. Os níveis de mRNA foram maiores ($P > 0,05$) que aqueles observados em peixes que receberam a dieta com 9,05 g kg⁻¹ de treonina. Por outro lado, a expressão de Miogenina não variou ($P > 0,05$) entre os peixes que receberam dietas com 12,34, 16,95, 21,21 g kg⁻¹ de treonina.

Frequência e quantificação das células mucosas do tecido branquial

A produção de células secretoras de muco neutro e ácido das brânquias foi influenciada ($P < 0,05$) pelo consumo de dietas com diferentes níveis de treonina (Tabela 7).

Tabela 7: Frequência das células de muco neutro e ácido e quantificação das células de muco do epitélio branquial de tilápia do Nilo, submetidas a dietas com níveis crescentes de treonina¹.

Variável	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)						CV	P
	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95		
Muco								
ácido (%)	68,79±5,41 ^a	63,42±8,11 ^{ab}	63,26±12,54 ^{ab}	64,25±5,46 ^{ab}	54,59±2,30 ^b	51,33±5,28 ^b	15,07	0,0003
Muco								
neutro (%)	31,21±5,41 ^b	36,58±8,11 ^{ab}	36,73±12,54 ^{ab}	35,75±5,46 ^{ab}	45,41±2,30 ^a	48,67±5,28 ^a	23,60	0,0003
Contagem								
total	818,00±113,14 ^{bc}	773,50±246,90 ^c	837,00±226,05 ^{bc}	1512,00±431,38 ^a	1250,80±224,81 ^{abc}	1284,67±351,58 ^{ab}	36,06	0,0002

¹Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos em função do nível de treonina pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Peixes alimentados com $9,05 \text{ g kg}^{-1}$ treonina apresentaram maior frequência de células secretoras de muco ácido, quando comparados aos que receberam dietas com $24,54$ e $27,95 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina. Entre as células secretoras de muco neutro, peixes que foram alimentados com $9,05 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina apresentaram menor frequência de células de muco neutro, em comparação aos que receberam dietas com $24,54$ e $27,95 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina.

Pela análise da contagem do total de células de muco nas brânquias, houve efeitos dos níveis de treonina sobre a quantidade de células de muco, em que peixes que receberam dietas com mais de $21,21 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina apresentaram maior quantidade de células secretoras de muco (Tabela 8) e (Figura 3: A e B).

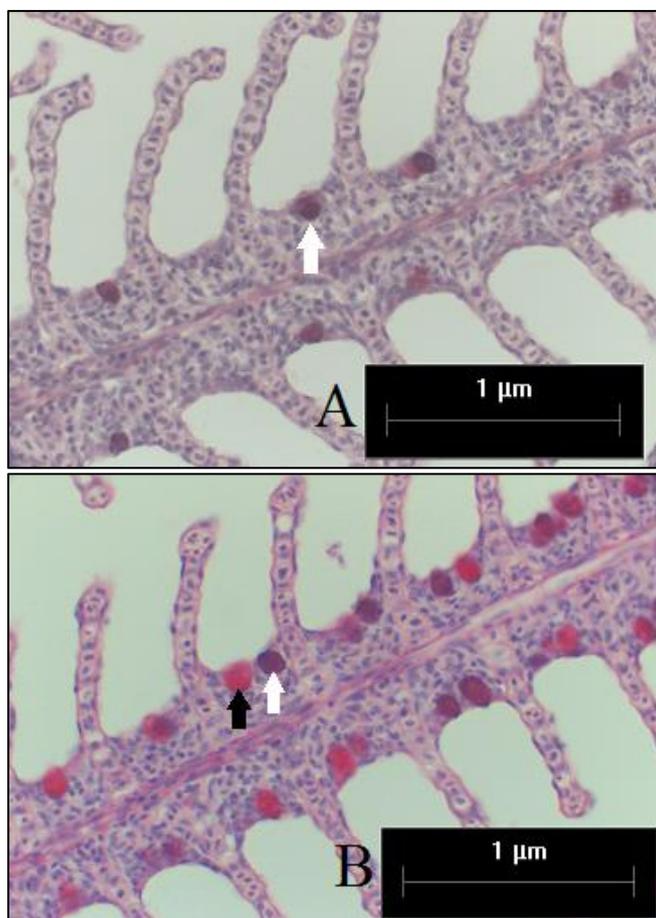


Figura 3: Imagem representativa de corte longitudinal da brânquia de exemplar de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) alimentada com dietas contendo níveis crescentes de treonina. Células produtoras de muco ácido (seta branca) e células produtoras de muco neutro (seta preta) da região de um filamento branquial. PAS + Alcian Blue, 40X, régua de $25\mu\text{m}$. Imagem A: $9,05 \text{ g kg}^{-1}$; Imagem B: $21,21 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina digestível.

Frequência das células de muco neutro e ácido da mucosa intestinal

A frequência das células secretoras de muco neutro e ácido da mucosa intestinal foi influenciada ($P < 0,05$) pelo consumo de dietas contendo níveis crescentes de treonina (Tabela 8).

Tabela 8: Frequência das células de muco neutro e ácido da mucosa intestinal de tilápias do Nilo submetidas a níveis crescentes de treonina na dieta¹.

Variável	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)						CV	P
	9,05	12,34	16,95	21,21	24,54	27,95		
Muco ácido (%)	47,69±7,26 ^{bc}	62,94±1,67 ^a	47,91±5,76 ^{bc}	58,4±13,86 ^{ab}	52,25±5,32 ^{abc}	46,01±5,55 ^c	0,03	19,12
Muco neutro (%)	52,31±7,26 ^{ab}	37,06±1,76 ^c	52,09±5,76 ^{ab}	41,6±13,86 ^{bc}	47,75±5,32 ^{abc}	53,99±5,55 ^a	0,03	15,2

¹Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos em função do nível de treonina pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

Peixes que consumiram a dieta com 12,34 g kg⁻¹ de treonina apresentaram maior frequência de células secretoras de muco ácido. Entre as células secretoras de muco neutro, peixes que consumiram a dieta com 27,95 g kg⁻¹ de treonina apresentaram maior frequência de células de muco neutro, mas não foi estatisticamente diferente da frequência de células secretoras de muco neutro em peixes que receberam as dietas com 9,05; 16,95 e 24,95 g kg⁻¹ de treonina.

Discussão:

Os parâmetros de qualidade de água monitorados durante o período experimental permaneceram dentro dos níveis recomendados para a criação de peixes. As tilápias apresentam crescimento satisfatório quando criadas em águas com temperaturas entre 24 e 30°C, considerada o ideal para o conforto térmico de espécies tropicais (El-Sayed, 2006), teores de oxigênio dissolvido acima de 4 mg.L⁻¹, pH básico (Popma e Lovshin, 1996) e condutividade elétrica entre 20 e 150 µS.cm⁻¹ (Zimmermann & Hasper, 2003). Ao final do período experimental, não foram observadas anormalidades morfológicas nos peixes que foram submetidos as dietas contendo os diferentes níveis de treonina.

No presente trabalho, a suplementação de treonina na dieta não influenciou o desempenho produtivo dos peixes. Por outro lado, o menor crescimento de juvenis de Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), foi relatado por Tibaldi & Tulli (1999), quando alimentados com dieta deficiente de treonina (7,6 g kg⁻¹). Bonfim *et al.* (2008), observaram maior desempenho para juvenis de tilápia do Nilo alimentados com 1,1 g kg⁻¹ de treonina. Santiago e Lovell, (1988), ao avaliarem os níveis de treonina para alevinos de tilápias do Nilo, relataram que o melhor crescimento foi encontrado em peixes que receberam dieta com 10,50 g kg⁻¹ de treonina. Recentemente, Michelato *et al.* (2015) determinaram exigência de 11,5 g kg⁻¹ de treonina para a tilápias do Nilo na fase de terminação, em que consideraram além do ganho de peso, o rendimento de filé.

Estudos para determinar a exigência de treonina em dietas para outras espécies de peixes foram realizados por Zehra e Khan, (2014) para Indian major carp (*Catla catla*), de 14,5 g kg⁻¹, Feng *et al.* (2013) para Jian carp (*Cyprinus carpio*), de 16,2 g kg⁻¹, Abidi e Khan (2008) para Indian major carp (*Labeo rohita*), de 15,1 g kg⁻¹ e Ahmed *et al.* (2004) para a carpa indiana (*Cirrhinus mrigala*), de 18,0 g kg⁻¹ e Ahmed (2007)

para Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*), de 12,7 g kg⁻¹. As carpas não possuem digestão estomacal ácida e a digestão ocorre em pH neutro ou ligeiramente alcalino. O fornecimento de alguns aminoácidos pode alterar capacidade de tamponamento e prejudicar a absorção do aminoácido fornecido (Ahmed *et al.*, 2004). O menor aproveitamento de aminoácidos cristalinos pelas carpas pode ser resultado de uma rápida digestão, resultando em assincronia com a utilização dos aminoácidos ligados a proteína dos alimentos (Murai *et al.*, 1984). Assim como observado no presente trabalho, Michelato *et al.* (2015), Silva *et al.* (2006) e Bomfim *et al.* (2008) não observaram efeitos dos níveis dietéticos de treonina sobre a composição corporal.

No presente trabalho, o crescimento muscular dos peixes ocorreu por hiperplasia e hipertrofia e foi influenciado pelos níveis de inclusão de treonina nas dietas. Na classe de fibras com diâmetros menores que 20 µm, a maior frequência foi observada nos peixes que receberam as dietas com os menores níveis de inclusão de treonina, quando comparados aos maiores níveis de suplementação de treonina na dieta. Fibras com diâmetros menores que 20 µm indicam ocorrência de hiperplasia e maiores que 50 µm relacionam-se com a hipertrofia (Valente *et al.*, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001). Estes resultados estão de acordo com dados encontrados em literatura para a tilápia do Nilo (Aguiar *et al.*, 2005), com predominância no crescimento hiperplásico em peixes que receberam a dieta com os menores níveis de aminoácidos cristalinos. Peixes alimentados com dietas com mais de 12,34 g kg⁻¹ ou treonina apresentaram maior frequência de fibras entre 20 e 50 µm, indicando o início da hipertrofia das fibras recém-formadas por hiperplasia (Almeida *et al.*, 2008).

No presente trabalho, independentemente do nível de treonina consumido, foi observada frequência relativamente baixa de fibras com diâmetro maior que 50 µm, estando de acordo com Almeida *et al.*, (2008) que avaliaram a frequência de fibras musculares de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Peixes que consumiram dieta com 27,95 g kg⁻¹ de treonina apresentaram maior hipertrofia das fibras musculares em relação aos que receberam dieta com 9,05 a 21,21 g kg⁻¹ de treonina.

Estudos relacionados a exigência de treonina associados a avaliação das fibras musculares em peixes são inéditos, existindo informações somente com mamíferos. Wang *et al.* (2007) ao avaliarem a exigência de treonina para suínos, concluíram que a síntese proteica no músculo estriado esquelético foi afetada em resposta ao desequilíbrio dietético fornecido nas dietas. Os autores observaram que o excesso ou deficiência de treonina resultou em redução na síntese proteica de tecidos de rápido crescimento em

suínos jovens. Aguiar *et al.* (2005) avaliaram o efeito da suplementação da lisina sobre o crescimento do músculo estriado esquelético de larvas de tilápia do Nilo e concluíram que a síntese das fibras musculares foi maior nos peixes que foram alimentados com dietas suplementadas com lisina.

O crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares é determinado pela ativação, proliferação e diferenciação das células precursoras miogênicas (MPCs) ou mioblastos (Koumans & Akster, 1995; Johnston *et al.*, 2011). Esses eventos celulares são regulados pela expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs), entre os quais estão, a MyoD e a Miogenina (Watabe, 1999, 2001). Nos peixes, a expressão gênica da Miogenina tem sido relacionada com a diferenciação das MPCs em fibras musculares maduras durante a hipertrofia (Johansen & Overturf, 2005; Almeida *et al.*, 2008; Leitão *et al.*, 2011). No presente estudo, peixes que receberam dietas com 24,54 e 27,95 g kg⁻¹ de treonina apresentaram maior expressão do gene da Miogenina na musculatura branca, em comparação aos peixes que receberam o menor nível de treonina na dieta (9,05 g kg⁻¹). Esses resultados corroboram com a resposta morfométrica das fibras, na qual os peixes que receberam os dois maiores níveis de suplementação de treonina na dieta (24,54 e 27,95 g kg⁻¹) apresentaram maior frequência na classe de fibras com diâmetros entre 20 e 50 µm em relação aos que receberam o menor nível (9,05 g kg⁻¹). Essa mesma associação entre a expressão de Miogenina e a diferenciação de mioblastos durante a hipertrofia foi demonstrada para a truta arco-íris (Johansen & Overturf, 2005), pacu (Almeida *et al.*, 2008, 2010) e tilápia do Nilo (Nebo *et al.*, 2013).

Neste trabalho, peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina não apresentaram diferenças na expressão da MyoD, responsável pela proliferação das células satélites. Estes resultados estão de acordo com a análise da frequência das fibras musculares avaliada no presente estudo, em que não foi observado efeito dos níveis dietéticos de treonina sobre a frequência de fibras musculares. Apesar de não ter sido verificadas alterações nas variáveis do desempenho zootécnico, observou-se que os níveis crescentes de treonina foram capazes de influenciar a atuação da expressão da Miogenina dos peixes submetidos a essas dietas, em que os níveis crescentes de treonina foram responsáveis pela diferenciação dos fatores de regulação miogênica nas fibras musculares maduras durante o processo de hipertrofia que se mostrou significativo durante a avaliação das fibras musculares durante esta fase de cultivo.

No presente trabalho, dietas contendo níveis crescentes de treonina influenciaram a frequência de células mucosas do epitélio branquial dos peixes, ocorrendo redução nas células secretoras de muco ácido em peixes alimentados com a dieta com a menor concentração de treonina ($9,05 \text{ g kg}^{-1}$) em relação aos peixes que receberam dieta com o maior nível de inclusão de treonina ($27,95 \text{ g kg}^{-1}$). As células de muco neutro são mais densas e estão relacionadas com a proteção do tecido branquial (Reis *et al.*, 2009). Na presente pesquisa, foi observado maior frequência aumento na frequência dessas células em peixes que receberam dietas suplementadas com treonina. Por outro lado, a produção total de células mucosas do epitélio branquial foi mais expressiva em peixes que consumiram dietas a partir de $1,21 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina.

No presente trabalho, as células de muco neutro e ácido do epitélio branquial se apresentaram predominantemente na forma oval ou em forma de pera e encontraram-se distribuídas de forma uniforme em todo o epitélio branquial. Esta caracterização morfológica se apresentou de forma semelhante ao descrito na carpa capim (*Cyprinus carpio*) por Çinar *et al.* (2008), ao avaliarem diferentes técnicas histoquímicas para a caracterização de glicoproteínas secretadas no muco neutro (PAS) e ácido (AB pH 2,5) no segundo arco branquial.

