

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

AMANDA DE PAULA LIMA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COMBINADA DE LISINA E METIONINA
NO DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO,
*Oreochromis niloticus***

PONTA GROSSA

2018

AMANDA DE PAULA LIMA

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COMBINADA DE LISINA E METIONINA
NO DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO,
*Oreochromis niloticus***

Dissertação apresentada como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da
Universidade Estadual de Ponta Grossa - Área de
concentração: Produção Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Losi Alves de Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Lima, Amanda de Paula
L732 Efeitos da suplementação combinada de
lisina e metionina no desempenho e
expressão de genes relacionados ao
crescimento muscular de alevinos de
tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* /
Amanda de Paula Lima. Ponta Grossa, 2018.
67f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia -
Área de Concentração: Produção Animal),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profª Drª Fernanda Losi
Alves de Almeida.

Coorientador: Prof. Dr. Wilson
Massamitu Furuya.

1.Fibras musculares. 2.Miogenina.
3.Miostatina. 4.MyoD. 5.Desempenho.
I.Almeida, Fernanda Losi Alves de. II.
Furuya, Wilson Massamitu. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Zootecnia. IV. T.

CDD: 636.085



TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA DE PAULA LIMA

**“EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COMBINADA DE LISINA E METIONINA NO
DESEMPENHO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO CRESCIMENTO
MUSCULAR DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus*”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia — Mestrado em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, no dia 10 de setembro de 2018, pela seguinte banca examinadora:

Fernanda Losi Alves de Almeida

Prof^a. Dr^a. Fernanda Losi Alves de Almeida – UEM (Orientadora)

Kátia Kalko Schwarz

**Prof^a. Dr^a. Kátia Kalko Schwarz – (UNESPAR)
(Membro)**

Valéria Rossetto Barriviera Furuya

**Prof^a. Dr^a. Valéria Rossetto Barriviera Furuya – (UEPG)
(Membro)**

Ponta Grossa, 10 de setembro de 2018

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe Margarete de Paula que além de ser minha melhor amiga, foi e continua sendo a base de tudo com seu papel duplo em minha vida, de mãe e pai. Essa conquista é nossa! E dedico também a minha melhor avó que a vida me presenteou, Maria Jandira Becker de Paula, minha segunda mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida.

À minha mãe e minha avó por todo amor e incentivo durante essa caminhada.

À minha família, especialmente a minha madrinha Marcia, meu padrinho Sergio e minhas primas Fernanda e Daniela pela compreensão, carinho e força para nunca desistir independente das dificuldades.

Ao meu namorado e melhor amigo Lucas, por aparecer em minha vida em um momento de transições e permanecer nela nessa caminhada proporcionando todo amor que merecemos independente da distância.

À professora Dr^a. Fernanda Losi Alves de Almeida pela orientação, mesmo tumultuada, mas sempre com dedicação e paciência para orientar da melhor maneira possível.

Ao professor Dr. Wilson Massamitu Furuya pelo acolhimento em seu laboratório e orientação durante o experimento, mesmo com algumas dificuldades durante o caminho.

À Fundação Araucária (FA) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos colegas e professores do curso de pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial a professora Dra. Raquel Abdallah da Rocha Oliveira pelo apoio e conselhos em meio às dificuldades que encontramos durante o mestrado.

Aos amigos de graduação e que viraram de pós também, Flavia, Michelli, Milena e Marcel que dividiram comigo alegrias e tristezas dessa vida acadêmica. Aos amigos que ganhei durante o experimento Tânia, Johnny, Karla, Alycia que me ensinaram que as simples coisas da vida podem melhorar nosso dia a dia com toda certeza.

Às minhas amigas Zootecnistas, Amily que vai ser sempre meu feijãozinho que entrou na minha caminhada final da graduação e dela não saiu mais e minha mana do RS Josy, que foi uns dos melhores presentes que os congressos da vida me deram. E as minhas amigas de confidências, que mesmo não tendo a convivência diária, o carinho entre nós é certo, obrigada Elaine e Jaty.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

“I believe, I believe, I believe, I believe. No matter what you do. I believe, I believe, I believe, I believe. It will all come back to you. Stand up and find your own way. Or sit down and wait for your turn. Follow your vision blindly. Or just become the vision of someone. Everything that you say. Becomes the things that you do. Remember what you put out there. Is building you.”

SOJA

RESUMO

A presente pesquisa foi realizada com o objetivo avaliar os efeitos da suplementação combinada de lisina e metionina sobre o desempenho produtivo e expressão de genes relacionados com o crescimento muscular em alevinos de tilápia do Nilo revertidos sexualmente. Trezentos e trinta e seis alevinos de tilápia do Nilo (peso inicial $0,90 \pm 0,01$ g) foram distribuídos em 24 aquários de 70L com sistema contínuo de fluxo de água (2,0 L/min), em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e seis repetições. Foram elaboradas quatro dietas isoproteicas ($\sim 330,50$ g/kg de proteína bruta) e isocalóricas ($\sim 18,59$ MJ/kg) sem suplementação de lisina e metionina (Controle), suplementada com lisina (Lys), suplementada com metionina (Met) e suplementada com lisina e metionina (Lys+Met) durante oito semanas. Os peixes foram alimentados manualmente, quatro vezes por dia até saciedade aparente. Peixes tratados com as dietas Lys e Met apresentaram maior peso corporal e taxa de crescimento específico em relação aos peixes mantidos com as demais dietas. Peixes tratados com dieta Lys apresentaram maior taxa de eficiência proteica em comparação aos peixes mantidos com as outras dietas. O índice hepatostomático e a gordura corporal foram menores nos peixes alimentados com as dietas Met e Lys+Met em comparação aos peixes tratados com a dieta controle. O consumo, sobrevivência, umidade, proteína bruta, cinzas corporais e a expressão do mRNA da miostatina não foram influenciados pelas dietas. Peixes que receberam dieta Lys+Met apresentaram maior nível de expressão de mRNA da MyoD em comparação aos peixes que receberam a dieta controle, mas nenhum efeito da suplementação isolada de lisina e metionina foi observada. Em conclusão, a suplementação combinada de lisina e metionina melhora o desempenho produtivo e aumenta a expressão de mRNA de MyoD e miogenina e reduz conteúdo de gordura corporal de alevinos de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: fibras musculares, miogenina, miostatina, MyoD, desempenho.

ABSTRACT

This work was carried out with the objective of evaluating the effects of the combination of lysine and methionine on the performance of growth and expression of genes related to muscle growth in sexually reversed Nile tilapia fingerlings. Fish (n = 336, initial weight 0.90 ± 0.01 g) were randomly distributed into 24 70 L aquaria with a continuous water flow system in an entirely randomized design with four treatments and six replicates. Four isoproteic (~ 330.50 g/kg crude protein) and isocaloric (~ 18.59 MJ / kg) diets without lysine or methionine supplementation (Control), or supplemented with lysine (Lys), methionine (Met) and lysine and methionine (Lys + Met) were elaborated. Fish were hand fed until apparent satiety. Fish fed diets Lys+Met and Met showed higher final body weight and specific growth ratio compared to fish fed other diets. The protein efficiency ratio was higher in fish diet Lys compared to fish fed other diets. Fish fed Met and Lys+Met diets showed lower hepatosomatic index and whole-body fat compared to fish fed the control diet. Feed intake, survival and whole-body moisture, crude protein, ash and mRNA expression of *myostatin* of fish were not affected by diets. Fish fed diet Lys+Met demonstrated higher mRNA expression level of *MyoD* compared to those fed the control diet. In conclusion, Nile tilapia fingerlings fed combined lysine and methionine demonstrates improved growth performance in line to higher mRNA expression of *MyoD* and *myogenin*, and also reduced body fat contents.