As mucosubstâncias ácidas são mais solúveis do que as neutras quando entram em contato com o meio aquático, pois possuem maior quantidade de cargas elétricas residuais. Essa baixa viscosidade do muco ácido tem a função de proteger e lubrificar o epitélio branquial contra atritos (Reis *et al.*, 2009). No entanto, a quantidade de células mucosas do epitélio branquial pode ser alterada como uma resposta adaptativa aos fatores ambientais (Breseghelo *et al.*, 2004), como por exemplo a hipóxia, como observado na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e oscar da Amazônia (*Astronotus ocellatus*) por Matey *et al.* (2011). Esses autores relataram que ambas as espécies apresentaram rápida mudança na morfologia das brânquias causada pela hipóxia, ocorrendo grande quantidade de secreção de células de muco mais denso (mucinas neutras) durante este estado, e normalizando quando os peixes voltaram para o estado de não hipóxia (normoxia).

Trabalhos relacionados a exigências de treonina avaliando a frequência de muco em brânquias de peixes ainda são inéditos. No presente trabalho, os peixes que consumiram $21,21 \text{ g kg}^{-1}$ ou mais de treonina apresentaram aumento na frequência de células secretoras de muco, que estão relacionadas ao sistema de lubrificação e defesa dos tecidos, bem como a avaliação das proporções de muco neutro e ácido. Foi

observado ainda que a suplementação de 27,95 g kg⁻¹ de treonina não causou prejuízos sobre o desempenho produtivo e resultou em elevada produção de células produtoras de muco. Assim, é possível inferir que a exigência de treonina para produção de muco está acima da exigência para desempenho produtivo, considerando-se que Michelato et al. (2015) determinaram exigência de 11.5 g kg⁻¹ de treonina para máximo desempenho de tilápias do Nilo.

No presente trabalho, dietas contendo níveis crescentes de treonina também influenciaram a frequência entre as células muco neutro e ácido da mucosa intestinal dos peixes. O muco é caracterizado pela textura de gel, formado por glicoproteínas (mucinas) carregadas negativamente por açúcares (ácido silíaco ou sulfossacarídeos) (Perez-Vilar & Hil, 1999). A camada de muco do trato gastrointestinal atua como barreira de proteção das enzimas digestivas, abrasão mecânica proveniente do bolo alimentar, ao pH do suco gástrico, regulação osmótica, alimentação, respiração, reprodução, excreção e na proteção e resistência contra doenças (Schroers *et al.*, 2009). Em algumas espécies de peixes, há predominância da secreção as mucinas ácidas (e.g. Shi drum *Umbrina cirrosa*; Leknes, 2009) e algumas espécies secretam predominantemente mucinas neutras (e.g. Common Dentex *Dentex dentex*; Carrasson *et al.*, 2006). Segundo Bosi & Sayyaf Dezfuli (2015) a secreção de células de muco neutro e ácido aumentou significativamente em peixes parasitados por (*Pomphorhynchus laevis*).

O aumento na produção de muco intestinal em dietas suplementadas com treonina foi demonstrado em suínos (Bertolo *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 1999, 2002; Law *et al.*, 2000), frangos de corte (Ospina-Rojas *et al.*, 2013) e ratos (Fraure *et al.*, 2005). A treonina aumenta a produção de muco no intestino porque uma parte significativa da treonina consumida é utilizada no intestino para a síntese de secreções endógenas, particularmente mucinas (Law *et al.*, 2007). A elevada retenção da treonina dietética pelo intestino resulta em aumento da síntese deste aminoácido pelo intestino, estando associada a síntese desta proteína (Heys *et al.*, (1992); El Yousfi *et al.*, (2003). As mucinas intestinais possuem até 30% de treonina em sua composição Neutra & Forstner (1987) quando comparadas a outras proteínas a nível intestinal.

Em criação comercial, além do desempenho produtivo, é importante considerar os efeitos dos aminoácidos sobre a saúde dos peixes. No presente trabalho, concluiu-se que ainda que 9,05 g kg⁻¹ de treonina atenda a exigência para o desempenho produtivo, dieta com 12,34 g kg⁻¹ proporciona maior hipertrofia das fibras musculares sob a

influência da expressão da Miogenina e contribui para aumento da frequência de células produtoras de muco no epitélio branquial e no muco neutro e ácido na mucosa intestinal de tilápias do Nilo.

Referências:

- Abidi, S.F & Khan, M.A (2008) Dietary threonine of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Research*; **39**, 1498-1505.
- Aguiar, D. H., Barros, M. M., Padovani, C. R., Pezzato, L. E., Dal Pai-Silva, M. (2005) Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of Fish Biology*, **675**, 1287-1298.
- Ahmed, I. (2007) Dietary amino acid L-threonine requirement of fingerling Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) estimated by growth and biochemical parameters. *Aquaculture International*, **15**, 337-350.
- Ahmed, I., Khan, M., Jafri, A.K. (2004) Dietary threonine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Research*; **35**, 162-170.
- Alami-Durante, H., Wrutniak-Cabello, C., Kaushik, S.J., Médale, F. (2010) Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **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. (2010) Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*, **41**, 997-1004.
- Andersen, S.M., Waagho, R., Espe, M. (2016) Functional amino acids in fish nutrition, health and welfare. *Front Biosci (Elite Ed)*. Jan 1; 8: 143-69.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. pp. 1-30. AOAC, Arlington, VA, USA.

- Azzam, M.M.M., Zou, X.T., Dong, X.Y., Xie, P. (2011). Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity. *Poultry Science*, **90**, 2251-2256.
- Ball, R. O., Law, G., Bertolo, R.F.P., Pencharz, P.B. (1999) Adequate oral threonine is critical for mucin production and mucosal growth by the neonatal piglet gut. *Protein Metabolism and Nutrition*. Book of abstracts of the: *VIIIth International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition*. Abstract.
- Bertolo, R. F. P., Chen, C.Z.L., Law, G., Pencharz, P.B., Ball, R.O. (1998) Threonine requirement of neonatal piglets receiving total parenteral nutrition is considerably lower than that of piglets receiving an identical diet intragastrically. *Journal of Nutrition*, **128**, 1752-1759.
- Bomfim, M.A.D., Lanna, E.A.T., Dozele, J.L., Quadros, M., Ribeiro, F.B., Araújo, W.A.G.(2008) Exigência de treonina, com base no conceito de proteína ideal, de alevinos de tilápias do Nilo. *Revista Brasileira Zootecnia*, **37**, 2077-2084.
- Bosi, G. & Sayyaf Dezfuli, B. (2015) Responses of *Squalius cephalus* intestinal mucous cells to *Pomphorhynchus laevis*. *Parasitology International* **64**, 167-172.
- Breseghele, L., Cardoso, M.P., Oliveira, R. B., Costa, M. F., Barreto, J.C.B., Sabóia-Morais; S.M.T., Yamada, A.T. (2004) Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guarú (*Poecilia vivipara*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, **41**, 274-280
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T.(2009)The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.*Clinical Chemical*, **55**, 611-622.
- Cain, K. & Swan, C., (2011). Barrier function and immunology .In Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J.The multifunctional gut of fish: Fish Physiology:First Edition, Elsevier Inc. **30**.
- Carrasson, M., Grau, A., Dopazo, L. R., and Crespo, S. (2006). A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae).*Histology Histopathology*, **21**, 579–593.
- Çinar, K., Şenol, N., Özen, M. (2008) Histochemical characterization of glycoproteins in the gills of the carp (*Cyprinus carpio*).*Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **55**, 61-64.
- 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.
- Deriggi, G.F., Inoue, L.A.K.A. & Moraes, G. (2006).Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, **28**, 269-274.

- Du, S. J. (2004) Molecular regulation of fish muscle development and growth. *In: G. Zhiyuan e V. Korzh (Eds.), Fish development and genetics: the zebrafish and medaka models (2nd ed., pp. 339–391). Singapore: World Scientific Publishing.*
- El Yousfi, K., Breuille, D., Papet, I., Blum, S., Andre, M., Mosoni, L., Denis, P., Buffie` re, C. & Obled, C. (2003) Increased tissue protein synthesis during spontaneous colitis in HLA-B27 rats implies different underlying mechanisms. *Clinical.Science. (Lond.)*, **105**, 437-446.
- El-Sayed, A.F.M. (2006). *Tilapia culture*. 277p. CABI Publishing, Wallingford.
- Faure, M., C. Mettraux, D. Moennoz, J. P. Godin, J. Vuichoud, F. Rochat, D. Breuille, C. Obled, Corthesy-Theulaz, I. (2006). Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sodium-treated rats. *Journal of Nutrition*, **136**, 1558-1564.
- Faure, M., Moënnoz, D., Montigon, F., Mettraux, C., Breuillé, D., Ballèvre, O. (2005) Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *Nutrient Metabolism*, **135**, 486-491.
- Feng, L., Peng, Y., Wu, P, Hu, K., Jiang, W., Liu, Jiang, J., Li, S., Zhou, X. (2013) Threonine Affects Intestinal Function, Protein Synthesis and Gene Expression of TOR in Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Journal Pone*, **26**, 1-17.
- Furuya, W.M. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 2010, 100p.
- GraphPad Software (1998) GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, www.graphpad.com
- Heys, S. D., Park, K. G., McNurlan, M. A., Keenan, R. A., Miller, J. D., Eremin, O. & Garlick, P. J. (1992) Protein synthesis rates in colon and liver: stimulation by gastrointestinal pathologies. *Gut*, **33**, 976-981.
- Johansen, K.A., Overturf, K. (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*, **7**, 576-587.
- Johnston, I.A., Bower, N.I., Macqueen, D.J. (2011) Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, **214**, 1617-1628.
- Koumans, J.T.M. & Akster, H.A. (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **110A**, 3-20.
- Law, G., Alfred, Adjiri-Awere, R. P.B. Pencharz, P.B., Ball, R.O. (2000) Gut: Mucins in Piglets are dependant upon dietary threonine. *Advances in Pork Production* 11[10]. Abstract.
- Law, G., Bertolo, R.F.P., Adjiri-Awere, A., Pencharz, P.B., Ball, R.O. (2007). Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* **292**, 1293-1301.

- Leitão, N.J., Dal Pai-Silva, M., Almeida, F.L.A., Portella, M.C. (2011) The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture*, **315**, 78-85.
- Leknes, I. L. (2009). Histochemical study on the intestinal goblet cells in cichlid and poeciliid species (Teleostei). *Tissue and Cell*. Academic Press, New York.
- 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.
- Matey V., Iftikar, F.I., De Boeck, G., Scott, G.r., Sloman, K.A., Almeida-Val, V. M.F., Val, A.L., Wood, C.W. (2011) Gill morphology and acute hypoxia: responses of mitochondria-rich, pavement, and mucous cells in the Amazonian oscar (*Astronotus ocellatus*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), two species with very different approaches to the osmo-respiratory compromise. *Canadian Journal of Zoology*, **89**, 307-324.
- Michelato, M., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Graciano, T.S., Moura, V.R.B., Furuya, W.M. (2015) Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast-growing Nile tilapia. *Aquaculture Nutrition*.
- Murai, T., Ogata, H., Takeuchi T., Watanabe, T. & Nose, T. (1984) Composition of free amino acids in excretion of carp fed amino acid diets and casein-gelatin diets. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **50**, 1957
- National Research Council (1993) *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. pp. 57–95. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- 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*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **Part B 164**, 268-274.
- Neu, D.H., Boscolo, W.R., Zaminham, M., Almeida, F.L., Sary, C., Furuya, W.M. Essential amino acid, blood parameters, hypertrophy, hyperplasia, muscle fiber. *Journal of the World Aquaculture Society*. No prelo.
- Neutra, M. R. & Forstner, J. F. (1987) Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Johnson, L. R., ed.), pp. 975–1009. *Raven Press*, New York, NY.
- Ospina-Rojas, O., Murakami, A. E., Oliveira, C.A.L., Guerra, A. F. Q. (2013) Supplemental glycine and threonine effects on performance, intestinal mucosa development, and nutrient utilization of growing broiler chickens. *Poultry Science*, **92**, 2724-2731.

- Perez-Vilar, J., and Hill, R. (1999). The structure and assembly of secreted mucins. *Journal Biology Chemistry*. **274**, 31751–31754.
- Popma, T.L. & Lovshin, L.L. (1996) World wide prospects for commercial production of tilapia. *Research and Development Series*, **41**, 1-23.
- Reis, A.B., Sant'ana, D.M.G., Azevedo, J.F., Merlini, L.S., Araújo, E.J.A. (2009) Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **29**, 303-311.
- Romeis, B. (1968) Mikroskopische Technik. München.
- Rowlerson, A. & Veggetti, A. (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth. In: Johnston (ed.), muscle development and growth (1st ed., pp. 101-130). San Diego - Califórnia.
- Santiago, C.N.B. & Lovell, A.L. (1988) Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. American Institute of Nutrition. *JN-The Journal of Nutrition*. p. 1540-1546.
- Schroers V, van der Marel M, Neuhaus H, Steinhagen D. (2009) Changes of intestinal mucus glycoproteins after preoral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, **288**, 184-9.
- Silva, L.C.R., Furuya, W.M., Santos, L.D., Santos, V.G., Silva, T.S.C. & Pinsetta, P.J. (2006) Níveis de treonina em rações para tilápias-do-Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **35**, 1258-1264.
- Srivastava, N., Kumari, U., Kumari Rai, A., Mittal, S., Mittal, A.K. (2012) Histochemical analysis of glycoproteins in the gill epithelium of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Acta Histochemica*, **114**, 626-635.
- Statsoft, Inc. (2005). *Statistica* (data analysis software system), version 7.1.
- Stoskopf, M.K. (1993) Fish medicine. – W.B. Saunders Company, Philadelphia. 882pp.
- Tibaldi, E. & Tulli, F. (1999) Dietary threonine requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **175**, 155-166.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., e Fauconneau, B. (1999) Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast-and slow-growing strains of *Rainbow trout*. *Journal of Fish Biology*, **55**, 675-691.
- Wang, X., Qiao, S., Yin, Y., Yue, L., Wang, Z., Wu, G. (2007). A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. *The Journal of Nutrition*. **137**, 1442-1446.
- Watabe, S. (1999) Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of fish Biology*, **55**, 1-18.

- Watabe, S. (2001) Myogenic regulatory factors. *In*: I.A. Johnston (Ed.), Muscle development and growth (1st ed., Vol. 156, pp. 19-39). San Diego - California: *Academic Press Inc.*
- Yao K., Y.L. Yin, W. Chu, Z. Liu, D. Deng, T. Li, R. Huang, J. Zhang, B. Tan, W. Wang, and G. Wu. (2008) Dietary Arginine Supplementation Increases mTOR Signaling Activity in Skeletal Muscle of Neonatal Pigs. *The Journal of Nutrition*. **138**, 867–872.
- Zehra, S. & Khan, M. (2014) Dietary threonine requirement of fingerling Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton) estimated by growth, protein retention efficiency, threonine deposition, haematological parameters and carcass composition. *Aquaculture Research*, 1-13.
- Zhigang, H.E, Kangsen, Mai, Yan, Li, Zhenyan, Cheng, Qinghui, Ai. (2015) Dietary threonine requirement of juvenile large yellow croaker, *Larncichthys crocea*. *Aquaculture Research*, 1-9.
- Zimmermann, S. & Hasper, T.O.B. (2003) Piscicultura no Brasil: o processo deintensificação da tilapicultura. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, 2003, Santa Maria. Anais... Santa Maria: SBZ. CD ROOM.

III – Expressão dos genes MyoD e Miogenina, desempenho produtivo, morfometria muscular, frequência do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal e avaliação hematológica de tilápia do Nilo na fase de crescimento-terminação²

RESUMO: O presente trabalho foi delineado com o objetivo de avaliar os efeitos da inclusão de dietas com níveis crescentes de treonina sobre o desempenho produtivo, morfometria das fibras do músculo estriado esquelético, expressão dos genes (Miogenina e MyoD), frequência de células mucosas do epitélio branquial e da mucosa intestinal e respostas hematológicas de tilápias do Nilo, na fase de crescimento-terminação. Foram utilizados 270 juvenis de tilápias do Nilo com peso médio inicial de $54,5 \pm 1,7$ g, distribuídos em 18 tanques-rede de $1,3\text{m}^3$ cada. O experimento seguiu um delineamento experimental inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e três repetições, durante 100 dias. Os peixes foram alimentados com dietas contendo $14,1 \text{ MJ kg}^{-1}$ energia bruta e $293,6 \text{ g kg}^{-1}$ proteína bruta e níveis crescentes de treonina (8,6; 10,7; 13,6; 15,6 e $18,1 \text{ g kg}^{-1}$). Peixes alimentados com $10,7 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina apresentaram maior ganho em peso, taxa de eficiência proteica e maior consumo. Peixes alimentados com $10,7 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina apresentaram maior expressão da MyoD que modulou o processo hipertrófico das fibras musculares, aumentando a frequência de fibras com diâmetro de 20-50 e $<50 \mu\text{m}$. Peixes que receberam dietas suplementadas com treonina apresentaram aumento na frequência das células secretoras de muco na mucosa intestinal. Peixes alimentados com níveis crescentes de treonina não apresentaram diferenças na composição corporal, frequência das células secretoras de muco no epitélio branquial e parâmetros hematológicos. Concluiu-se que o nível de treonina de $10,7 \text{ g kg}^{-1}$ melhora o desempenho e maximiza o crescimento muscular e a expressão do gene MyoD e a produção de células produtoras de muco de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: aminoácido, nutrigenômica, peixe, MRFs.

²Artigo redigido de acordo com as normas de publicação da revista *Aquaculture Nutrition*. Fator de impacto = 1,395. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2095/issues](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2095/issues).

III- Expression of genes MyoD and Myogenin, productive performance, mucus synthesis in gill, intestinal tissue and hematological evaluation of grow-out Nile tilapia

ABSTRACT: This study was carried out to evaluate the effects of graded levels of dietary threonine on growth performance, morphometry of the skeletal muscle, gene expression (Myogenin and MyoD), frequency of mucus-secreting cells in the gill and intestinal tissue and hematological responses of grow-out Nile tilapia from 270 juveniles with average initial weight of 54.5 ± 1.7 g were distributed into 18 floating net cages of 1.3m^3 each. The experiment followed a completely randomized design with five treatments and three replicates, during 100 days. The fish were fed diets containing 14.1 MJ kg^{-1} gross energy and 293.6 g.kg^{-1} crude protein and graded levels of threonine (8.6, 10.7, 13.6, 15.6 and 18.1 g.kg^{-1}). Fish fed 10.7 g.kg^{-1} showed improved weight gain, protein efficiency rate and higher feed intake. Fish fed 10.7 g.kg^{-1} of threonine showed improved expression of MyoD that modulated the hypertrophic process of the muscle fiber growth by improving frequency of fibers occurrence of with 20-50 and $<50\text{ }\mu\text{m}$ in diameter. Fish fed diets supplemented with threonine showed increased frequency of mucus-secreting cells in the intestinal mucosa. Fish fed with increasing levels of threonine showed no differences on body composition, frequency of mucus-secreting cells in the gill epithelium and hematological parameters. It was concluded that 10.7 g.kg^{-1} of dietary threonine improves growth performance, maximizes muscle growth and expression of MyoD gene and production of mucus-secreting cells producing in Nile tilapia.

Key words: essential amino acid, nutrigenomic, fish, MRFs.

Introdução:

O balanceamento dietético de aminoácidos influencia o crescimento e saúde dos peixes (NRC, 2011). Em caso de deficiência, a síntese proteica e diversos processos fisiológicos podem ser prejudicados (D'Mello, 2003). A treonina é o terceiro aminoácido limitante em dietas para peixes com elevados níveis de alimentos de origem vegetal (Bodin *et al.*, 2008). Ainda que a exigência de treonina seja estabelecida para tilápias do Nilo (Silva *et al.*, 2006; Michelato *et al.*, 2015), ainda não há referências sobre os efeitos sobre a expressão de genes relacionados ao crescimento muscular.

Os peixes utilizados na aquicultura geralmente apresentam crescimento muscular indeterminado (Rowlerson & Veggetti, 2001). O crescimento muscular ocorre por meio da hiperplasia e hipertrofia e a contribuição relativa da hiperplasia e da hipertrofia para o crescimento muscular varia de acordo com a espécie, fase de crescimento, tipo de músculo (Aguiar *et al.*, 2005; Dal Pai-Silva *et al.*, 2003) e fatores nutricionais (Michelato *et al.*, 2016). A formação do tecido muscular estriado envolve a ação de diversos fatores regulatórios, atuando e regulando o processo de crescimento muscular por meio da ação de moléculas de sinalização, que se ligam a seus receptores e ativando ou reprimindo os fatores de transcrição intracelular (Du, 2004). Os eventos da miogênese são iniciados e controlados pela expressão diferencial de fatores transcricionais conhecidos como fatores de regulação miogênica (MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4 (Watabe, 2001).

As glândulas mucosas produzem a mucina, ajudando na formação de uma cobertura protetora sobre o revestimento de órgãos que se comunicam com o exterior do corpo. A importância biológica da interface rica do muco entre os peixes e seu ambiente aquoso abrange funções sobre a proteção mecânica e imunológica. (Genten *et al.*, 2009). O muco produzido pelos peixes faz parte do mecanismo de defesa e contém substâncias que inibem o crescimento e desenvolvimento de muitos parasitos, bactérias e fungos (Moraes & Martins, 2004). A avaliação do estado de saúde dos peixes por meio das alterações morfológicas e teciduais do epitélio branquial, mucosa intestinal e das análises hematológicas são consideradas ferramentas importantes para o diagnóstico do estado de saúde e desempenho produtivo do animal, podendo elucidar possíveis alterações causadas durante o cultivo. Os aminoácidos podem atuar em outras funções além da síntese proteica, como por exemplo, a treonina, são classificados como

aminoácidos funcionais (Lie *et al.*, 2009). No entanto, ainda não há estudos relacionando a suplementação de treonina com a produção de muco em tilápias.

A tilápia do Nilo (*O. niloticus*) é a segunda espécie de peixe mais cultivada no mundo (FAO, 2013). Além do rápido crescimento em criação intensiva possui elevada capacidade de utilizar a energia e nutrientes dos alimentos de origem animal e vegetal, possibilitando a elaboração de dietas de menor custo. Em criação intensiva, é importante adequar a suplementação para atender as exigências de aminoácidos para as atividades de manutenção, produção, reprodução e saúde dos peixes. No entanto, o confinamento em altas densidades gera situações de estresse que pode comprometer o crescimento a eficiência alimentar e a saúde dos peixes por meio de alterações morfológicas e teciduais (Cavichiolo, 2009).

A avaliação dos efeitos da treonina sobre os mecanismos que controlam o crescimento dos peixes importante, considerando que o filé é o principal subproduto do abate de tilápias em muitos países. Assim, o conhecimento dos efeitos da suplementação dietética de treonina sobre a expressão dos Fatores de Regulação Miogênica (MRFs), que regulam os mecanismos de hiperplasia e hipertrofia muscular, como a influência da produção de células secretoras de muco e influência sobre as respostas hematológicas, pode ser utilizado como ferramenta para maximizar a produção de tilápias. Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar o desempenho produtivo, morfometria muscular, expressão dos genes MyoD e Miogenina, produção de células produtoras de muco nas brânquias e mucosa intestinal e respostas hematológicas de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de treonina durante a fase de crescimento-terminação.

Material e métodos:

Peixes e manejo

O experimento foi realizado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) no município de Toledo- PR, base de estudos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE, Toledo, Paraná.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, através do Certificado Experimental no uso de

Animais em Pesquisa-CEUA/Nº12/2015, sob o protocolo Nº13/13, 16 de agosto de 2015, que se encontra em anexo.

Condições experimentais

Foram utilizados 270 juvenis de tilápia do Nilo ($54,5 \pm 1,7$ g), distribuídos em, constituído por 18 tanques-rede de $1,3 \text{ m}^3$ cada, alocados em tanque de concreto (18m comprimento x 11m largura x 2m altura) abastecido com água corrente (1L/segundo), proveniente do Rio São Francisco, localizado no Instituto de Pesquisa Ambiental e Aquicultura (InPAA) Toledo-PR. Semanalmente, foram realizadas coletas de dados de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido (mg/L) e pH da água do tanque, às 8 horas da manhã, por meio de um aparelho multiparâmetro digital portátil, respectivamente.

Dietas e manejo alimentar

Foram elaboradas seis dietas com diferentes níveis de inclusão de L-treonina 98%, de forma a se obter dietas com 8,6; 10,7; 13,6; 15,6 e 18,1g kg^{-1} de treonina. O aminoácido L-treonina foi incluído em substituição à L-alanina, de forma a manter as dietas isoproteicas (Tabela 1). As dietas foram elaboradas por meio da técnica de diluição (Abboudi *et al.*, 2007). As dietas foram elaboradas com aproximadamente 293,6 kg^{-1} proteína bruta e 14,1 MJ/kg^{-1} de energia bruta, de forma a atender às exigências nutricionais de tilápias (Furuya, 2010; NRC, 2011), com exceção de treonina. A composição proximal e as análises de aminoácidos foram analisadas anteriormente a montagem do experimento (Tabela 2). Na elaboração das dietas, após pesagem e homogeneização dos ingredientes, a mistura foi extrusada em extrusora de rosca simples (Extrusora Ex-Micro®, Ribeirão Preto SP, Brasil) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE, Toledo-PR, foram secas em estufa de ventilação forçada à 55°C durante 24 horas. Os peixes foram alimentados quatro vezes/dia, às 8h, 11h, 14h e 17h, por meio de arraçamento manual e até saciedade aparente, durante 100 dias.

Tabela 1. Formulação das dietas experimentais com níveis crescentes de treonina para tilápias do Nilo.

Ingrediente	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)				
	8,6	10,7	13,6	15,6	18,1
Farelo de trigo	354,00	354,00	354,00	354,00	354,00
Quirera de arroz	296,63	296,63	296,63	296,63	296,63
Glúten de milho 60%	155,06	155,06	155,06	155,06	155,06
Farinha carne e ossos 45%	150,00	150,00	150,00	150,00	150,00
Óleo soja	5,35	5,35	5,35	5,35	5,35
L-alanina	20,00	17,52	15,03	12,54	10,06
L-lisina HCl	7,65	7,64	7,63	7,63	7,62
L-treonina	0,00	2,51	5,02	7,53	10,04
L-tripofano	0,90	0,90	0,90	0,89	0,89
D L -metionina	0,21	0,19	0,18	0,17	0,15
Sal comum	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Sup. Min. e vitamínico	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00

¹Níveis 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, 2.500 mg; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg.

Tabela 2: Composição das dietas experimentais (g kg⁻¹, base na matéria seca)¹

	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)				
	8,6	10,7	13,6	15,6	18,1
Matéria seca	90,89	91,07	91,25	91,15	91,41
Energia bruta (kcal/kg)	3071,23	3084,37	3078,61	3074,99	3070,45
Proteína bruta	27,02	26,49	26,70	26,78	26,82
Extrato etéreo	2,08	1,89	2,61	2,29	2,65
Matéria mineral	8,00	8,14	7,84	7,91	7,94
Arginina	12,87	12,83	12,70	13,18	13,15
Fenilalanina	11,50	11,35	11,61	11,83	11,71
Histidina	5,25	4,85	4,67	4,84	5,02
Isoleucina	7,84	7,13	7,84	7,77	7,91
Leucina	24,47	23,50	23,76	24,72	25,00
Lisina	13,84	12,80	13,19	13,83	13,74
Metionina	4,71	4,61	4,90	4,86	5,12
Metionina+cistina	7,82	7,60	7,98	8,01	8,28
Treonina	7,78	9,79	12,42	14,22	16,51
Triptofano	2,83	2,82	2,88	2,86	2,83
Valina	10,31	10,03	10,52	10,78	10,76
Ácido aspártico	15,82	15,21	15,53	15,80	15,88
Ácido glutâmico	42,50	42,03	41,51	42,36	42,54
Alanina	35,14	32,98	30,59	30,32	27,82
Cistina	3,12	2,98	3,08	3,15	3,16
Glicina	17,26	17,23	17,34	16,94	16,65
Serina	10,56	10,64	10,76	11,14	11,25
Tirosina	8,97	8,56	8,97	8,77	9,05

¹Valores analisados

Desempenho produtivo e composição corporal

No início do experimento, todos os peixes foram pesados em balança de precisão digital (0,01g). Ao final do experimento, após jejum de 24 horas para esvaziamento do trato digestório, todos os peixes de cada unidade experimental foram anestesiados com benzocaína (100mg/L de água) (Stoskopg, 1993). Em seguida, foram tomadas as medidas de peso final (g), ganho em peso (g) = (peso final (g) – peso inicial (g)), conversão alimentar = quantidade de dieta fornecida (g)/ganho em peso (g), sobrevivência (%) = número de peixes ao final do experimento/número de peixes ao início do experimento *100, consumo alimento (g/kg) = dieta consumida/((1/2*(número de peixes final+número peixes inicial))); taxa de eficiência proteica = ganho em peso (g)/proteína consumida (g), gordura visceral (%) = peso da gordura visceral (g)/peso vivo (g)*100, índice hepatossomático (%) = peso do fígado (g)/ peso do peixe (g) *100. Três peixes de cada unidade experimental, escolhidos ao acaso, foram eutanasiados por meio de superdosagem de benzocaína (250mg/L de água) (Stoskopg, 1993) seguida da secção da medula cervical, e foram coletadas as amostras para as análises de expressão gênica, histologia de tecidos, composição corporal e sanguínea. As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade em Alimentos (LQA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Para as análises de composição corporal as amostras foram submetidas as análises de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral (AOAC, 1995).