Key words: muscle fibers, myogenin, myostatin, MyoD, performance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrando o corte transversal da musculatura estriada esquelética de um peixe teleósteo, destacando as porções epaxial e hipaxial.....	24
Figura 2. Esquema demonstrando a organização do tecido muscular estriado esquelético em miômeros e miosseptos em um peixe teleósteo (A) e o formato em “W” de um miômero em destaque (B).....	25
Figura 3. Esquema simplificado ilustrando o processo de formação embrionária das fibras musculares esqueléticas a partir das células precursoras miogênicas localizadas nos somitos.....	26
Figura 4. Esquema ilustrando a localização de uma célula satélite quiescente, na periferia de uma fibra muscular, entre a sua lâmina basal e sarcolema.....	27
Figura 5. Esquema demonstrando os mecanismos de crescimento muscular nos peixes a partir da ativação e proliferação de mioblastos indiferenciados e quiescentes.....	28
Figure 6. Specific growth ratio of Nile tilapia fingerling fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met).....	51
Figure 7. Protein efficiency ratio of Nile tilapia fingerling fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met).....	52
Figure 8. Whole-body crude lipids contents of Nile tilapia fingerling fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met).....	54
Figure 9. Real-time PCR quantification of <i>MyoD</i> , <i>myogenin</i> and <i>myostatin</i> performed on the white skeletal muscle tissue of Nile tilapia fingerling fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação nutricional dos aminoácidos.....	19
Table 2. Ingredient composition of the experimental diets (g/kg, as fed-basis).....	45
Table 3. Analyzed composition of the experimental diets (g/kg, dry matter basis).....	46
Table 4. Primers used for quantitative RT-qPCR in this study.....	48
Table 5. Growth performance of Nile tilapia fingerlings fed the experimental diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine and methionine.....	51
Table 6. Body composition (g/100g, wet basis) of Nile tilapia fingerlings fed the experimental diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine and methionine.....	53

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Analysis of variance;
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid;
CP	Crude Protein;
DNA	Deoxyribonucleic acid;
FCR	Feed conversion ratio;
FIN	Feed intake;
FBW	Final body weight;
HIS	Hepatosomatic index
IBW	Initial body weight;
Lys	Lisine;
Met	Methionine;
PER	Protein efficiency;
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction;
RNA	Ribonucleic acid
SGR	Specific growth;
SUR	Survival.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.1 Aquicultura	13
1.2 Tilápia do Nilo.....	14
1.3 Alimentos de origem vegetal.....	15
1.3.2 Milho e coprodutos.....	17
1.4 Aminoácidos cristalinos	18
1.4.1 Lisina	20
1.4.2 Metionina.....	22
1.5 Tecido muscular estriado esquelético.....	23
1.6 Controle molecular do crescimento muscular	28
1.6.1 Fatores de regulação miogênica (MRFs).....	29
1.6.2 Miostatina	29
1.7 Referências bibliográficas	31
CAPÍTULO 2 - EFFECTS OF COMBINED LYSINE AND METHIONINE SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE AND EXPRESSION MUSCLE-GROWTH-RELATED GENES OF NILE TILAPIA FINGERLING..	41
2.1 Introduction	42
2.2 Materials and methods.....	44
2.2.1 Diets.....	44
2.2.2 Fish and experimental conditions	46
2.2.3 Samples collection and chemical analysis.....	47
2.2.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	47
2.2.5 Calculations	49
2.2.6 Experimental design and statistical analysis	49
3. Results	49
3.1 Growth performance and body composition	49

3.2 Expression of muscle growth-related genes	54
4. Discussion.....	56
5. Conclusion.....	60
6. Acknowledgments	61
7. References	62

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aquicultura

Existem aproximadamente 32.100 espécies de peixes, das quais uma pequena parte é utilizada pela aquicultura (FAO, 2013). O Brasil é constituído por 8,4 mil quilômetros de costa marítima, 5,5 milhões de hectares de reservatórios de águas doces e, aproximadamente, 12% da água doce disponível do planeta, além de possuir clima favorável, terras, mão de obra e crescente demanda por pescado nos mercados internos e externos (BRASIL 2010). Com a crescente demanda, a pesca extrativista passou a não atender o mercado mundial e a aquicultura passou a ser incentivada, onde os pescadores passaram a trocar suas redes pela produção em tanques rede, melhorando assim a produção (FAO, 2013).

A produção mundial de pescado vem aumentando de forma constante nas últimas cinco décadas a uma taxa anual de 3,2%. Analisando de forma global, o consumo *per capita* de peixe obteve um aumento de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012 e 20 kg em 2014/2015 (FAO, 2014; FAO, 2016).

Analisando esse cenário com a ampla diversidade de peixes destinados ao consumo, devemos associar não apenas suas exigências nutricionais e sim o conjunto da morfologia e o metabolismo do animal, para que se tenha uma boa resposta na relação custo e benefício para a produção. Com o conhecimento dessas características, podemos fazer com que se torne útil e viável em estudos nutricionais, no preparo de rações que demandem menos gastos possíveis, no manejo alimentar e no habitat que esses peixes estão alojados.

A aquicultura tem alcançado importante espaço no cenário mundial com o cultivo de peixes devido à depleção nos estoques pesqueiros naturais. Em relação aos sistemas de produção, a aquicultura tem conquistado grandes avanços, principalmente com a questão de qualidade e eficiência do manejo, visando uma produtividade em larga escala, disponibilizando peixes de boa qualidade e com um menor custo (PEIXEBR, 2018).

Para aumentar a produtividade é necessário que as dietas oferecidas aos peixes atendam suas exigências nutricionais por meio do uso adequado de rações balanceadas (ARAÚJO, 2010). Portanto, nos peixes, a taxa de crescimento é um parâmetro importante para o sucesso da aquicultura e está diretamente relacionada com o

crescimento da musculatura estriada esquelética que corresponde à maior parte da massa corporal (ALMEIDA, 2011).

1.2 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a principal espécie de tilápia cultivada no mundo sendo produzida em 135 países e territórios em todos os continentes (FAO, 2014), devido aos seguintes aspectos: rápido crescimento, incluindo sistemas de cultivo intensivo; maturação sexual mais tardia, possibilitando assim manipulação hormonal do sexo para obtenção de machos; hábito alimentar onívoro, com aceitação de diversos alimentos e também uma ótima capacidade de aproveitamento dos mesmos (PEZZATO et al., 2002).

Depois das carpas, as tilápias são os peixes de água doces mais cultivados nos viveiros de todo o mundo (FAO, 2013; 2018). Oriundas da África, Israel e Jordânia, hoje se encontram distribuídas ao redor do mundo onde grande parte do cultivo é proveniente de países com clima tropical ou subtropical. O interesse pela criação dessa espécie teve um grande acréscimo na produção a partir da década de 1990, devido também à utilização da reversão sexual que favoreceu criações destinadas apenas para machos, resultando em uma uniformidade de lote (MICHELATO, 2010).

De acordo com Pezzatto et al., (2002), a reversão sexual tem uma expressiva importância, pois, além de eliminar problemas relativos à reprodução, proporciona a obtenção de populações constituídas apenas por machos que, no caso da tilápia, apresentam maior potencial de crescimento.

No Brasil, a tilápia do Nilo é a espécie mais cultivada, com 170 mil toneladas de filés congelados exportadas para os principais mercados durante os primeiros nove meses de 2015 (FAO, 2016). Destacando-se com uma produção total no país de 357 mil toneladas (51,7%) em 2017 (PEIXEBR, 2018).

Segundo o IBGE, a produção de tilápia representou 45,4% (219.329 t) da produção piscícola total (483.241 t) no Brasil e, no estado do Paraná, representou 28,8% (19.948 t) de 14,3% que correspondeu a produção piscícola total do estado (69.264 t) em 2015 (BRASIL, 2016).

De hábito alimentar onívoro, a tilápia do Nilo consome ração logo após o início da alimentação exógena e utiliza eficientemente os carboidratos como fonte de energia, o que permite reduzir os custos com a alimentação (PEZZATO et al., 2002). Dessa

forma, consegue utilizar e aproveitar alimentos de origem vegetal, já que possuem adaptações morfológicas e fisiológicas como dentes faringianos, pH estomacal ácido e intestino longo (KUBARIK, 1997).

A tilápia do Nilo apresenta os requisitos típicos dos peixes preferidos pelo consumidor. Destacam-se a carne branca de textura firme, sabor delicado e fácil filetagem, não tendo espinha em “Y” nem odor desagradável (VANNUCCINI, 1999).