Análises laboratoriais

A composição corporal dos peixes foi analisada segundo AOAC (1995) 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/Tecnal, MA-036, Piracicaba, SP, Brasil), extrato etéreo (extrator de Soxhlet com éter como solvente/Tecnal, TE-044, Piracicaba, SP, Brasil), e matéria mineral (calcinação das amostras a 550°C por 6 horas/Tecnal, 2000B, Belo Horizonte, MG, Brasil). As dietas experimentais pré-secas foram encaminhadas para o Laboratório da Ajinomoto Biolatina para a realização de análises de aminoácidos, por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Hitachi L-8800, Tóquio, Japão). O triptofano foi determinado após hidrólise ácida.

Análises hematológicas e bioquímicas

Para as coletas sanguíneas, três peixes de cada unidade experimental, foram capturados ao acaso, anestesiados em eugenol (60 mg L^{-1}) (Deriggi *et al.*, 2006), e retirou-se uma alíquota de 2,0mL por punção caudal, com auxílio de seringa heparinizada. Desta alíquota 0,5mL foi destinada às análises hematológicas e 1,5mL destinada as análises bioquímicas. No sangue total foram realizadas as análises de contagem total de eritrócitos, com utilização de 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 VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (hemoglobina corpuscular média), de acordo com Wintrobe (1934): $\text{VCM (fL)} = [(\text{hematócrito} \times 10)]/\text{eritrócitos}$; $\text{HCM } (\mu\text{g}) = [(\text{hemoglobina} \times 10)]/\text{eritrócitos}$ e $\text{CHCM (g.dL}^{-1}) = [(\text{hemoglobina} \times 100)]/\text{hematócrito}$. Posteriormente, foram realizadas análises bioquímicas de proteínas totais (g dL^{-1}), triglicerídeos (mg dL^{-1}), colesterol total (mg dL^{-1}), glicose (mg/dL) e albumina (g dL^{-1}). As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por cinco minutos. Para a realização das análises utilizaram “kits” específicos (Gold Analisa Diagnóstica®/Belo Horizonte, MG, Brasil), sendo as leituras processadas em espectrofotômetro, e procedidas conforme instruções do fabricante.

Análise morfométrica do músculo branco

A análise morfométrica do músculo branco das tilápias do Nilo foi realizada no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá - UEM. Para essa análise, foram coletadas amostras de três peixes de cada tanque, totalizando um n amostral total de nove peixes por tratamento. Fragmentos da musculatura branca dorsal dos exemplares dos peixes foram retirados e fixados em formol 10% durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações ascendentes de álcool, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina histológica, para a obtenção de cortes histológicos transversais semisseriados de $6\mu\text{m}$. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração hematoxilina-eosina para a avaliação do padrão morfológico e morfometria das fibras

musculares. Os cortes histológicos foram analisados em Microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 (Manila, Filipinas) acoplado com a câmera *Olympus* PMC 35 B (Berlim, Alemanha), utilizando objetiva de 20X para capturar os campos de observação. Utilizando o sistema de análise de imagens *Image Pro-Plus* versão 4.5.1 (Media Cybernetics), em campos aleatórios da lâmina histológica, foi determinado o menor diâmetro de 200 fibras musculares, por animal, que foram agrupadas em classes de diâmetros (< 20 , $20-50$ e > 50 μm) para avaliar a contribuição da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular (Almeida *et al.*, 2008, 2010) em cada tratamento. Os dados foram expressos como frequência de fibras em cada classe/número total de fibras medidas.

Avaliação da expressão gênica da MyoD e Miogenina

Para essas análises, foram coletadas amostras do músculo branco na porção mediana dorsal do corpo, de dois peixes de cada repetição, totalizando um n amostral de seis peixes por tratamento. Os fragmentos da musculatura coletados foram congelados em nitrogênio líquido, e posteriormente transferidos para freezer a -80°C , até o processamento em laboratório. As análises da expressão dos genes foram realizadas no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME) do Departamento de Morfologia, IBB, UNESP, Botucatu/SP. A expressão dos genes MyoD e Miogenina 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).

Foram utilizadas as seguintes metodologias:

Extração, quantificação e análise da integridade do RNA

O RNA total foi extraído das amostras musculares por meio do *TRIzol*® (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA), seguindo as orientações do fabricante. As amostras congeladas foram trituradas com o homogeneizador de tecidos *IKA*® *T-25 Digital Ultra-Turrax*® (IKA, Staufen, Baden-Württemberg, Germany) em 1mL de *TRIzol*®/50-100 mg de tecido muscular. O homogeneizado foi transferido para

um tubo de 1,5 mL e incubado durante 5 minutos na temperatura ambiente. Foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio e, posteriormente, os tubos foram agitados vigorosamente e incubados por 15 minutos na temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa formada após a centrifugação foi coletada e o RNA foi precipitado por meio da incubação com 0,5 mL de álcool isopropílico, durante 10 minutos na temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4°C, e o pellet de RNA resultante foi lavado com 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado a 12000xG por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Após secagem, o pellet de RNA foi dissolvido em *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) e armazenado a -80°C. Para a quantificação do RNA foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom), que forneceu a medida de absorvância a 260 nm (quantidade de RNA). Também foi realizada a medida de absorvância a 280 nm, que identifica a quantidade de proteínas e permite a análise da pureza do RNA extraído, garantida pela obtenção na razão de 260/280 nm superior a 1.8. Foram utilizadas somente amostras com razão igual ou superior a 1.8. A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A agarose foi dissolvida em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). Uma alíquota de 1 µL do RNA total foi adicionada a 5 µL da solução contendo o tampão de corrida OrangeG e o corante *GelRed®* (Biotium, Hayward, California, USA). Essa mistura foi aplicada no gel e submetida à corrida eletroforética a 120 V por cerca de 1 hora e 30 minutos. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e a integridade do RNA total extraído foi confirmada pela presença das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

RT-qPCR

Os níveis de expressão dos genes MyoD e miogenina foram detectados por *RT-qPCR*, por meio da plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA). Os níveis de expressão dos genes alvo foram normalizados pela expressão do gene de referência *β-actina*, cuja expressão foi constante entre todas as amostras. As amostras de cDNA foram amplificadas utilizando o *Fast SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific,

Carlsbad, California, USA). Os primers foram sintetizados pela Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, após terem sido desenhados por meio do *software Primer Express 3.0.1.®* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) (Tabela 3). Os primers foram diluídos em *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) e suas concentrações iniciais ajustadas para 5 µM. Conforme instruções do fabricante, foram utilizados 2 µL de cDNA, 2 µL de *Primer Forward*, 2 µL de *Primer Reverse*, 12,5 µL de *Fast SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA) e 6,5 µL de *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA), totalizando o volume final de 25 µL de solução. As reações foram realizadas em duplicata, nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Para cada corrida foi gerado um gráfico de amplificação, com o aumento da fluorescência (ΔRn) ao longo de cada ciclo da RT-q PCR. Para as amostras amplificadas com o *Fast SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, USA), foi feita a análise da Curva de Dissociação dos fragmentos ao término de cada reação, durante 20 minutos com temperatura da reação aumentada gradualmente de 60 para 95°C. O gráfico resultante da Curva de Dissociação possibilitou a avaliação da especificidade de amplificação de cada conjunto de primers, confirmada pela presença de um único pico de fluorescência. Após obtenção do Ct médio das duplicatas, foi calculado o valor de ΔCt ($Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene endógeno}}$) e de $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{amostra calibradora}}$). A quantificação relativa dos dados de expressão foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), expressa em *fold-change*.

Tabela 3: Primers utilizados para a amplificação da MyoD, Miogenina e β -actina por RT-qPCR.

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>MyoD</i>	CATCCAGCCCCCGCTCCAAC	GTCTGACAGGTGGGGCCGTT
<i>Miogenina</i>	CTCAACCAGCAGGACACTGA	ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT
<i>β-actina</i>	GCCAACAGGGAGAAGATGAC CCA	ACAGGGACAGCACAGCCTGG AT

Frequência das células de muco do epitélio branquial

Com o objetivo de verificar se as dietas com níveis de treonina influenciavam na frequência de muco do epitélio branquial, ao final do período experimental, foi coletado o segundo arco branquial (Srivastava *et al.*, 2012) do lado direito de três indivíduos de cada repetição, totalizando um *n* amostral de nove peixes por tratamento. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos-LQA/UNIOESTE/Campus Toledo-PR, e foram fixadas em solução de Bouin aquoso durante 48 horas, e posteriormente desidratadas em série de concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, para obtenção de cortes transversais semisseriados de 5 µm de espessura. Para a evidênciação das células mucosas, as amostras foram submetidas à técnica histoquímica de Alcian Blue pH 2,5 + ácido periódico de Schiff (PAS), para a evidênciação das células produtoras de muco neutro e muco ácido respectivamente. A coloração das lâminas foi realizada no Laboratório de Histotécnica Animal/UEM. Para avaliar a frequência de células secretoras de muco neutro e ácido, utilizou-se toda a extensão do filamento branquial, abrangendo as três regiões: proximal ao rastelo, denominada de região basal, posição intermediária e região apical do filamento, totalizando 40 imagens/animal, perfazendo o total de 360 imagens/tratamento. Para avaliar a quantificação total das células mucosas, utilizou-se a somatória de muco neutro e ácido das imagens utilizadas para a avaliação da análise de frequência citada acima, totalizando 40 imagens/animal, perfazendo o total de 360 imagens/tratamento. Esta análise foi realizada a partir de imagens capturadas com o auxílio de Microscópio Óptico P1 Olympus CX 31 (Manila, Filipinas) e fotografados com a câmera Olympus SC30 (Berlim, Alemanha), com objetiva de 40X. As análises foram realizadas utilizando o sistema de análise de imagem computadorizada Image – Pró Plus, versão 4.0 (Média Cibertecnicos).

Frequência das células de caliciformes da mucosa intestinal

Para as análises de frequência e quantificação das células caliciformes da mucosa intestinal, a coleta foi realizada no Laboratório de Apoio da UNIOESTE/Campus Toledo/Pr., em que foram coletadas porções de aproximadamente quatro centímetros de comprimento do intestino médio, e, primeiramente foi realizada a medida do comprimento total do intestino com o auxílio de trena de medidas, (abaixo da

junção do estômago até o reto) e posteriormente coletado a porção média do mesmo. Foram coletadas amostras do intestino médio de três peixes por unidade experimental. As amostras foram fixadas em placas de isopor, lavadas com solução salina, fixadas em solução de *Bouin* por 4 horas, desidratadas em série ascendente de álcool, diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina histológica, para a obtenção de cortes histológicos semisseriados de 7 μ m.

A coloração das lâminas foi realizada no Laboratório de Histologia/UEM. Para a visualização das células calciformes no epitélio intestinal, foram preparadas duas lâminas por animal, e uma foi corada com Azul de Alcian, pH 2,5 (reação de AB pH 2,5, que evidencia glicoconjugados ácidos), e outra lâmina foi corada em PAS e contra corada em hematoxilina (reação de PAS, evidencia glicoconjugados neutros); (Romeis 1968). A foto-documentação (captura de imagens) foi realizada no Laboratório de no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá/UEM, em Microscópio Óptico P1 *Olympus* BX 50 (Manila, Filipinas) acoplado com a câmera *Olympus* PMC 35 B (Berlim, Alemanha), utilizando objetiva de 40X, utilizando sistema de imagens computadorizado (*Image Pro Plus* – Versão 5.2- Media Cibernética). A frequência das células de muco do tecido intestinal foi realizada por meio da média de 15 imagens/3 cortes (obj.40x)/animal de 3 peixes por tratamento, perfazendo o total de 405 imagens por tratamento. A quantificação do total das células de muco intestinal foi obtida por meio da somatória total das células de muco neutro e ácido dos valores médios de 15 imagens/3 cortes (obj.40x)/animal de 3 peixes por tratamento, totalizando nove peixes por tratamento.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com seis tratamentos e três repetições, sendo uma unidade experimental composta por aquário de fibra de vidro com capacidade para 250L, contendo 12 peixes. Para a determinação da exigência de treonina, os dados de desempenho produtivo e da composição centesimal, foram submetidos à análise de regressão linear, ao nível de 5% de probabilidade. Os parâmetros de morfometria das fibras musculares, variáveis histológicas do muco do epitélio branquial e da mucosa intestinal e a expressão de genes foram analisados por meio de variância não paramétrica (Kruskal Wallis), seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett's, considerando o nível de 5% de significância por meio do

programa computacional Statistic 7.1 (Statsoft 2005). As análises estatísticas da expressão dos genes foram efetuadas por meio do programa computacional GraphPad Software (1998).

Resultados

Desempenho produtivo

Durante o período experimental foram observados valores médios de $22,5 \pm 1,6^\circ\text{C}$ para a temperatura; $4,5 \pm 1,7 \text{ mg L}^{-1}$ para oxigênio dissolvido; $7,61 \pm 0,3$ para o pH; $24,6 \pm 22,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ para a condutividade elétrica da água. O consumo de dietas com diferentes níveis de treonina influenciou ($P < 0,05$) o peso final, ganho de peso, consumo, a conversão alimentar e a taxa de eficiência proteica os peixes alimentados com níveis crescentes de treonina (Tabela 4). Os peixes alimentados com as dietas contendo o menor nível de inclusão de treonina $8,6 \text{ g kg}^{-1}$ obtiveram os piores ($P < 0,05$) resultados de ganho de peso e peso final, em comparação aos que receberam dietas com $10,7$; $13,6$ e $15,6 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina. No entanto, peixes alimentados com $18,1 \text{ g kg}^{-1}$ treonina não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) sobre o ganho de peso em relação aos que receberam as dietas com os demais níveis de treonina. O maior consumo ($P < 0,05$) foi observado em peixes alimentados com $15,6 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina, quando comparado aos peixes alimentados com $8,6$ e $13,6 \text{ g kg}^{-1}$ treonina. No entanto, em peixes que consumiram $10,7$ e $18,1 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina, o consumo foi semelhante ($P > 0,05$) ao dos peixes que receberam as demais dietas. Os melhores ($P < 0,05$) resultados de conversão alimentar e taxa de eficiência proteica foram obtidos em peixes alimentados com $10,7$ e $13,6 \text{ g kg}^{-1}$, quando comparados aos peixes alimentados com $8,6$; $15,6$ e $18,1 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina.

Composição corporal

O consumo de dietas com níveis crescentes de treonina não influenciou ($P > 0,05$) a composição corporal dos peixes alimentados com as dietas experimentais conforme (Tabela 5).

Tabela 4. Desempenho produtivo de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina¹.

	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)					P
	8.6	10.7	13.6	15.6	18.1	
Peso inicial(g)	54,36±0,74	55,16±1,26	55,53±0,34	55,22±0,60	55,60±3,01	0,1437
Peso final (g)	280,65±14.35 ^b	313,96±2.27 ^a	303,22±4,78 ^a	302,33±9.26 ^a	295,93±2,47 ^{ab}	0,0062
Ganho em peso (g)	226,29±13.68 ^b	258,80±3.32 ^a	247,69±4,53 ^a	247,10±8,92 ^a	240,33±0,62 ^{ab}	0,0055
Consumo (g/peixe)	337,04±19,42 ^b	360,56±9,45 ^{ab}	334,83±6,43 ^b	377,65±20,87 ^a	369,07±9,67 ^{ab}	0,0148
Conversão alimentar (g/g)	1,49±0,02 ^a	1,39±0,04 ^b	1,35±0,01 ^b	1,53±0,03 ^a	1,51±0,01 ^a	<0,0001
Taxa de eficiência proteica (%)	2,49±0,04 ^b	2,71±0,08 ^a	2,77±0,02 ^a	2,45±0,05 ^b	2,43±0,07 ^b	<0,0001
Índice hepatossomático (%)	3,67±0,60	5,07±0,17	4,67±0,21	4,68±1,00	4,55±1,11	0,2701
Índice gordura visceral (%)	6,42±1,11	6,85±0,36	5,90±0,31	6,65±0,26	6,47±0,20	0,3725

¹Os dados foram submetidos à análise do ANOVA, protocolo GLM, por meio do programa Statistic 7.1 (Statsoft, 2005).

Tabela 5. Composição corporal de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de treonina, com base na matéria mineral.

	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)						Valor P	Valor F	CV (%)
	Amostra inicial	8,6	10,7	13,6	15,6	18,1			
Umidade	71,99	63,72±0,60	62,33±1,85	64,78±2,12	63,48±2,67	62,73±1,90	0,60	0,70	2,81
Proteína	17,09	17,86±1,09	17,57±1,28	17,4±0,82	16,34±0,72	16,5±1,11	0,33	1,28	6,58
Extrato etéreo	6,22	12,4±1,40	15,15±1,64	15,42±0,53	18,23±7,47	15,5±1,43	0,44	1,00	21,31
Matéria mineral	5,71	5,37±0,36	6,05±0,77	5,2±1,55	5,19±1,32	4,71±0,67	0,63	0,65	18,07

CV=Coeficiente de variação (%). Os dados foram submetidos à análise do ANOVA, protocolo GLM, por meio do programa Statistic 7.1 (Statsoft, 2005).

Morfometria da musculatura branca

A morfologia da musculatura branca foi semelhante entre todos os tratamentos, mostrando fibras de formato poligonal separadas pelo endomísio e organizadas em fascículos delimitados pelo perimísio. A treonina dietética influenciou ($P < 0,05$) a frequência da morfometria das fibras musculares nas três classes de diâmetros avaliados (Tabela 6). Entre os tratamentos, na classe de fibras com diâmetros menores que 20 μm , a maior frequência das fibras foi observada no menor nível de inclusão da treonina, no tratamento de 8,6g kg^{-1} , quando comparada aos demais tratamentos (10,7; 13,6; 15,6 e 18,1 g kg^{-1}), os quais apresentaram frequências semelhantes. Na classe de fibras com diâmetros entre 20 e 50 μm , o nível de inclusão de 13,6 g kg^{-1} apresentou maior frequência se comparado ao nível de 18,1 g kg^{-1} . Nos animais dos tratamentos 8,6; 10,7 e 15,6 g kg^{-1} , as frequências foram semelhantes entre si. A frequência de fibras com diâmetros maiores que 50 μm foi maior no nível de suplementação de 18,1 g kg^{-1} de treonina, quando comparada com o nível de 13,6 g kg^{-1} . Nos demais tratamentos 8,6; 10,7 e 15,6 g kg^{-1} , as frequências foram semelhantes entre si. Entre colunas, os níveis 8,6; 10,7; e 15,6 g kg^{-1} , apresentaram a mesma frequência em relação à distribuição das fibras, em que as classes entre 20-50 e >50 μm , apresentaram maior frequência em relação à classe de fibras com diâmetro <20 μm . Já o nível de inclusão de 18,1 g kg^{-1} , apresentou maior frequência em relação à classe de fibras de 50 μm quando comparado com a classe de 20-50 e a classe com diâmetro <20 μm , apresentou a menor frequência de fibras. A classe de 13,6g kg^{-1} apresentou maior frequência na classe de fibras entre 20-50 μm quando comparada as classes de fibras de 50 μm , e a classe com diâmetro <20 μm , apresentou a menor frequência de fibras com diâmetros <20 μm .

Expressão gênica da MyoD e Miogenina

Expressão da MyoD no músculo branco da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) RT-qPCR. Dados expressos como média representada em unidades arbitrárias (Figura 1).

Tabela 6: Frequência de distribuição das fibras musculares em três classes de diâmetros (<20µm, entre 20 e 50 µm e >50 µm) em tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina¹.

Classe de diâmetro (%)	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)					P ¹	CV ³
	8,6	10,7	13,6	15,6	18,1		
<20µm	2,94±1,63 ^{Ab}	0,56±0,67 ^{Bb}	0,75±1,55 ^{Bc}	0,25±0,37 ^{Bb}	0,50±0,70 ^{Bc}	<0,01	117,67
20-50µm	54,25±11,51 ^{ABa}	47,56±6,32 ^{ABa}	61,56±12,01 ^{Aa}	51,87±8,58 ^{ABa}	42,56±10,94 ^{Bb}	0,008	12,44
>50µm	42,81±11,24 ^{ABa}	51,87±6,29 ^{ABa}	37,69±11,35 ^{Bb}	47,87±8,66 ^{ABa}	56,94±11,18 ^{Aa}	0,004	14,17
P ²	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		

¹Letras sobrescritas maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos em função do nível de treonina pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

²Letras sobrescritas minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as classes de fibra em função dos níveis de treonina pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade.

³CV=Coefficiente de variação (%).

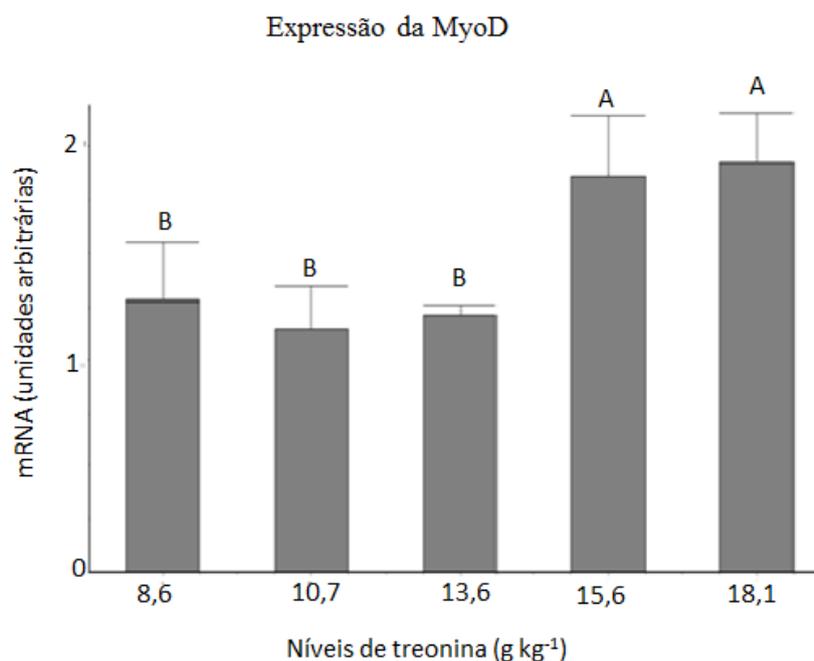


Figura 1: Níveis de expressão do gene MyoD (unidades arbitrárias) detectados no músculo branco da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) RT-qPCR. Letras distintas indicam diferenças pelo teste ANOVA e Tukey em 5%.

Houve diferença ($P < 0,05$) na expressão do gene MyoD entre os peixes que receberam as dietas diferentes níveis de inclusão da treonina na dieta. Peixes alimentados com 15,6 e 18,1g kg⁻¹ apresentaram maior expressão do gene MyoD no músculo branco. Por outro lado, peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de treonina não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) na expressão da Miogenina no músculo branco da tilápia do Nilo.

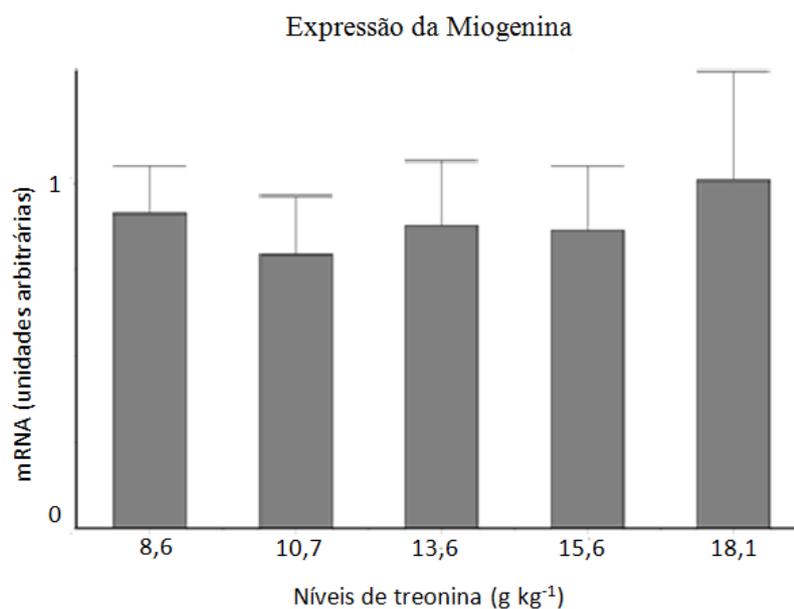


Figura 2: Níveis do gene *Miogenina* (unidades arbitrárias) detectados no músculo branco da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) RT=qPCR.

Frequência das células mucosas do epitélio branquial

Os níveis de treonina dietética não influenciaram ($P > 0,05$) a frequência entre as células secretoras de muco neutro e ácido e o muco total do epitélio branquial (Tabela 7).

Frequência das células de muco neutro e ácido da mucosa intestinal

A análise da frequência e quantificação das células de muco da mucosa intestinal foram influenciadas ($P < 0,05$) pelo consumo das dietas contendo níveis crescentes de treonina (Tabela 8).

Tabela 7: Frequência e quantificação das células secretoras de muco neutro e ácido do epitélio branquial de tilápia do Nilo, alimentadas com níveis crescentes de treonina na dieta¹.

Frequência						CV ²	P	F
	8,6	10,7	13,6	15,6	18,1			
Mucina ácida (%)	54,95±8,52	54,94±8,51	48,59±16,71	63,99±9,68	59,28±9,54	20,94	0,09	2,1
Mucina neutra (%)	45,05±8,52	45,06±8,51	51,41±16,71	36,01±9,68	40,72±9,54	26,89	0,09	2,1
Muco total	1342,37±213,69	1513,78±430,81	1360,51±266,04	1449,67±271,81	1435,73±295,72	20,29	0,75	0,46

¹Os dados foram submetidos à análise do ANOVA, protocolo GLM, por meio do programa Statistic 7.1 (Statsoft, 2005).

CV= Coeficiente de variação (%).

Tabela 8: Frequência e quantificação das células caliciformes de muco neutro e ácido da mucosa intestinal de tilápias do Nilo alimentadas com níveis crescentes de treonina na dieta¹.

Muco intestinal	Níveis de treonina na dieta (g kg ⁻¹)					P	F	CV ²
	8,6	10,7	13,6	15,6	18,1			
Muco Ácido (%)	60,35±7,77a	58,65±4,44a	49,79±6,65b	54,9±8,09ab	56,21±5,62ab	0,009	3,43	12,2
Muco Neutro (%)	39,64±7,77b	41,34±4,44b	50,2±6,65a	45,09±8,09ab	43,78±5,62ab	0,009	3,43	15,44
Muco total	1347±332,59b	1537,8±274,76ab	1515,7±352,76ab	1637,7±366,14ab	1407±328,75ab	0,04	2,44	23,67

¹Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos segundo o teste ANOVA e Tukey, por meio do programa Statistic 7.1 (Statsoft, 2005).

²CV=Coeficiente de variação (%).

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as análises de frequência e quantificação das células caliciformes da mucosa intestinal. Peixes alimentados com 8,6; 10,7; 15,6 e 18,1 g kg⁻¹ apresentaram maior frequência do muco ácido, porém não diferiu dos peixes alimentados com 13,6; 15,6 e 18,1 g kg⁻¹ treonina. Para muco neutro, a maior frequência foi observada em peixes alimentados com 13,6; 15,6; e 18,11 g kg⁻¹ de treonina, mas não diferiu dos peixes que receberam dietas com 8,6 e 10,7 g kg⁻¹ de treonina. Peixes alimentados com 10,7; 13,6; 15,6 e 18,1g kg⁻¹ treonina apresentaram níveis mais elevados de células produtoras de muco. A menor quantidade de células produtoras de muco foi observada em peixes que consumiram a dieta com 8,6 g kg⁻¹.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

O consumo de dietas com níveis crescentes de treonina não influenciou ($P > 0,05$) os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos peixes (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tilápias alimentadas com níveis crescentes de treonina na dieta.

Parâmetros	Níveis de treonina (g kg ⁻¹)					Valor P	Valor F	Efeito
	8,6	10,7	13,6	15,6	18,1			
Hematológicos								
Eritrócitos (10 ⁶ .µL ⁻¹)	2,12±0,10	2,14±0,04	2,12±0,09	2,18±0,14	2,18±0,11	0,95	0,2	NS
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	8,67±0,40	8,55±0,49	9,48±1,30	8,27±0,08	8,74±0,40	0,44	1,02	NS
Hematócrito (%)	38,58±1,29	39,06±0,23	39,89±3,01	39,28±0,75	38,83±0,76	0,83	0,41	NS
VCM ² calculado (fL)	185,6±0,14	182±0,02	188,47±0,20	180,3±0,11	177,67±0,10	0,85	0,38	NS
HCM ³ (µg)	40,8±3,75	39,8±2,70	44,73±6,66	37,93±2,47	40,8±3,86	0,39	1,14	NS
CHCM ⁴ (g.dL ⁻¹)	22,75±0,35	21,83±1,42	23,97±4,97	21,03±0,65	22,43±1,10	0,78	0,48	NS
Bioquímicos								
Glicose (mg.dL ⁻¹)	68,86±12,87	57,04±10,49	59,84±9,70	58,24±9,02	50,78±5,73	0,34	1,25	NS
Albumina (g/dL)	1,17±0,02	1,25±0,17	1,24±0,04	1,3±0,04	1,22±0,03	0,53	0,85	NS
Proteína total (g.dL ⁻¹)	4,49±0,12	4,71±0,14	4,66±0,32	4,64±0,36	4,46±0,21	0,58	0,77	NS
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	158,69±49,73	174,37±43,28	167,91±43,10	155,58±6,86	150,85±27,46	0,96	0,18	NS
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	764,35±306,24	778,4±140,39	696,53±324,88	537,97±180,93	639,82±65,23	0,66	0,65	NS

¹Os dados foram submetidos a análise de regressão a 5% de probabilidade por meio do programa Statistic 7.1 (Statsoft, 2005).