1.3 Alimentos de origem vegetal

Em relação à alimentação, o custo na produção de peixes pode chegar a 70% do total (ROUBACH et al., 2002; YOSHIOKA et al., 2015). Como ingredientes usualmente utilizados na produção de ração para peixes, pode-se destacar a soja e o milho. O grão da soja possui cerca de 30 a 45% de proteína e 15 a 25% de lipídio, sendo muito utilizado o farelo de soja como fonte de proteína na formulação de ração para peixes (GONÇALVES et al., 2002; ZANON, 2007; YOSHIOKA et al., 2015).

Dentro dessa alimentação, as proteínas possuem grande relevância, pois são constituintes dos tecidos dos peixes, em torno de 65 a 75% do total da matéria seca corporal. Dessa forma, os peixes precisam consumir proteínas na forma de alimento para obter os aminoácidos necessários (MAI et al., 2006). Estes são exigidos com dois objetivos para o animal: manutenção da vida e crescimento que, para ocorrer de forma adequada, precisa da deposição proteica necessária (ROUBACH et al., 2002).

Fontes proteicas de origem animal têm sido substituídas por fontes proteicas de origem vegetal, pois são opções mais econômicas e menos poluentes ao meio ambiente. No Brasil, há uma grande demanda de farelos de oleaginosas como soja, canola, girassol e linhaça que são produzidos em larga escala como subprodutos da indústria de óleos e têm potencial para uso em formulações de dietas para peixes (BUTOLO, 2002).

Alguns coprodutos apresentam menor digestibilidade que os alimentos convencionais, sendo em alguns casos deficientes e/ou limitantes em lisina e metionina e podem apresentar fatores antinutricionais, como inibidores de proteases, lecitinas, ácido fítico, saponinas e fibras (CARVALHO, 2006). Estes fatores podem interferir no aproveitamento das proteínas e dos demais nutrientes das dietas pelo animal, além de desencadear efeitos fisiológicos não desejados, resultando em inibição de crescimento, hipoglicemia, flatulência ou danos a tecidos como pâncreas ou fígado (LIENER, 1981).

1.3.1 Soja e coprodutos

A soja pode ser utilizada em sua forma natural (crua) na alimentação de ruminantes e de maneira processada na alimentação de não ruminantes. Segundo Kirsten (2001), o farelo de soja e a soja integral são as principais fontes de proteínas na nutrição animal. Na ração para não ruminantes, à base de milho e farelo de soja, quase 70% da proteína é proveniente do farelo de soja (LIMA JÚNIOR et al., 2010).

O farelo de soja por ser encontrado nas mais diversas regiões do país e ter preço acessível, tem favorecido os custos de produção das dietas. É um co-produto obtido da indústria de extração do óleo do grão de soja *Glycine max* (L) e tem sido a principal fonte proteica de origem vegetal utilizada na nutrição de animais monogástricos, inclusive para os peixes e, principalmente, para os de hábito alimentar onívoro (PEZZATO, 1997).

Segundo Butolo (2002), o farelo de soja apresenta razoável balanço de aminoácidos e pode substituir até 50% da farinha de peixe em dietas para trutas e 94% para espécies onívoras como, por exemplo, a Tilápia do Nilo, sendo o ingrediente mais estudado como fonte proteica vegetal. Entretanto, o farelo de soja, é deficiente em lisina e limitante em metionina, sendo necessário que seja suplementado aminoácido industrial para melhorar a resposta produtiva (EL – SAYED, 1999; HU et al., 2008). No entanto, esse farelo possui o melhor perfil aminoacídico de todos os alimentos proteicos de origem vegetal para os peixes (LOVELL, 1989).

Em estudos utilizando o farelo de soja, constatou-se que o aumento no nível de farelo de soja em rações para tilápias do Nilo, durante a fase de reversão sexual, possibilitou redução no nível farinha de vísceras. Essa alteração resultou em diminuição nos níveis de amido e dos aminoácidos sulfurosos metionina + cistina, que por outro lado, promoveram aumento dos teores de lisina e fibras (MEURER et al., 2008).

Em um estudo realizado com o peixe curimba, (*Prochilodus lineatus*) a substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em até 75% não prejudicou o desempenho. Entretanto, quando essa substituição foi total, observou-se piora no ganho de peso, na conversão alimentar e na taxa de eficiência proteica dos animais (FABREGAT et al., 2011). Esses resultados diferem dos obtidos anteriormente para o curimba (GALDIOLI et al., 2000), onde não houve piora no desempenho e na conversão alimentar com a utilização de dietas contendo somente farelo de soja como fonte proteica.

Os alimentos utilizados na formulação de rações para peixes possuem diferentes níveis de proteína e consequentemente, aminoácidos, refletindo assim na exigência de certos aminoácidos. Assim, há necessidade de suplementá-los para o adequado desempenho do animal. Dessa forma, utilizando o farelo de soja, de acordo com Alencar et al. (2011) reduzindo o nível de proteína, fornecendo rações com 28% suplementada com aminoácidos, em substituição a uma ração com 40% PB, manteve o desempenho produtivo da tambatinga na fase juvenil. Além disso, foi observado redução no teor de gordura, corporal favorecendo o tempo do produto na prateleira.

A substituição de alimento nem sempre proporciona vantagens. Peixes alimentados com soja e milho, em substituição à ração comercial apresentam diminuição na concentração plasmática de glicose em relação aos animais alimentados com ração comercial. Assim, indicou desbalanço de nutrientes (vitaminas e minerais, principalmente), ocasionado pela diminuição do fornecimento da ração com ingredientes alternativos em substituição ou inclusão à ração comercial aos peixes (SANTOS e OBA, 2009).

A inclusão de soja *in natura* pode provocar efeitos negativos sobre o desempenho dos peixes pela a inibição ao consumo de ração, deficiências de aminoácidos essenciais e presença de fatores antinutricionais (AI e XIE, 2005; FASAKIN et al., 2005; FABREGAT et al., 2011). Portanto, o processamento por aquecimento da soja é fundamental para inibir a ação destes fatores (CARVALHO, 2006).

A metionina é um aminoácido limitante no farelo de soja e sua suplementação melhora seu valor nutritivo. Segundo Bureau et al. (2000), a associação correta entre fontes de origem vegetal e as de origem animal forma um alimento completo do ponto de vista nutricional, pois uma fonte complementa a deficiência de aminoácidos da outra. Para substituição total de alimentos de origem animal pelos de origem vegetal, a suplementação de aminoácidos deve ser considerada, principalmente lisina e metionina, os mais limitantes.

1.3.2 Milho e coprodutos

O milho é um dos principais insumos utilizados na alimentação animal na forma *in natura* e/ou cozido, na fabricação de farelos, como amido, farinhas e óleo, sendo considerado alimento energético para as dietas pela sua composição ser

predominantemente de carboidratos e lipídios (LANGE, 2006). De acordo com Loures et al. (2001), o milho é uma das principais fontes energéticas para peixes onívoros e herbívoros, sendo moído a sua forma mais utilizada.

É um ingrediente utilizado em combinação com outras fontes vegetais, devendo ser suplementado com aminoácidos cristalinos, com o objetivo de elaborar rações com qualidade proteica equivalente àquela obtida a partir das fontes de origem animal (SOLTAN et al., 2008). Em relação à proteína encontrada no grão do milho, 73% do total é encontrado no endosperma e 24% no embrião. No endosperma, a principal proteína encontrada chama-se zeína, sendo esta insolúvel e correspondendo ao redor de 50% do total. Esta proteína representa um valor baixo em aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano, tornando, assim, a proteína total do milho deficiente nesses aminoácidos para os não ruminantes (BUTOLO, 2002).

O milho e o farelo de soja são amplamente empregados na elaboração de rações para peixes. Calíope Freitas (2002), trabalhando com rações para tilápias do Nilo, elaboraram dietas com diferentes proporções de milho e soja e observaram variações nos aminoácidos limitantes. Isso ocorre porque a lisina é o primeiro aminoácido limitante no milho, enquanto o primeiro aminoácido limitante na soja é a metionina (NRC, 2011).