VCM²= volume corpuscular médio; HCM³= hemoglobina corpuscular média; CHCM⁴= concentração de hemoglobina corpuscular média;

*NS= não significativo (P>0,05).

Discussão:

Ao final do período experimental, não foram observadas anormalidades morfológicas nos peixes que foram submetidos às dietas contendo os diferentes níveis de treonina, os peixes tiveram índice de sobrevivência acima de 98%. Os parâmetros de qualidade de água monitorados durante o período experimental atenderam as condições para o bem-estar e conforto térmico de peixes tropicais. As tilápias apresentam crescimento satisfatório quando criadas em águas com temperaturas entre 24 e 30 °C (El-Sayed 2006). No presente estudo, os teores de oxigênio dissolvido permaneceram acima de 3 mg L⁻¹, sendo adequados para manter o crescimento ótimo da tilápia (Coche, 1982). Da mesma forma, os valores pH permaneceram próximo ao neutro e a condutividade elétrica entre 20 e 150 µS cm⁻¹, adequados para a criação de tilápias (Popma e Lovshin 1995; Sibaúba-Tavares, 1995; Kubitzka, 2000).

A eficiência de utilização de aminoácidos depende do balanceamento de aminoácidos e do nível energético da dieta (Ahmed *et al.*, 2004). O fornecimento de dietas com níveis adequados de aminoácidos essenciais nas dietas aumenta a deposição proteica e conseqüentemente, o crescimento dos peixes e a utilização da proteína dietética. A deficiência de um único aminoácido causa redução no ganho em peso, piora na conversão alimentar e reduz a síntese proteica (Wilson & Halver, 1986).

A inclusão de níveis adequados de treonina é um pré-requisito para a formulação de dietas nutricionais adequadas para o cultivo de peixes. Observa-se grande variação na exigência de treonina, que podem estar relacionadas à espécie, à idade, ao tipo de dieta fornecida e composição nutricional da dieta (Silva *et al.*, 2006). Além disso, há influência dos fatores ambientais, condições laboratoriais (DeLong *et al.*, 1962), duração do experimento (Abboudi *et al.*, 2007) e aos diferentes critérios e testes estatísticos utilizados na interpretação dos dados (Rodehutschord *et al.*, 1997). As respostas nutricionais geralmente ocorrem após período de 30 dias de experimento (Brett & Zala, 1975; Kaushik, 1980), sendo importante para adaptação do metabolismo para a nova dieta da fornecida, refletindo em mudanças nas condições de manutenção e produção (Beck & Gropp, 1995). No presente estudo, o experimento durou 100 dias, sendo adequado para avaliação nutricional dos efeitos do aminoácido avaliado.

No presente trabalho, foram observados efeitos dos níveis de treonina dietética sobre o desempenho produtivo da tilápia do Nilo, corroborando com os resultados relatados por Silva *et al.* (2006) e Michelato *et al.* (2015), ao avaliarem níveis crescentes de treonina para a tilápia do Nilo durante a fase de juvenil a terminação, em que encontraram valores ideais de inclusão de 13,5 e 11,50 g kg⁻¹ treonina. Helland & Helland (2011) e Helland *et al.* (2013), ao avaliarem níveis de treonina para o Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) durante a fase juvenil, observaram máximo desempenho produtivo em peixes alimentados com 13,1 e 13,3 g kg⁻¹ treonina, respectivamente. O Salmão do Atlântico é uma espécie ectotérmica, vivendo em águas frias (Elliot, 1991). Comparados com animais homeotérmicos, essa espécie apresenta reduzida síntese proteica e “turnover” (Houlihan *et al.*, 1995) e possui baixa exigência de aminoácidos para manutenção em relação aos animais homeotermos (Rollin *et al.*, 2006).

No presente trabalho, dietas com excesso de treonina não resultaram em maior mortalidade ou redução no ganho de peso dos peixes. O menor crescimento de peixes alimentados com dietas com excesso de treonina resulta em elevado gasto energético durante a desaminação e excreção da treonina ingerida em excesso (Walton, 1985). Harper *et al.* (1970) e Murthy & Varghese, (1996), reportaram que a desproporção entre os aminoácidos afeta a digestão e a absorção dos mesmos. No entanto, Helland & Helland (2011), reportaram que o ganho em peso e a taxa de eficiência proteica, não foram afetados em peixes alimentados com excesso de treonina. No presente trabalho,

No presente estudo, a composição corporal dos peixes não foi influenciada pelos níveis de treonina das dietas, similar aos resultados por Silva *et al.* (2006) e Bomfim *et al.* (2008) e Michelato *et al.* (2015), quando avaliaram níveis de treonina para a tilápia do Nilo. Por outro lado, Ahmed *et al.* (2004), Ahmed, (2007) e Abidi e Khan (2008) relataram aumento na deposição de proteína corporal em peixes alimentados com mais de 12,5 g kg⁻¹ de treonina na dieta. Segundo Ahmed, (2007) este resultado pode ser explicado pela maior eficiência de utilização dos aminoácidos dietéticos, resultando em maior síntese proteica. Segundo Tibaldi & Tulli (1999), a retenção de nitrogênio parece ser o melhor parâmetro para a determinação das exigências de aminoácidos para peixes, considerando-se que o ganho em peso não é resultado somente do acréscimo corporal de proteína, mas também envolve a deposição de gordura e outros componentes.

No presente estudo, a morfologia da musculatura branca com fibras de formato poligonal separadas pelo endomísio e organizadas em fascículos delimitados pelo perimísio foi semelhante ao descrito em tilápias por Dal Pai-Silva *et al.* (2003) e pacu (Almeida *et al.*, 2008). Entre as dietas avaliadas, a análise morfométrica das fibras musculares mostrou que o crescimento muscular ocorreu por ação da hiperplasia e início da hipertrofia e hipertrofia em maior frequência, durante o período do experimento (Tabela 6). Segundo Valente *et al.* (1999) e Rowleron & Veggetti, (2001), as classes de fibras diferem de acordo com a fase de crescimento do animal, em que fibras com diâmetros menores que 20 μm indicam ocorrência de hiperplasia, enquanto diâmetros entre 20 e 50 μm e maiores que 50 μm relacionam-se com a hipertrofia.

Os diferentes níveis de treonina nas dietas influenciaram a frequência de fibras nas três classes de fibras avaliadas durante a fase de terminação das tilápias. Na classe de fibras com diâmetro menor que 20 μm , a maior frequência, foi observada nos peixes que receberam o menor nível de treonina na dieta (8,6 g kg^{-1}), quando comparados aos demais peixes que receberam as dietas entre (10,7 a 18,1 g kg^{-1}). Dessa forma, nos peixes que receberam o menor nível de treonina na dieta, a hiperplasia na musculatura foi mais intensa em relação aos demais tratamentos avaliados, resultado que também foi observado por Aguiar *et al.*, (2005), ao avaliarem inclusão de aminoácidos na forma cristalina em dietas para a tilápia do Nilo.

No presente estudo, os peixes que receberam as dietas contendo 13,6 g kg^{-1} de treonina apresentaram maior frequência fibras com diâmetro entre 20 e 50 μm , quando comparado aos que foram alimentados com 18,1 g kg^{-1} treonina, que indicou o início da hipertrofia das fibras recém-formadas por hiperplasia (Almeida *et al.*, 2008). A frequência de fibras com diâmetros $>50 \mu\text{m}$ foi maior nos peixes que receberam a dieta com 18,1 g kg^{-1} treonina, comparado aos peixes alimentados com 13,6 g kg^{-1} de treonina, sugerindo que o menor nível de treonina (8,6 g kg^{-1}) foi suficiente para promover o início da hipertrofia, observado pela maior frequência de fibras com 20 a 50 μm e maiores que 50 μm de diâmetro. Segundo Rowleron & Veggetti, (2001) peixes a elevada frequência de fibras com diâmetro maior 50 μm indica a ocorrência de um mecanismo de crescimento característico, com a presença de fibras musculares diferenciadas.

Dentro de cada tratamento, independentemente do nível de treonina, as maiores frequências de fibras nas classes entre 20 e 50 μm e maiores que 50 μm indicaram que a hipertrofia foi o principal mecanismo que contribuiu para o crescimento muscular de

tilápias do Nilo na fase crescimento-terminação. Esses resultados são semelhantes ao descrito para o pacu avaliado durante esta fase de crescimento (Almeida *et al.*, 2008). De acordo com Zimmerman & Lowery (1999), o recrutamento de novas fibras musculares durante o crescimento muscular cessa quando o animal atinge 44% do seu peso final. Segundo esses mesmos autores, após esse período, o crescimento muscular ocorre predominantemente por hipertrofia.

O controle molecular do crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares tem sido avaliado pela expressão dos genes MyoD e Miogenina (Johansen & Overturf, 2005; Almeida *et al.*, 2008, 2010; Leitão *et al.*, 2011; Nebo *et al.*, 2013). A proliferação de mioblastos, durante o crescimento muscular, pode ser inferida pela expressão da MyoD, enquanto a diferenciação dessas células é controlada pela expressão de Miogenina (Watabe, 1999, 2001).

No presente trabalho, níveis de treonina avaliados entre 15,6 e 18,1g kg⁻¹ relacionaram-se com a maior expressão de MyoD na musculatura dos peixes. A maior expressão de MyoD nos peixes que receberam as dietas contendo os maiores níveis de treonina pode estar relacionada com a maior proliferação de mioblastos que contribuíram, predominantemente, com a hipertrofia das fibras musculares, conforme demonstrado pela maior frequência de fibras nas classes de diâmetros entre 20 e 50 µm e maiores que 50 µm. No presente estudo, a maior expressão do MyoD pode estar relacionada com a proliferação de mioblastos, durante a hiperplasia, e, em maior intensidade, para a hipertrofia, conforme demonstrado pela análise morfométrica. Concordando com os resultados obtidos no presente trabalho, alguns estudos mostraram que os mioblastos em proliferação podem contribuir com o processo de hipertrófico ou hiperplásico das fibras musculares sob controle da expressão da MyoD (Almeida *et al.*, 2008, 2010; Nebo *et al.*, 2013).

Na literatura, são escassos os estudos envolvendo a influência da suplementação de aminoácidos na dieta sobre os mecanismos de crescimento muscular. O crescimento hipertrófico ocorre pela incorporação de núcleos de mioblastos, que sofreram proliferação, a uma fibra preexistente (Rowlerson & Veggetti, 2001; Johnston, 2011). A proliferação dos mioblastos disponibiliza esses núcleos para a hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares sob controle da expressão da MyoD (Almeida *et al.*, 2008, 2010; Nebo *et al.*, 2013).

No presente estudo, a expressão gênica da Miogenina dos peixes não foi afetada pelos diferentes níveis de treonina utilizados nas dietas. No entanto, os níveis de

Miogenina detectados foram suficientes para promover a diferenciação dos mioblastos durante a hipertrofia das fibras musculares em todos os tratamentos, conforme demonstrado na análise morfométrica. Essa mesma associação entre a expressão de Miogenina e a diferenciação de mioblastos durante a hipertrofia foi demonstrada em várias espécies de peixes, como truta arco-íris (Johansen & Overturf, 2005), pacu (Almeida *et al.*, 2008, 2010) e tilápia do Nilo (Nebo *et al.*, 2013).

No presente estudo, foram observadas diferenças na contribuição dos mecanismos de crescimento muscular por hiperplasia e hipertrofia e na expressão gênica do MRF MyoD em peixes que receberam dieta com 10,7 g kg⁻¹ ou mais de treonina. O aumento nos níveis de treonina promoveu diminuição na contribuição da hiperplasia em relação ao menor nível de suplementação avaliado. A expressão de Miogenina, embora não tenha sido influenciada pelas diferentes dietas, relacionou-se com a diferenciação dos mioblastos durante a hipertrofia, que foi o mecanismo de crescimento predominante em todos os tratamentos.

As respostas teciduais das brânquias, por meio de estudos relacionados à histopatologias, são valiosas ferramentas para avaliar o estado de saúde de peixes submetidos ao estresse ou como forma de avaliar o estado nutricional do mesmo (Cavichiolo *et al.*, 2000). No presente trabalho, a frequência de produção de células secretoras de muco neutro e ácido e a quantitativa da produção total de células mucosas nos filamentos branquiais de tilápias do Nilo não foram influenciados pelos níveis crescentes de treonina nas dietas. As brânquias estão entre as estruturas mais sensíveis do corpo dos teleósteos e sua localização em contato com o meio externo as torna susceptível a fatores que podem causar danos a sua estrutura ou integridade, por meio de materiais solúveis que estão em contato com a água (Roberts, 2012). Um dos mecanismos de proteção deste epitélio branquial é a secreção da camada de glicoproteínas e glicolipídeos (Burkhard-Holm, 1997). Tal mecanismo é verificado pelo aumento do número de células mucosas do epitélio branquial (Sabóia-Morais *et al.*, 2006).

Ojha e Hughes (1988) e Munshi e Singh (1968) relataram que as células de muco são responsáveis por manter o epitélio livre dos sedimentos provenientes da água durante o processo de oxigenação, podendo comprometer a respiração dos peixes, porém a proliferação e hipersecreção das células mucosas nas brânquias frente a situações de estresse podem ser compreendidas como mecanismo de defesa, em função

da resposta defensiva crônica, podendo comprometer a função branquial dependendo da severidade do processo (Mallatt, 1985).

As células produtoras de muco são pequenas, recobrando o epitélio dos arcos e a superfície interior dos rastros branquiais e possuem forma de taça ou arredondadas e são observadas em intervalos irregulares. Em contraste, no epitélio sobre a superfície exterior dos rastros branquiais, as células mucosas, em geral, são grandes, e possuem forma de saco. Os núcleos são arredondados e se apresentam em posição basal. A presença de células de muco na superfície do epitélio branquial é uma característica comum de peixes, e possui função de proteção do tecido e pode ser considerada uma característica de adaptação, sua densidade pode variar em diferentes regiões das brânquias (Srivastava *et al.*, 2012).