De acordo com Hardy (2010), os glútenos de trigo e milho, principalmente, são os melhores produtos de grãos ricos em proteína para serem utilizados em rações para peixes. Wu et al. (1995), testando rações formuladas com base em proteína do glúten de milho e farelo de soja e isentas de farinha de peixe, obtiveram resultados de ganho de peso, deposição de proteína e conversão alimentar melhores comparados à dieta com farinha de peixe. Destaca-se que os glútenos de milho e trigo não possuem fatores antinutricionais como a soja (ROBIANA et al., 1999; STOREBAKKEN et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2004), mas são deficientes em lisina, seu primeiro aminoácido limitante (WU et al., 1998).

1.4 Aminoácidos cristalinos

As proteínas são moléculas estruturalmente complexas (ALBERTS et al., 2002), importantes constituintes dos tecidos dos peixes, contribuindo em torno de 65 a 75% do total de matéria seca corporal. Os peixes consomem proteínas na forma de alimento, isto é, quando ingeridas, apresentam propriedades nutritivas que podem ser

transformadas e aproveitadas pelos mesmos, para obter os aminoácidos necessários, beneficiando a saúde, a vida e a produção. Tais aminoácidos são exigidos basicamente para dois processos: manutenção da vida animal e crescimento (COWEY, 1994).

Os aminoácidos podem ser classificados em essenciais e não essenciais (Tabela 1), sendo os essenciais aqueles que não podem ser sintetizados pelos animais e, dessa forma, devem ser fornecidos na ração através de ingredientes proteicos e energéticos ou pela adição de aminoácidos industriais ou cristalinos. Já os aminoácidos não essenciais são aqueles que os animais são capazes de sintetizar a partir do esqueleto de carbono da glicose de outros aminoácidos e de grupos amino de aminoácidos em excesso (D'MELLO, 2003).

Tabela 1. Classificação nutricional dos aminoácidos para peixes

Essenciais	Não essenciais
Arginina	Aspartato
Histidina	Glutamato
Isoleucina	Alanina
Leucina	Cistina
Lisina	Glicina
Metionina	Prolina
Fenilalanina	Serina
Treonina	Tirosina
Triptofano	
Valina	

Adaptado de NRC (2011)

O padrão de aminoácidos corporal vem sendo frequentemente utilizado para determinar as exigências dos peixes por aminoácidos (MEYER e FRACALOSSO, 2004; ABIMORAD e CASTELLANI, 2011). Dessa forma, as exigências são determinadas através de um método baseado no princípio da necessidade em aminoácidos possui valor igual ou superior ao perfil de aminoácidos contidos na carcaça. Entretanto, o estado fisiológico dos animais utilizados como referência tem resultado em divergências quanto à utilização desse método (BOMFIM et al., 2008b; ABIMORAD e CASTELLANI, 2011).

Segundo Furuya et al., (2005) uma alternativa para os estudos com aminoácidos para peixes é a utilização da quantidade relativa do perfil de aminoácidos corporais em

relação a um aminoácido referência, geralmente o mais limitante, o qual, o requerimento deve ser obtido pelo método de dose-resposta. Nos experimentos, são utilizadas rações com um nível de proteína abaixo da exigência necessária, suplementando os aminoácidos limitantes na forma industrial, com exceção do aminoácido a ser estudado (ração basal). Portanto, o aminoácido a ser estudado precisa ser suplementado de forma gradativa à ração basal para que se forme os demais tratamentos desejados nos experimentos (BOMFIM et al., 2010).

O uso do perfil aminoacídico corporal nem sempre é o indicativo do padrão ideal proteico de uma ração. Segundo alguns pesquisadores, o estudo individual de cada aminoácido pelo método dose-resposta seria a melhor alternativa (ZEHRA e KHAN, 2014).

A inclusão de aminoácidos cristalinos em rações experimentais e comerciais, para melhorar o perfil destes, é uma prática comum e amplamente utilizada, principalmente, em dietas com elevadas proporções de farelo de soja ou outro alimento proteico de origem vegetal ou, até mesmo, quando se deseja reduzir o nível de proteína da dieta (MICHELATO, 2010). Devido a esses fatores apresentados na questão de fontes de origem vegetal, se faz necessário a suplementação de alguns aminoácidos, como lisina e metionina, sendo estes, na grande maioria, os primeiros limitantes (MAI et al., 2006; LI et al., 2009; FURUYA, 2010; NRC, 2011).

1.4.1 Lisina

A lisina é o aminoácido mais importante entre os essenciais e pode ser utilizado como aminoácido referência, porque é um aminoácido estritamente essencial, não apresentando nenhuma via de síntese endógena. Ao contrário dos aminoácidos sulfurosos, participa de poucas funções metabólicas, sendo esse metabolismo orientado para deposição de proteína corporal (MIYADA, 2001).

Esse aminoácido é sintetizado na via metabólica do ácido aspártico. O catabolismo da lisina (6C, 2N) ocorre pela ação consecutiva das enzimas, lisina 2-oxoglutarato redutase e sacaropina desidrogenase, resultando como produto final o acetoacetyl-CoA (produto intermediário da síntese dos corpos cetônicos). Por esse motivo, a lisina é classificada como um aminoácido cetogênico (TAKESHITA et al., 2009).

Em grande parte das rações, a lisina é o primeiro aminoácido limitante, por isso, sua exigência torna-se referência para os demais aminoácidos, estabelecendo-se a razão desses com a lisina (WU et al., 2014). De acordo com Furuya et al., (2004), a lisina está presente em elevados níveis no tecido muscular dos peixes, sendo exigida em grande quantidade na ração, tendo em vista que esta é usualmente limitada em fontes de proteína vegetal. Sendo assim, para espécies de peixes herbívoras e onívoras, o teor de lisina na ração deve ser de aproximadamente 1,5% ou aproximadamente 5% da proteína da ração (NRC, 1993).

Para a tilápia do Nilo, a exigência média de lisina é de aproximadamente 5,8% em relação à proteína da dieta (FURUYA et al., 2006a; GONÇALVES et al., 2009; BOMFIM et al., 2010). De acordo com Lovell (1998) e Bomfim et al., (2006), essa exigência deve ser relacionada com recomendações de 1,40 a 1,80% da dieta utilizada.

Analizando o desequilíbrio dietético dos aminoácidos e focando na questão de suplementação, D'Mello (2003) destacou que no tecido muscular isso ocorre quando o aminoácido suplementar é absorvido mais rapidamente que os demais ligados à proteína do ingrediente. Nesse caso, a concentração de lisina plasmática livre aumenta 1 a 2 horas após a ingestão da dieta com o aminoácido puro, enquanto que, com os outros aminoácidos provenientes da proteína, o pico ocorre entre 2 e 6 horas da alimentação.

Em um estudo realizado por Takishita et al. (2009), com alevinos de tilápia do Nilo, foi possível observar que o consumo de ração aumentou de forma linear de acordo com o aumento na concentração de lisina digestível na dieta. Alguns resultados semelhantes foram encontrados por Bomfim et al. (2006) em tilápias do Nilo e Encarnação et al. (2004) em truta arco-íris que também observaram tal resposta linear no consumo da ração através do incremento de lisina nas dietas. Furuya et al., (2004, 2006) também constatou resultados semelhantes trabalhando com tilápias em terminação e juvenis de tilápia do Nilo, respectivamente.

A suplementação de lisina melhora o balanço de aminoácidos na dieta e possibilita um estímulo no consumo de ração independente da fase em que o peixe se encontra. Segundo Zhou et al., (2008), dietas deficientes em lisina afetam o desempenho e a saúde dos peixes e a suplementação desse aminoácido é efetiva no aprimoramento da resposta imune do peixe e o desenvolvimento gastrintestinal.

Com a presença de lisina ocorre uma melhor absorção de cálcio, aumenta a produção de anticorpos, enzimas e colágenos, sendo esse aminoácido necessário para a

manutenção dos tecidos, e junto com a metionina, está diretamente ligado à produção de carnitina, que auxilia na conversão de ácidos graxos em energia (OVIE e EZE, 2012).

1.4.2 Metionina

A metionina também se enquadra como um aminoácido essencial, indispensável para o crescimento dos peixes, principalmente na parte muscular. Também participa da síntese de proteínas e funções metabólicas de outros componentes, como a cisteína que é sintetizada pela transferência do átomo de enxofre contido na metionina para um grupo hidroxil da serina, sendo assim classificados como aminoácidos sulfurados. S-adenosil-metionina, um metabólito da metionina, é o principal doador biológico de metil em células de animais a um precursor para a síntese de poliaminas (BURRIN, 2009).

Segundo Furuya (2010), os aminoácidos sulfurados são considerados os primeiros limitantes em dietas à base de milho e farelo de soja ou os segundos limitantes em relação a dietas para peixes, devido aos ingredientes utilizados, fazendo com que a relação com lisina tenha uma diminuição (NRC, 2011). Assim, a metionina apresenta uma melhor disponibilidade na forma sintética, possibilitando a formulação de rações com baixos teores proteicos, mas nutricionalmente completas.

Este aminoácido é um importante mediador em diversas funções metabólicas, sobretudo como “primer” na síntese proteica. Rações com déficit de metionina aumentam o catabolismo proteico colaborando para a deposição de gordura (SOLBERG et al., 1971).

Brandão et al., (2009) cita em seu trabalho, que de acordo com o NRC (1993), em rações para peixes onívoros, os aminoácidos sulfurados, como a metionina, devem estar presentes na proporção de 3% da proteína da ração. Entretanto, segundo o NRC (2011), a exigência para peixes cultivados tem sido muito estudada, relatando uma variação de 1,8% a 3,2% do teor de proteína da ração.

A metionina é um aminoácido essencial para o crescimento animal, entretanto pode ser metabolizada e convertida em cistina. Devido às dificuldades de monitorar e quantificar a conversão de metionina a cistina, os pesquisadores têm estudado a exigência desses aminoácidos em conjunto, onde normalmente é expressa a necessidade de metionina+cistina (FURUYA et al., 2004; SILVA et al., 2006; MICHELATO et al., 2013).

A deficiência de metionina afeta, principalmente, a taxa de sobrevivência dos peixes, além de favorecer o aparecimento de catarata, redução do ganho de peso e eficiência alimentar e ataque de fungos (KELLY et al., 2006; ESPE et al., 2008). A suplementação adequada de metionina tem uma resposta positiva na atividade hepatossomática, bem como nos níveis das enzimas glutamiltransaminase intestinal e creatinaquinase (ESPE et al., 2008).

Bomfim et al. (2008b) avaliaram os efeitos de níveis dietéticos de metionina+cistina digestível com base no conceito de proteína ideal em dietas contendo níveis sub ótimos de lisina digestível (1,40%) para juvenis de tilápia do Nilo. Esses autores constaram um aumento da relação metionina+cistina:lisina da dieta não influenciou os parâmetros de desempenho, com exceção dos teores de gordura corporal, que foi reduzida em peixes alimentados com a dieta contendo 67,0% de aminoácidos sulfurados em relação ao teor de lisina da dieta.

De acordo com Furuya et al. (2004), para juvenis de tilápia do Nilo os melhores resultados de desempenho foram obtidos com a utilização de 1,00% de metionina + cistina, correspondente a 3,54% da proteína bruta, contendo 0,54% de metionina na ração. Destaca-se que pode ocorrer imprecisões na estimativa da relação metionina + cistina: lisina, caso a exigência de lisina não seja determinada adequadamente (BOISEN, 2003).

1.5 Tecido muscular estriado esquelético

Nos peixes, o tecido muscular estriado esquelético compõe a maior parte da massa corporal, correspondendo de 40 a 75% da massa corporal total. Essa musculatura apresenta-se dividida nas regiões epaxial e hipaxial por meio de um septo transversal horizontal, constituído por tecido conjuntivo colagenoso e localizado na região do nervo da linha lateral (ALEXANDER, 1969; VIDELER, 2011) (Figura 1).

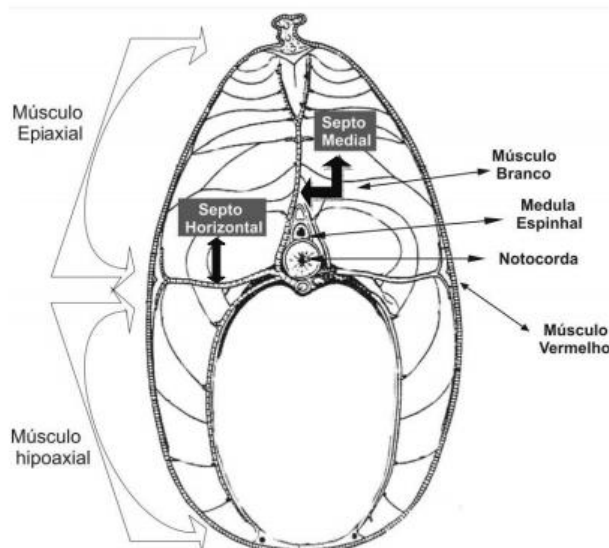


Figura 1. Esquema ilustrando o corte transversal da musculatura estriada esquelética de um peixe teleósteo, destacando as porções epiaxial e hipaxial. Fonte: Mareco (2012), baseado em Videler (2011).

O tecido muscular estriado esquelético é formado por células, denominadas fibras musculares, alongadas, cilíndricas, multinucleadas, com núcleos periféricos e apresentam estrias transversais no sarcoplasma devido à presença de sarcômeros (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

Do ponto de vista anatômico, a musculatura estriada esquelética dos peixes apresenta-se organizada em unidades morfofuncionais, chamadas de miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal (Figura 2). Segundo Leeuwen (1999), essa organização em miômeros confere maior mobilidade, durante a natação, por meio dos movimentos ondulatórios. Os miômeros são separados por septos de tecido conjuntivo colagenoso denominados miosseptos. Através desse miosseptos, a força de contração das fibras musculares em um miômero é transmitida para os tendões e esqueleto axial, resultando nas ondulações do corpo e movimentos de propulsão (ALTRINGHAM e ELLERBY, 1999).

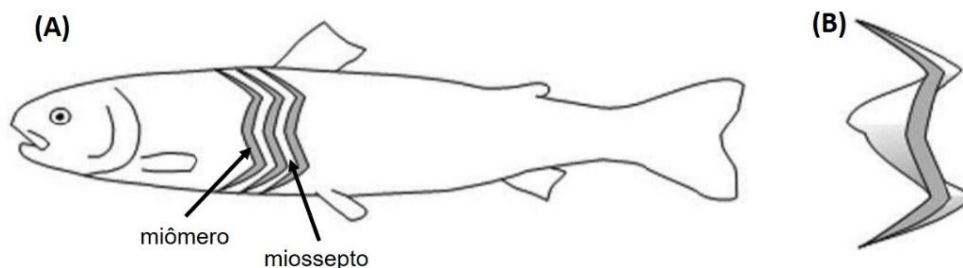


Figura 2. Esquema demonstrando a organização do tecido muscular estriado esquelético em miômeros e miosseptos em um peixe teleósteo (A) e o formato em “W” de um miômero em destaque (B). Fonte: adaptado de Mareco (2012), baseado em Altringham e Ellerby (1999).

A musculatura estriada esquelética dos peixes é formada por três tipos de fibras musculares, vermelhas, intermediárias e brancas, classificadas de acordo com suas características morfofuncionais, entre as quais estão o tipo de metabolismo (oxidativa ou glicolítica) e a velocidade de contração (lenta ou rápida). Esses tipos de fibras estão anatomicamente separados e organizados nos compartimentos vermelho, intermediário e branco, diferindo do padrão observado em mamíferos (WEATHERLEY e GILL, 1987).