Reis *et al.* (2009) ao avaliarem as alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*O. niloticus*) em cultivo intensivo, observaram que houve aumento expressivo do número de células produtoras de mucinas neutras nos animais do grupo T3 em relação ao T2 e T1 (grupo controle), contudo não houve diferença no número destas células nos animais do T4 (menor nível de oxigênio dissolvido na água). Segundo Myers *et al.* (2008), mucinas ácidas são mais solúveis do que as neutras quando entram em contato com o meio aquático, visto que possuem maior quantidade de cargas elétricas residuais.

Estudos relacionados com a suplementação de treonina avaliando a frequência de muco no epitélio branquial de peixes são inéditos, porém há estudos avaliando a suplementação de treonina a nível histológico para outras espécies de animais como suínos (Primotet *et al.*, 2008), ratos (Fraure *et al.*, 2005) e aves (Ospina-Rojas *et al.*, 2013) que confirmam que a treonina é responsável pelo incremento da produção de muco na mucosa intestinal dos mesmos. Isso ocorre porque a fração de treonina que é absorvida pelo íleo é requerida para a produção de secreções digestivas, entre as quais está o muco. As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular e particularmente ricas em treonina (Le Bellego, 2002).

Os resultados deste trabalho demonstram que a média da frequência de secreção de mucinas neutras (43,6%), quanto ácidas (56,3%), bem como a avaliação da quantidade total média de muco secretado pelo tecido branquial (1419,8 células/tratamento), obtiveram proporções de síntese de muco semelhantes em todos os tratamentos, esses resultados indicam que a inclusão da treonina na forma cristalina não

alterou a síntese de muco no tecido, não comprometendo o estado fisiológico das brânquias.

No presente trabalho, dietas contendo níveis crescentes de treonina influenciaram a frequência de síntese entre as células muco neutro e ácido no tecido intestinal dos peixes. Segundo Shiraishi *et al.* (2009), avaliaram dinâmica de secreção de mucinas secretadas pela ação de parasitos e concluíram que o muco neutro se apresentou mais denso que o muco ácido. O muco neutro possui maior capacidade de proteção e lubrificação quando as células mucosas são expostas a agentes abrasivos, irritantes e tóxicos. A camada de muco é a primeira linha de defesa contra inflamações do epitélio gastrointestinal, fornecendo proteção contra patógenos, enzimas e substâncias químicas que podem afetar o epitélio intestinal (Johansson *et al.*, 2013).

Neste estudo, dietas contendo níveis crescentes de treonina influenciaram a quantidade de células de muco do tecido intestinal. Peixes que consumiram a dieta com mais de $10,7 \text{ g kg}^{-1}$ de treonina apresentaram aumento na secreção das células mucosas. Segundo Pelaseyed *et al.* (2012), a maior parte da treonina ingerida é absorvida pelo íleo e é inteiramente enviada para a corrente sanguínea. A treonina absorvida é necessária para a produção de secreções digestivas, entre as quais está o muco. A camada de gel de muco secretado pelas células caliciformes espalhadas ao longo das vilosidades intestinais atua na proteção da mucosa intestinal da ação das enzimas digestivas e também contra danos físicos causados pelo alimento que está sendo digerido, bem como limita o número de bactérias que possam causar danos ao epitélio. Segundo Bansemer *et al.* (2015), ao investigarem os efeitos de níveis crescentes de duas dietas à base de farelo de soja para Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*), concluíram que o aumento da inclusão do farelo de soja diminuiu a quantidade de células secretoras de muco no intestino.

No presente trabalho, os parâmetros hematológicos dos peixes não foram influenciados pelos níveis de inclusão de treonina das dietas. A avaliação desses parâmetros permite inferir sobre a resposta das espécies frente aos desafios de cultivo, contribuindo também para esclarecer determinadas situações relacionadas à dieta fornecida, efetivando-se como importante ferramenta para avaliação das condições sanitárias e dos parâmetros de defesa orgânica, fornecendo subsídios para estabelecer prognóstico dos peixes em condições relacionadas a possível patologia (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

A hemoglobina é responsável pelo transporte oxigênio e gás carbônico através das células chamadas de eritrócitos, e sua redução pode significar menor capacidade de transporte de gases no interior do corpo (Tavares-Dias e Moraes, 2004; Ranzani-Paiva, 2007). As alterações do hematócrito estão frequentemente relacionadas à resposta do organismo frente aos processos anemiantes (Satake *et al.*, 2009). Os valores médios dos parâmetros sanguíneos encontrados neste estudo, para a contagem de eritrócitos $2,15 \pm 0,03 \cdot 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$, hemoglobina $8,70 \pm 0,42 \text{ g/dL}$ e hematócrito $38,92 \pm 0,67 \%$ encontram-se próximos aos valores relatados por Fernandes Junior *et al.*, (2010), Araujo *et al.* (2011) e Hisano *et al.* (2006) ambos avaliando a tilápia do Nilo.

Zehra & Khan, (2014) relataram que os valores da contagem de eritrócitos ($2,91 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$), hemoglobina ($9,05 \text{ g dL}^{-1}$) e hematócrito (28,38 %) obtidos para Indian Major Carp (*Catla catla*), quando submetidas aos níveis crescentes de treonina na dieta, influenciaram ($P < 0,05$) os parâmetros sanguíneos citados acima, e concluíram que os valores mais altos foram encontrados nos peixes submetidos a dietas com níveis de treonina acima de $14,8 \text{ g kg}^{-1}$. Esses valores encontrados podem estar relacionados com a suplementação ideal de proteína na dieta, em que se obteve melhor síntese proteica, e melhores níveis de desempenho zootécnico.

O Volume Corpuscular Médio (VCM), expressa o volume médio dos eritrócitos. A variação média do VCM obtida foi de $181,58 \pm 4,87 \text{ fL}$. Através dos valores da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) foi obtido o peso médio da hemoglobina contida no interior dos eritrócitos. A variação média do HCM mostrou-se entre $40,28 \pm 2,57 \mu\text{g}$ e a Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), determinou o peso da hemoglobina em 100 mL de sangue (Ranzani-Paiva & Souza-Silva, 2004). A variação média do CHCM mostrou-se entre $22,27 \pm 1,03 \text{ g.dL}^{-1}$. As variações desses parâmetros hematimétricos, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Esses resultados encontraram-se próximos aos apresentados por peixes da mesma espécie, por Hisano *et al.* (2003), Araujo *et al.* (2011), e Bittencourt *et al.* (2003).

No presente estudo, os parâmetros bioquímicos dos peixes não foram influenciados pelos níveis de treonina nas dietas. As proteínas plasmáticas são produzidas primeiramente pelo fígado e pelo sistema imune. Algumas concentrações de proteínas plasmáticas variam acentuadamente durante determinadas doenças e podem ser usadas como forma de auxílio ao diagnóstico. As proteínas plasmáticas mais comumente ensaiadas são albumina, fibrinogênio e globulinas (Colville, 2005). As

proteínas plasmáticas apresentaram neste estudo concentração média de $4,65 \pm 0,16$ g.dL⁻¹. Signor *et al.* (2010) encontraram valores próximos ao deste estudo para a proteína plasmática quando avaliaram dietas suplementadas com levedura e zinco, bem como Hisano *et al.* (2006) quando avaliou a levedura íntegra, ambos os autores avaliando a tilápia do Nilo.

As albuminas, que são sintetizadas no fígado e muito abundantes no plasma sanguíneo, desempenham papel fundamental na manutenção da pressão osmótica do sangue. A deficiência em albuminas causa edema generalizado (Junqueira & Carneiro, 2011). As albuminas apresentaram concentração média de $1,25 \pm 0,05$ g.dL⁻¹. Higuchi *et al.* (2011), relataram valores acima deste trabalho de $3,87$ g.dL⁻¹, quando avaliaram níveis proteicos e energéticos em dietas para *Rhamdia quelen*. Dallagnol *et al.* (2014), também relataram valores acima ao encontrado neste trabalho de $2,54$ g.dL⁻¹, para *Piaractus mesopotamicus*.

O colesterol e os triglicerídeos são transportados ao plasma através das lipoproteínas, atuando também no metabolismo lipídico (Metcalf *et al.*, 1999). Os triglicerídeos apresentaram concentração média de $652,75 \pm 115,77$ mg.dL⁻¹. Araujo *et al.* (2011) relataram valores médios de $287,16$ mg.dL⁻¹ para triglicerídeos avaliando dietas contendo óleos vegetais para a tilápia do Nilo. Borges *et al.* (2004) apresentam como valores normais entre 138 a 546 mg.dL⁻¹ para *Rhamdia quelen*.

O colesterol é uma substância complexa que apresenta muitas funções no organismo, porém quando ocorrem problemas em seu metabolismo, a concentração sanguínea pode elevar esses valores (Ludke & Lopes 1999). O valor médio observado neste estudo $159,17 \pm 10,22$ mg/dL⁻¹ encontrou-se dentro dos valores médios reportados por Manuel *et al.* (2007) entre 88 e 228mg/dL⁻¹ para tilápias híbridas (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*). Hubrec *et al.* (2000) encontraram valores variando entre 110 a 318mg/dL⁻¹ para tilápias híbridas (*Oreochromis nilótica* x *O. Mossambicus* x *O. Aureus*).

Os indicadores mais utilizados para avaliação do estresse são o cortisol e a glicose. O cortisol caracteriza a resposta primária e a glicose, a resposta secundária do estresse em peixes (Barton, 2000; Iwama, 1998). A glicemia, uma das respostas fisiológicas secundárias mais utilizadas como indicador de estresse em peixes, aumenta na presença de algum fator estressante, para suprir a maior demanda energética, característica de situações desfavoráveis (Morgan & Iwana, 1997). Os valores de glicose observados no atual estudo variaram entre $57,85 \pm 6,43$ mg.dL⁻¹, e estão dentro

do preconizado como referência 39 a 96 mg.dL⁻¹ para tilápias criadas em sistemas intensivos, descrito por Hrubec *et al.* (2000). Estes resultados encontram-se próximos aos valores apresentados por Tavares-Dias & Moraes (2003), para a *Tilápia rendalli*, que foi 42,00±17,20 mg/dL.

No atual estudo, a suplementação mínima 8,6 g kg⁻¹ de treonina na dieta dos peixes, foi suficiente para atender a manutenção de todos os parâmetros hematológicos, durante esta fase de cultivo, entretanto os demais níveis de inclusão de treonina na dieta também não prejudicaram a saúde dos peixes submetidos a estas dietas suplementadas com o aminoácido sintético.

No presente trabalho, de forma geral, observou-se que dieta com 10,7g kg⁻¹ de treonina para tilápias do Nilo na fase de crescimento-terminação, atende a exigência de desempenho, melhora a expressão da MyoD, que atua na proliferação dos mioblastos responsáveis pelo processo de hipertrofia muscular, assim como maximiza a frequência de muco secretado no intestino

Referências

- Abboudi, T., Ooghe, W., Larondelle, Y., Rollin, X. (2007) Determination of the threonine requirement for maintenance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry with the diet dilution procedure. *Aquaculture Nutrition*, **13**, 281-290.
- Abidi, S.F & Khan, M.A (2008) Dietary threonine of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Research*; **39**, 1498-1505.
- Aguiar, D. H., Barros, M. M., Padovani, C. R., Pezzato, L. E., Dal Pai-Silva, M. (2005) Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of Fish Biology*, **675**, 1287-1298.
- Ahmed, I. (2007) Dietary amino acid L-threonine requirement of fingerling Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) estimated by growth and biochemical parameters. *Aquacult International*; **15**, 337-350.
- Ahmed, I., Khan, M., Jafri, A.K. (2004) Dietary threonine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Research*; **35**, 162-170.
- 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. (2010) Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*, **41**, 997-1004.
- Araujo, D.M. Pezzato, A.C., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Nakagome, F.K. (2011) Hematologia de tilapiasdo Nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, **46**, n.3, p.294-302.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995) Oficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. pp. 1-30. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Bansemer, M.S., Forder, R.E.A., Howarth, G.S. Sutor, G.M., Bowyer, J., Stone, D.A.J. (2015) The effect of dietary meal and soy protein concentrate on the intestinal mucus layer and development of subacute enteritis in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) suboptimal water temperature. *Aquaculture Nutrition*, **21**, 300-310.
- Barton, B. A. (2000) Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal Aquaculture*, **62**, n. 1, p. 12-18.
- Beck, F. & Gropp, J. (1995) Estimation of the starvation losses of nitrogen and energy in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal Applied Ichthyology*, **11**, 263-275.
- Bittencourt, N. L. R.; Molinari, L. M.; Scoaris, D. O.; Pedroso, R. B.; Nakamura, C. V.; Nakamura, T. U.; Abreu Filho, B. A.; Dias Filho, B. P. (2003) Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum*, **25**, n. 2, p. 385-389.
- Blás, C., Garcia, A.I., Carabanõ, R. (2004) Necessidades de treoninaem animales monogástricos. In: Curso de Especialización Necesidades de Treonina en Animales Monogástricos, 16., 2004, Madrid. Anais... Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, p.22.
- Bodin, N., Mambrini, M., Wauters, J.B., Abboudi, T., Ooghe, W., Boulenge, E.L., Larondelle, Y. & Rollin, X. (2008) Threonine requirements for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the fry stage are similar. *Aquaculture*, **274**, 353-365.
- Bomfim, M.A.D., Lanna, E.A.T., Dozele, J.L., Quadros, M., Ribeiro, F.B., Araújo, W.A.G.(2008) Exigência de treonina, com base no conceito de proteína ideal, de alevinos de tilápias do Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **37**, 2077-2084.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. & Wassermann, G.F. (2004). Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **30**, 21-25.

- Brett, J.R. & Zala, C.A. (1975) Daily pattern of nitrogen excretion and oxygen consumption of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. *Journal Fish Research Board Canada*, **32**, 2479-2486.
- Burkhard-Holm, P. (1997) Lectin histochemistry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill and skin. *Histochemistry Journal*, London, **29**, 893-899.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **55**, 611-622.
- Cavichiolo, F. (2009). Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Tavares-Dias, M. Embrapa, Amapá. cap. 23, 2009.
- Cavichiolo, F., Vargas, L.D., Natali, M.R., Moreira, H, L.M., Ribeiro, R.P., Silva, L.C.R. (2000) Histologia de brânquias de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a diferentes níveis de vitamina C (ácido ascórbico) na dieta. *Braz. J. Morph. Sc.*, **17**, 88.
- Chagas, E.C., Pilarski, F., Sakabe, R., Massago, H., Fabregat, T.E.P. (2009). Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Tavares-Dias, M. Embrapa, Amapá. cap.7, 2009.
- Choo, P.S., Smith, T.K., Cho, C.Y. & Ferguson, H.W. (1991) Dietary excesses of leucine influence on growth and body composition of rainbow trout. *Journal of Nutrition*. **121**, 1932-1939.
- Coche, A.G. (1982) Cage culture of tilapia. In: Pullin, R.S.V. and R.H. Lowe McConnel (Ed.). Biology and culture of tilapias. Manila: ICLARM. p. 205-246.
- Collier, H.B. (1944) The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal* **50**, 550-552.
- Colville, J. Bioquímica sanguínea. In: Charles M. Hendrix, *Procedimentos laboratoriais para técnicos veterinários* – São Paulo: Roca, 2005.
- D'Mello, J.P.F. & Lewis, D. (1978) Effect of nutrient deficiencies in animals: amino acids. In: Rechcigl, M. (ed.) Handbook Series in Nutrition and Food. CRC Press, West Palm Beach, Florida, pp. 441-490. In: Amino Acids in Animal Nutrition, Second Edition. D'MELLO, J.P.F. (2003)
- 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.
- Dallagnol, J.M., Higuchi, L.H., Maluf, M.L.F, Feiden, A. Boscolo, W.R. (2014) Avaliação sérica de pacus submetidos a dietas com diferentes níveis de proteína e energia cultivados em tanques-rede. *Acta Iguazu*, **3**, n.2, p. 97-108.

- Delong, D.C., Halver, J.E. & Mertz, E.T. (1962) Nutrition of Salmonoid Fishes X. Quantitative threonine requirements of Chinook salmon at two water temperatures. *Journal of Nutrition* **76**, 174–178.
- Deriggi, G.F., Inoue, L.A.K.A. & Moraes, G. (2006). Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, **28**, 269-274.
- Elliott, J.M. (1991) Tolerance and resistance to thermal stress in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Freshwater Biology*, **25**, 61-70.
- El-Sayed, A.F.M. (2006). *Tilapia culture*. 277p. CABI Publishing, Wallingford.
- Faure, M., Moënnoz, D., Montigon, F., Mettraux, C., Breuillé, D., Ballèvre, O. (2005) Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *Nutrient Metabolism*, **135**, 486-491.
- Fernandes Junior, A.C., Pezzato, L.E., Guimarães, I.G., Teixeira, C.P., Koch, J.F.A., Barros, M.M. (2010) Resposta hemática de tilápias do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **39**, n.8, p.1619-1625.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations FishStatJ: A Tool for Fishery Statistics Analysis, Version 1.0.1. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en> (Accessed 26 March 2013).
- Furuya, W.M. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 2010, 100p.
- Goldenfarb, P.B., F.P. Bowyer, E. Hall, e E. Brosius. (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal Clinical of Pathology* **56**, 35-39.
- GraphPad Software (1998) GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, www.graphpad.com
- Harper, A.E., Benevenga, N.J. & Wohlhueter, R.M. (1970) Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiological Review*; **50**, 428–458.
- Helland, B.G., Lemme, A. & Helland, S. (2013) Threonine requirement for maintenance and efficiency of utilization for threonine accretion in Atlantic salmon smolts determined using increasing ration levels. *Aquaculture*, **372**, 158-166.
- Helland, S. & Helland, B.G. (2011) Dietary threonine requirement of Atlantic salmon smolts. *Aquaculture*, **321**, 230-236.
- Higuchi, L.H., Feiden, A., Maluf, M.L.F., Dallagnol, J.M., Micheli Zaminhan, M., Boscolo, W.R. (2011) Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos à dieta com diferentes níveis protéicos e energéticos. *Ciência Animal Brasileira*, **12**, n. 1, p. 70-75.

- Hisano, H., Silva, M.D., Barros, M.M., Pezzato, L.E. (2006) Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. *Acta Scientiarum Biology Science*. Maringá, **28**, n. 4, p. 311-318.
- Hisano, H.; Pezzato, L. E.; Barros, M. M.; Kleemann, G. K.; Freire, E. S.; Gonçalves, G. S.; Zuanon, J. A. S.; Sá, M. V. C. (2003) Yeast and zinc on hematological parameters of Nile tilapia fingerlings *Oreochromis niloticus*. In: World Aquaculture, Salvador, BA, *Anais...*, p. 575.
- Houlihan, D.F., Carter, C.G. & McCarty, I.D. (1995) Protein synthesis in fish. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4, Metabolic Biochemistry, pp. 191-220 [PW Hochachka and TPMommsen, editors]. Amsterdam: Elsevier.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L. & Smith, S.A. (2000). Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, **29**, 7-12.
- Iwama, G.K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **851**, 304-310.
- Johansen, K.A., Overturf, K. (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*, **7**, 576-587.
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., Hansson, G.C. (2013) The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **10**, 352–361.
- Johnston, I.A., Bower, N.I., Macqueen, D.J. (2011) Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *Journal Experimental Biology*, **214**, 1617-1628.
- Junqueira, L. C. & Carneiro, J. *Histologia Básica – 11ª ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 524p.*
- Kaushik, S.J. (1980) Influence of nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reproductive and Nutrition Development*, **20**, 1751-1765.
- Kubitza, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. 1ª. Edição, Jundiaí, 2000.
- Le Bellego L., Relandeau C., Van Cauwenberghe S. (2002) Threonine requirement in pigs: Benefits of L-threonine supplementation. *Ajinomoto Eurolysine. Technical information* **26**, 1-24.
- Leitão, N.J., Dal Pai-Silva, M., Almeida, F.L.A., Portella, M.C. (2011) The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture*, **315**, 78-85.

- Leonardo, J.M.L.O., Vargas, L., Ribeiro, R.P.R., Moreira, H.L.M., Natali, M.R.M., Volski, T., Cavichiolo, F. (2001) Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. *Acta Scientiarum Maringá*, **23**(4), 863-870.
- 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.
- Lovell, R.T. (1989) *Nutrition and Feeding of Fish*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- Ludke, M.C.M.M. & Lopez, J. (1999). Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suína. *Ciência Rural*, **29**, 181-187.
- Mallatt J. (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritantes: A statistical review. *Canadian Journal Fish Aquaculture Science*, **42**, 630- 648.
- Manuel, M.J., Miller, D.L., Merrill, A.L. (2007). Hematology and plasma biochemical values of healthy hybrid tilapia (*Oreochromis aureus x Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculation system. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **38**, 420-424.
- Metcalf, V.J., Brennan, S.O., Chambers, G. & George, P.M. (1999). High density lipoprotein (HDL), and not albumin, is the major palmitate binding protein in New Zeland long-finned (*Anguilla dieffenbachia*) and short-finned eel (*Anguilla australis schmidtii*) plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1429**, 467-475.
- Michelato, M., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Graciano, T.S., Moura, L.B., Furuya, V.R.B., Furuya, W.M. Furuya. (2015) Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast-growing Nile tilapia. *Aquaculture Nutrition*. p. 1-8.
- Michelato, M., Vidal, L.V.O., Xavier, T.O., Moura, L.B., Almeida, F.L.A., Pedrosa, V.B., Furuya, V.R.B., Furuya, W.M. Furuya. (2016) Dietary lysine requirement to enhance muscle development and fillet yield of finishing Nile tilapia. *Aquaculture*. V. 457 p. 124-130.
- Morgan, J. D. & Iwana, G. K. Measurements of stressed states in the field. In: Iwana, G. W.; Pickering, A. D.; Sumpter, J. P.; Schreck, C. B. (Eds.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: *University Press*, p. 247-270, 1997.
- Munshi, J.S.D. & Singh, B.N. (1968) On the microcirculatory system of the gills of certain freshwater teleostean fishes. *Journal of Zoology*, (Lond), **154**, 365-76.
- Murthy, H.S. & Varghese, T.J. (1996) Quantitative dietary requirement of threonine for the growth of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Journal of Aquaculture in the Tropics* **11**, 1-7.
- Myers B.M., Fredenburgh J.L., Grizzle W.E. (2008) Theory and practice of histological techniques, p.161-187. In: Bancroft J.D. & Gamble M. (Eds), *Carbohydrates*. 6th ed. Elsevier, Philadelphia.

- National Research Council – NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academy Press, 2011. 376p.
- National Research Council-NRC (2011) Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy Press, Washington, DC.
- 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*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **Part B 164**, 268-274.
- Neu, D.H., Boscolo, W.R., Zaminham, M., Almeida, F.L., Sary, C., Furuya, W.M. Essential amino acid, blood parameters, hypertrophy, hyperplasia, muscle fiber. *Journal of the World Aquaculture Society*. No prelo.
- Ojha, J. & Hughes, G.M. (1988) Scanning electron microscopy of the gills of a freshwater catfish, *Rita rita*. *Japanese Journal Ichthyology*, **35**, 56-61.
- Ospina-Rojas, O., Murakami, A. E., Oliveira, C.A.L., Guerra, A. F. Q. (2013) Supplemental glycine and threonine effects on performance, intestinal mucosa development, and nutrient utilization of growing broiler chickens. *Poultry Science*, **92**, 2724-2731.
- Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M.H., Schütte, A., Van Der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñero, A.M., Nyström, E.E.L., Wising, C., Johansson, M.E.V., Hansson, G.C. (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and, interact with the immune system. *Immunological Reviews*, **260**, 8-20.
- Popma, T.J. & Lovshin L.L. (1995). *Worldwide Prospects for Commercial Production of Tilapia*. 42p. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Auburn.
- Primot Y., Corrent. E., Melchior. D., Relandeau. C. (2008) Threonine in pigs and broilers: A crucial amino acid for growth and gut function. *Ajinomoto Eurolysine. Technical information*, **31**, 1-17.
- Ranzani-Paiva, M. J. P.; Silva-Souza, A. T. (2004) Co-infestation of gills by different parasite groups in the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae): effects on relative condition factor. *Brazilian Journal of Biology*, **64**, p. 677-682.
- Ranzani-Paiva, M.J.T. (2007) Hematologia como ferramenta para avaliação de saúde de peixes. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2., 2007. Botucatu. *Anais....Botucatu*. Universidade Estadual Paulista, p.47-51.
- Reis, A.B., Sant'Ana, D.M.G., Azevedo, J.F., Merlini, L.S., Araújo, E.J.A. (2009) Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em tanques de cultivo intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **29**(4), 303-311.

- Roberts, R.J. (2012) *Fish Pathology*. Wiley & Sons (590 pp.).
- Rodehutsord, M., Becker, A., Pack, M. & Pfeffer, E. (1997) Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement of essential amino acids. *Journal of Nutrition* **126**, 1166–1175.
- Rollin, X., Wauters, J.B., Bidin, N., Larondelle, Y., Ooghe, W., Wathelet, B., Abboudi, T. (2006) Maintenance threonine requirement and efficiency of its use for accretion of whole-body threonine and protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *British Journal of Nutrition*, **95**, 234-245.
- Romeis, B. (1968) *Mikroskopische Technik*. München.
- Rowlerson, A. & Veggetti, A. (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. *Fish Physiology*, **18**, 103–140.
- Sabóia-Morais, S. M. T.; Hernandezblasquez, F.J.; Mota, D.L.; Bittencourt, A.M. (1996) Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryaline fish *Poecilia vivipara*. *Journal of Fish Biology*, **49**, 545-548.
- Satake F., Padua S.B. & Ishikaws M. (2009) Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Tavares-Dias, M. [Recurso eletrônico] Macapá: EMBRAPA Amapá, 2009.1 CD-ROM.
- Shiraishi, C.S., Azevedo, J.F., Silva, A.V., Sant’Ana, D.M.G., Araújo, E.J.A. (2009). Morphometric analysis of the intestinal wall and the dynamic of mucins secreted in the chicken ileum infected with *Toxoplasma gondii*. *Ciência Rural*, **39**, 2146-2153.
- Sibaúba-Tavares, L. H. *Limnologia aplicada à aquicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995, 70p.
- Signor, A. Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães. I.G., e Margarida Maria Barros, M.M. (2010) Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo: Efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. *Ciência Animal Brasileira*, **11**, n. 3, p. 509-519.
- Silva, L.C.R., Furuya, W.M., Santos, L.D., Santos, V.G., Silva, T.S.C. & Pinsetta, P.J. (2006) Níveis de treonina em rações para tilápias-do-Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **35**, 1258-1264.
- Srivastava, N., Kumari, U., Kumari Rai, A., Mittal, S., Mittal, A.K. (2012) Histochemical analysis of glycoproteins in the gill epithelium of an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Acta Histochemica*, **114**, 626-635.
- Statsoft, Inc. (2005). *Statistica* (data analysis software system), version 7.1.
- Stoskopf, M.K. (1993) *Fish medicine*. – W.B. Saunders Company, Philadelphia. 882pp.

- Tavares-Dias, M. & Moraes, F. R. (2003) Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturadas em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, *Brasil Bioscience Journal*, **19**, n. 1, p. 107-114.
- Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R. Hematologia de peixesteleósteos. Ribeirão Preto: Willimpress Complexo Gráfico, 2004. 144p.
- Tibaldi, E. & Tulli, F. (1999) Dietary threonine requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **175**, 155-166.
- Valente, L.M.P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., Sylva, M.W., Oliveira, M.H., Monteiro, R.A.F., Fauconneau, B. (1999) Growth dynamics of white and red muscles in fast and slow growing strains of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, **55**, 675–691.
- Walton, M.J. (1985) Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. In: Nutrition and Feeding in Fish (ed. by C.B. Cowey, A.M. Mackie & J.G. Bell), pp. 47-68. *Academic Press*, London, UK.
- Watabe, S.(1999)Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of Fish Biology*. **55(A)**, 1-18.
- Watabe, S. (2001) Myogenic regulatory factors. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. London: *Academic Press*, 19-41.
- Wilson, R.P. & Halver, J.E. (1986) Protein and amino acid requirements of fishes. *Annual Review of Nutrition*.**6**, 225-244.
- Wintrobe, M.M.(1934) Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematologica***51**, 32-49.
- Zehra, S. & Khan, M. (2014) Dietary threonine requeriment of fingerling Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton) estimated by growth, protein retention efficiency, threonine deposition, haematological parameters and carcass composition. *Aquaculture Research*, 1-13.
- Zimmerman, A.M.&Lowery, M.S.(1999) Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*).*Journal Experimental Zoology*, **284**, 299-308.

Considerações finais:

Muitos aminoácidos essenciais e não essenciais participam na sinalização celular, expressão de genes e na regulação metabólica, e, entre eles está treonina. A treonina é um aminoácido potencialmente limitante em dietas para tilápias elaboradas com base em proteína do farelo de soja.

No presente trabalho, de forma geral, conclui-se que a suplementação de treonina na forma cristalina, garantiu os melhores resultados entre as variáveis avaliadas do desempenho produtivo durante a fase adulta, resultou em aumento do processo de hipertrofia das fibras musculares sob a influência da expressão da MyoD e Miogenina.

A treonina contribuiu no aumento da frequência de células produtoras de muco no epitélio branquial e no muco neutro e ácido na mucosa intestinal das tilápias do Nilo, tornando sua inclusão indispensável nas dietas para esta espécie durante a fase inicial e adulta.

A treonina demonstrou ação como aminoácido funcional, pela ação em outras funções além da síntese proteica. Considerando os desafios em criação intensiva, é importante considerar os níveis dietéticos de treonina para assegurar o desempenho e saúde de tilápias.