As fibras vermelhas formam o compartimento vermelho que, na maioria das espécies, se localiza na região do nervo da linha lateral e apresenta formato triangular. As fibras vermelhas apresentam contração lenta e metabolismo oxidativo e são recrutadas durante movimentos lentos e de longa duração, como a migração. O compartimento branco, formado pelas fibras brancas de contração rápida e metabolismo glicolítico, corresponde à maior parte da massa muscular. Essas fibras são recrutadas durante movimentos rápidos e de curta duração, como a fuga de predadores. Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento intermediário formado por fibras que apresentam características intermediárias entre as das fibras brancas e vermelhas, como contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico (SÄNGER e STOIBER, 2001).

A formação embrionária das fibras musculares, processo conhecido como miogênese, ocorre a partir do mesoderma paraxial que sofre segmentação, formando os somitos, localizados ao lado da notocorda e do tubo neural. Um dos tipos celulares presentes nos somitos são as células precursoras miogênicas (MPCs) que são

determinadas a formar fibras musculares. As MPCs proliferam e diferenciam-se nos mioblastos que são células fusiformes, mononucleadas e que iniciam a síntese de proteínas contráteis, como a actina e miosina (ZHANG et al., 2001). Vários mioblastos fundem-se uns aos outros, formando miotubos multinucleados com núcleos centrais (RESCAN, 2001) (Figura 3). Nesses miotubos, as proteínas contráteis organizam-se em sarcômeros, a unidade contrátil da fibra muscular e miofibrilas as quais se localizam-se inicialmente, na periferia. Os núcleos centrais dos miotubos migram para a periferia e as miofibrilas adquirem posição central, caracterizando a fibra muscular madura. De acordo com Vasyutina et al., (2007), a maturação/diferenciação da fibra muscular em sua forma definitiva também inclui um aumento da síntese e acúmulo de proteínas miofibrilares, como actina e miosina e uma contínua formação de miofibrilas (Figura 4).

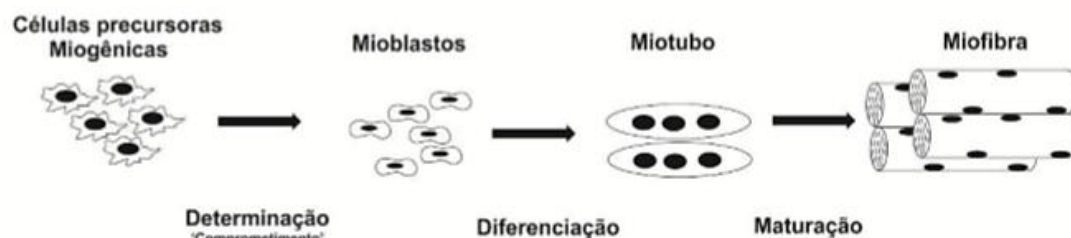


Figura 3. Esquema simplificado ilustrando o processo de formação embrionária das fibras musculares esqueléticas a partir das células precursoras miogênicas localizadas nos somitos. Fonte: Mareco (2012), adaptado de Watabe (1999).

Durante a formação embrionária das fibras musculares, alguns mioblastos não sofrem fusão e permanecem como células indiferenciadas e quiescentes localizadas na periferia dessas fibras. Essas células são conhecidas como mioblastos indiferenciados e correspondem às células satélites descritas nos mamíferos. Sua função é promover o crescimento muscular pós-natal e a regeneração (JOHNSTON, 2011).

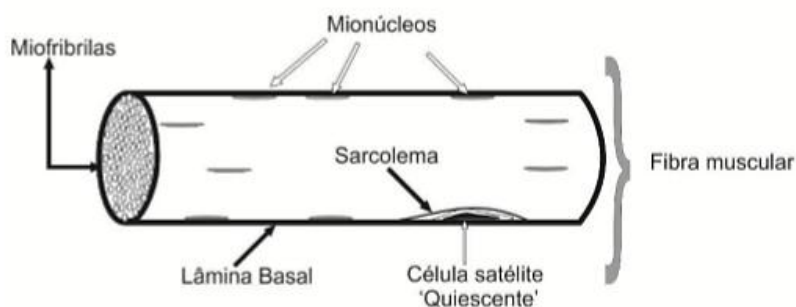


Figura 4. Esquema ilustrando a localização de uma célula satélite quiescente, na periferia de uma fibra muscular, entre a sua lâmina basal e sarcolema. Fonte: Mareco (2012).

Durante o crescimento muscular pós-embriológico, os mioblastos indiferenciados e quiescentes, localizados na periferia das fibras musculares, são ativados, passam por mitoses e podem seguir dois caminhos: (1) sofrer fusão entre si, na periferia de uma fibra preexistente, formando miotubos multinucleados que irão se diferenciar em novas fibras musculares, processo conhecido como hiperplasia e (2) ser incorporados a uma fibra muscular preexistente, com aumento do número de núcleos e maior síntese de miofibrilas, levando ao aumento no diâmetro e comprimento dessa fibra muscular, mecanismo conhecido como hipertrofia (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001) (Figura 5).

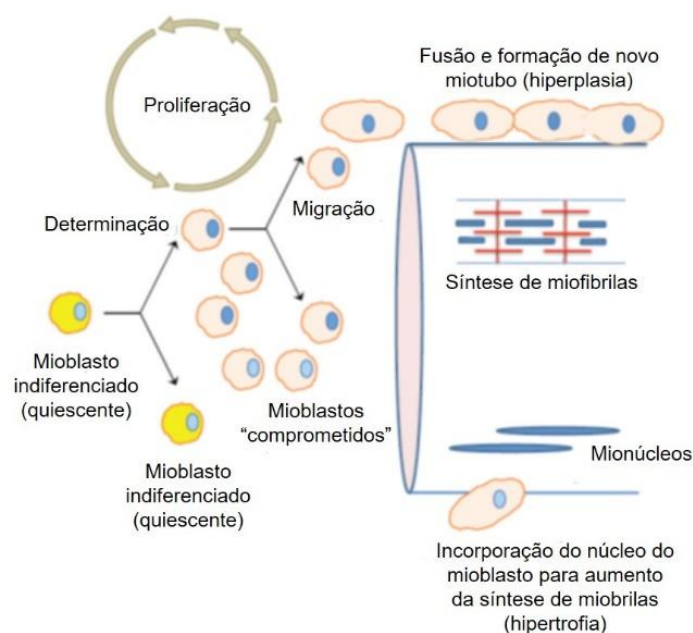


Figura 5. Esquema demonstrando os mecanismos de crescimento muscular nos peixes a partir da ativação e proliferação de mioblastos indiferenciados e quiescentes. Os mioblastos ativados sofrem mitoses e uma das células-filhas é determinada a contribuir com o crescimento e, a outra, permanece indiferenciada. Os mioblastos “comprometidos” com o crescimento promovem a hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares. Fonte: adaptado de Johnston (2011).

As contribuições da hipertrofia e hiperplasia para o crescimento muscular variam de acordo com a espécie e fase de crescimento. Em espécies de peixes que atingem um pequeno tamanho final, como o peixe-zebra, o crescimento muscular ocorre, principalmente, pela hipertrofia das fibras formadas no início do desenvolvimento embrionário e a hiperplasia ocorre por um período mais curto. Nas espécies de interesse comercial, que atingem grandes tamanhos, a hiperplasia ocorre durante toda a vida do animal (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001).

1.6 Controle molecular do crescimento muscular

O crescimento muscular é controlado pela ação coordenada de diferentes fatores, entre os quais se encontram hormônios, fatores de transcrição e de crescimento e citocinas (FUNKENSTEIN et al., 2006).

Durante o crescimento, observa-se a retomada dos eventos ocorridos na miogênese. Os mioblastos indiferenciados e quiescentes, presentes na periferia das fibras musculares adultas, são ativados e proliferam, podendo contribuir para a hiperplasia e/ou hipertrofia. Os processos de proliferação e a diferenciação dos mioblastos, durante o crescimento muscular, são regulados por diversas moléculas, entre as quais estão os fatores de regulação miogênica e a miostatina (CARANI et al., 2007).

1.6.1 Fatores de regulação miogênica (MRFs)

Os MRFs são fatores transcricionais músculo-específicos, dos quais fazem parte a MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4 (WATABE, 2001). Esses fatores transcricionais contêm um domínio altamente conservado conhecido como *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH). O domínio básico liga-se às sequências de DNA, conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora da maioria dos genes músculo específicos. A região *Helix-Loop-Helix* (HLH) dos MRFs liga-se a uma outra proteína, que apresenta o mesmo domínio, como as proteínas E ou outro MRF, formando um dímero. A ligação desse dímero à sequência E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, como actina e miosina, levando à sua expressão (MURRE et al., 1989, 1994; LASSAR et al., 1991).

Durante o crescimento muscular, os MRFs MyoD e Myf5 determinam a proliferação dos mioblastos, enquanto a expressão da miogenina e MRF4 são expressos durante a diferenciação dos mioblastos em miotubos e fibras musculares maduras (RESCAN et al., 2001; WATABE, 1999, 2001).

1.6.2 Miostatina

A miostatina, também conhecida como GDF-8 (*Growth and Differentiation Factor-8*), é um membro da superfamília dos fatores de crescimento TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) e está envolvida com a regulação negativa do desenvolvimento e crescimento do músculo estriado esquelético nos mamíferos (MCPHERRON et al., 1997). Nesse controle negativo, a miostatina é capaz de regular o número final de fibras formadas durante a miogênese pela inibição da proliferação e/ou

diferenciação dos mioblastos. O controle da proliferação dos mioblastos pela miostatina ocorre pela inibição de proteínas que iniciam o ciclo celular (THOMAS et al., 2000; JOULIA et al., 2003), enquanto a inibição da diferenciação dos mioblastos se dá pela *down*-regulação da expressão dos MRFs MyoD, miogenina e Myf-5 (LANGLEY et al., 2002; RÍOS et al., 2002; JOULIA et al., 2003).

A regulação negativa do crescimento muscular pós-natal dos mamíferos, pela miostatina, ocorre pela inibição da proliferação e/ou diferenciação das células satélites durante a hipertrofia (LEE, 2004). Em condições normais, a miostatina é responsável por manter as células satélites no estado quiescente, até que, em circunstâncias nas quais o crescimento ou a regeneração são requeridos, a miostatina possa ser inibida, permitindo que as células satélites retornem ao ciclo celular (LEE, 2004).

Diferentemente dos mamíferos, a expressão de miostatina, nos peixes, tem sido detectada em vários tecidos, além do músculo esquelético, como cérebro, rins, baço, brânquias, intestino e gônadas (MACCATROZZO et al., 2001; RÍOS et al., 2002; ACOSTA et al., 2005; DE SANTIS et al., 2012). Assim, nos peixes, a função da miostatina parece não estar restrita apenas ao controle do crescimento muscular, conforme observado em mamíferos. Para os peixes, outras funções têm sido atribuídas à miostatina, como manutenção da homeostase do crescimento, regulação da osmolaridade e relação com a função dos tecidos reprodutivos e com as funções imunológicas (MACCATROZZO et al., 2001; RODGERS et al., 2001; RÍOS et al., 2002; XIE et al., 2018).

1.7 Referências bibliográficas

AI, Q.; XIE, X. Effects of replacement of fish meal by soybean meal and supplementation of methionine in fish meal/soybean meal-based diets on growth performance of the southern catfish (*Silurus meridionalis*). **Journal of World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 36, n. 4, p. 498-507, 2005.

ABIMORAD, E.G.; CASTELLANI, D. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari do rabo amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. **Bol. Inst. Pesca**, v.37, n.1, p.31-38, 2011.

ACOSTA, J.; CARPIO, Y.; BORROTO, I.; GONZÁLES, O.; ESTRADA, M. P. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. **Journal of biotechnology**, v. 119, n. 4, p. 324-31, 2005.

ALBERTS, B. et al. Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula, Porto Alegre: **Artmed**, 2002.

ALENCAR-ARARIPE, M. N. B.; ARARIPE, H. G. A.; LOPES, J. B.; CASTRO, P. L.; BRAGA, T. E. A.; FERREIRA, A. H. C.; ABREU, M. L. T. Redução da proteína bruta com suplementação de aminoácidos em reações para alevinos de tambatinga. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 9, p. 1845- 1850, 2011.

ALEXANDER, R. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 49, 263-290, 1969.

ALMEIDA, F.L.A. **Expressão gênica de fatores que controlam o crescimento muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2011. 127p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas – SP. 2011.

ALTRINGHAM, J. D.; ELLERBY, D. J. Fish swimming: patterns in muscle function. **The Journal of experimental biology**, v.202, n. 23, 3397-403, 1999.

AMALI, A.A.; LIN, C.J.F.; CHEN, Y.H.; WANG, W.L.; GONG, H.Y.; LEE, C.Y.; KO, Y.L.; LU, J.K.; HER, G.M.; CHEN, T.T.; WU, J.L. Up-regulation of musclespecific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock down of myostatin-1. **Dev. Dyn.**, v. 229, p. 847-856, 2004.

ARAÚJO, J.R. **Avaliação de alimentos alternativos regionais para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 70p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina – PE. 2010.

BOISEN, S. ideal dietary amino acid profiles for pigs. **In: Amino acid in farm animal nutrition**. Wallingford: CAB International, p.157-168, 2003.

BOMFIM, M.D.A.; LANNA, E.A.T.; SERAFINI, M.A. Níveis de energia digestível e proteína bruta em rações para alevinos de lambari Tambuí. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.634 – 640, 2006b.

BOMFIM, M.A.D.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J.L. Exigência de treonina, com base no conceito de proteína ideal, de alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.12, p.2077-2084, 2008b.

BOMFIM, M.A.D.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J.L. *et al.* Níveis de lisina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1-8, 2010.

BRANDÃO, L.V; PEREIRA-FILHO, M.; GUIMARÃES, S. F.; FONSECA, F.A.L. Suplementação de metionina e/ou lisina em rações para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818), **Acta Amazo.**, v. 39, n. 3, p.675 – 680, 2009.

BRASIL. **Secretaria Especial da Aquicultura e da Pesca (SEAP)**. Secretaria-Geral da Presidência da República. Brasília, p.128, Fev. 2012.

BRASIL, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**. Produção da Pecuária Municipal 2015, v. 43, p. 47, 2016.

BUREAU, D.P.; HARRIS, A.M.; BEVAN, D.J.; SIMMONS, L.A.; AZEVEDO, P.A.; CHO, C.Y. Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 181, p.281-291, 2000.

BURRIN, B.D. Intestinal metabolism of sulfur amino acids. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.22, n.2, p. 175 – 187, 2009.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes animal**. Campinas. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 430p., 2002.

CALÍOPE FREITAS, J. W. **Análise de parâmetros químicos e bioquímicos de algumas espécies de algas marinhas, para inclusão em rações utilizadas na piscicultura, visando modificar o “flavor” de peixes de água doce**. 2002. Tese (Doutorado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

CARANI, F.R.; AGUIAR, D.H.; ALMEIDA, F.L.A.; GONÇALVES, H.S.; PADOVANI, C.R.; DAL PAI-SILVA, M. Morphology and skeletal muscle growth in pirarucu (*Arapaima gigas*). **Acta Scientiarum, Biological Sciences**. 2007.

CARVALHO, A.D. 2006. **Digestibilidade de dietas e metabolismo em frangos de corte e suínos alimentados com soja integral processada**. UFSM, 102p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

COWEY, C.B. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. **Aquaculture**, v. 124, p. 1 – 11, 1994.

DE SANTIS, C.; JERRY, D.R. Santis, C. and Jerry, D.R. Differential tissue-regulation of myostatin genes in the teleost fish *latipes calcarifer* in response to fasting. Evidence for functional differentiation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 335, p. 158-65, 2012.

D'MELLO, J.P.F. Adverse effects of amino acid. **In: D'MELLO, J.P.F. Amino acids in animal nutrition**. 2.ed. Edinburgh: CABI Publishing, p.187-202, 2003.

EDMONDSON, D.; LYONS, G. E.; MARTIN, J. F.; OLSON, E. N. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 120, n.5, p. 1251-1263, 1994.

EL-SAYED, A.F.M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**.Oxford, v. 179, p. 149-168, 1999.

ENCARNAÇÃO, P.; DE LANGE, C.; RODEHUTSCORD, M. *et al.* Diet digestible energy content affects lysine utilization, but not dietary lysine requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for maximum growth. **Aquaculture**, v. 235, p. 569-586, 2004.

ESPE, M.; HEVROY, E.M.; LIASET *et al.* Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, salmon salar. **Aquaculture**, v. 274, p. 132 – 141, 2008.

FABREGAT, T. E. H. P.; PEREIRA, T. S.; BOSCOLO, C. N.; ALVARADO, J. D.; NICODEMO, D. Substituição da farinha de peixes pelo farelo de soja em dietas para juvenis de curimba. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 289-294, 2011.

FAO. Food and Agriculture Organization - **The state of world fisheries and Aquaculture**. 2013.

FAO. Food and Agriculture Organization - **The state of world fisheries and Aquaculture**. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization - **The state of world fisheries and Aquaculture**. 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization - **The state of world fisheries and Aquaculture**. 2018.

FASAKIN, E.A.; SERWATA, R.D.; DAVIES, S.J. Comparative utilization of rendered animal derived products with or without composite mixture of soybean meal in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, p. 329-338, 2005.

FUJISAWA-SEHARA, A.; NABESHIMA, Y.; HOSODA, Y.; TAKASHI, O.; NABESHIMA, Y. Myogenin Factors Two Domains Conserved among Myogenic Factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 25, p. 15219-15223, 1990.

FUNKENSTEIN, B.; BALAS, V.; SKOPAL, T.; RADAELLI, G.; ROWLERSON, A. Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. **Tissue and Cell**, v. 38, p. 399-415, 2006.

FURUYA, W.M.; SILVA, L.C.R.; NEVES, P.R. *et al.* Exigência de metionina + cistina para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1933-1937, 2004.

FURUYA, W.M.; BOTARO, D.; MACEDO, R.M.G. et al. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1433-1441, 2005.

FURUYA, W.M.; BOTARO, D.; SANTOS, V.G. et al. Exigências de lisina digestível para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 937-942, 2006.

FURUYA, W. M. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010.

GALDIOLI, E.M.; HAYASHI, C. Diferentes fontes proteicas na alimentacao de alevinos de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Acta Scientiarum**, Maringa, v. 22, p. 471-477, 2000.

GONÇALVES, G. S.; FURUYA, W. M.; RIBEIRO, R. P.; FURUYA, V. R. B.; SOARES, C. M. Farelo de canola na alimentação do piavuçu, *Leporinus macrocephalus* na fase inicial. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p. 921-925, 2002.

GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M. et al. Relação lisina digestível:proteína digestível em rações para tilápias do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2299-2305, 2009.

HARDY, R.W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 770-776, 2010.

HELTERLINE, D.L.; GARIKIPATI, D.; STENKAMP, D.L.; RODGERS, B.D. Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin -1 and -2 gene expression in zebrafish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 151, n.1, p. 90-7, 2007.

HOPWOOD, N.D., Pluck, A., Gurdon, J.B. MyoD expression in the forming somites is na early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. **EMBO J.**, v. 8, p. 3409-3417, 1989.

HU, M.; WANG. Y.; WANG. Q. et al. Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients with lysine and methionine supplementation to practical diets for gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture**, v. 275, p. 260-265, 2008.

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of experimental biology**, v. 209, n. 12, p.2249-2264, 2006.

JOHNSTON, I. A. A., Bower, N. I., e Macqueen, D. J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **The Journal of experimental biology**, v. 214, n. 10, 1617-28, 2011.

JOULIA, D.; BERNARDI, H.; GARANDEL, V.; RABENOELINA, F.; VERNUS, B.; CABELLO, G. Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. **Exp. Cell Res.**, v. 286, p. 263-275, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9 ed., 296p., 2013.

KELLY, M.; GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, J.; GATLIN III, D.M. Refined understanding of sulphur amino acid nutrition in hybrid strip bass, Morone chrysops x M. saxatilis. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 1546 – 1555, 2006.

KIM, H.S.; LIANG, L.; DEAN, R.G.; HAUSMAN, D.B.; HARTZELL, D.L.; BAILE, C.A. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 281, p. 902-906, 2001.

KOBIYAMA, A.; NIHEI, Y.; HIRAYAMA, Y.; KIKUCHI, Y.; SUETAKE, H.; JOHNSTON, I.A.; WATABE, S. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 2801-2813, 1998.

KUBARIK, J. Tilapia on highly flexible diets. **Feed International**, v. 6, p. 16-18, 1997.

LANGE, A. **Manejo da adubação nitrogenada na cultura de milho após cultivo da soja em sistema de semeadura direta no cerrado**. 2006. 135 f. Acta Amazonica, Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo/USP, Piracicaba, 2006.

LANGLEY, B.; THOMAS, M.; BISHOP, A.; SHARMA, M.; GILMOUR, S.; KAMBADUR, R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 49831-49840, 2002.

LASSAR, A. B.; BUSKIN, J. N.; LOCKSHON, D.; DAVIS, R. L.; APONE, S.; HAUSCHKA, S. D.; WEINTRAUB, H. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 823-31, 1991.

LEE, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 61-86, 2004.

LEE, C.Y.; HU, S.Y.; GONG, H.Y.; CHEN, M. H.C.; LU, J.K.; Wu, J.L. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. **Biochemical and biophysical research communications**, v 387, n.4, p.766-71. Elsevier, 2009.

LEE-UWEN, J. L. V. A. N. A mechanical analysis of myomere shape in fish. **Journal of Experimental Biology**, p. 3405-3414. 1999.

LI, P. et al. New development in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, p. 43-53, 2009.

LIENER, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. In: Ory, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods. **Westport: Food & Nutrition Press.**, p.143-157. 1981.

LIMA JÚNIOR, D. M.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, A. H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, S. E. O.; FREIRE, D. A. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n. 4, p.132-143, 2010.

LOURES, B. T. R. R. *et al.* Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 877-883, 2001.

LOVELL, R.T. **Nutrition and Feeding of Fish**. New York, USA: Van Nostrand Reinhold, 1989.

LOVELL, R.T. **Nutrition and Feeding of Fish**. New York, USA: Van Nostrand and Reinhold, 1998.

MACCATROZO, L.; BARGELLONI, L.; RADAELLI, G.; MASCARELLO, F.; PATARNELLO, T. Characterization of the myostatin gene in the gillhead seabream (*Sparus aurata*): sequence and genomic structure, and expression pattern. **Mar. Biotechnol**, v. 3, p. 224-230, 2001a.

MACCATROZO, L.; BARGELLONI, L.; CARDAZZO, B.; RIZZO, G.; PATARNELLO, T. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. **FEBS Lett**, v. 509, p. 36-40, 2001b.

MAI, K.L. *et al.* Dietary lysine requirement of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 258, p. 535-542, 2006.

MARECO, E.A. **Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem gift**. 2012. 66p. Dissertação de mestrado. Univesidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências. Botucatu – SP. 2012.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BARBERO, L. M. *et al.* Farelo de soja na alimentação de tilápias do Nilo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 791-794, 2008.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, p. 331–343, 2004.

MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, v. 387, p. 83-90, 1997.

MIYADA, V.S. Uso de proteína ideal na alimentação e nutrição de suínos. **In: MATTOS, W.R.S. et al. (Ed.). A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba, FEALQ, p. 195 – 201, 2001.

MICHELATO, M. **Exigência de metionina + cistina para tilápia do Nilo de 550 a 700g, em tanques-rede, com base no conceito de proteína ideal**. 2010. 46p. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá – PR. 2010.

MICHELATO, M.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S., Digestible methionine + cystine requirement for Nile tilapia from 550 to 700 g, **R. Bras. Zootec.**, v. 42, n. 1, p. 7-12, 2013.

MORISSETTE, M.R.; COOK, S.A.; FOO, S.; MCKOY, G.; ASHIDA, N.; NOVIKOV, M.; SCHERRER-CROSBIE, M.; LI, L.; MATSUI, T.; BROOKS, G.; ROSENZWEIG, A. Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. **Circ. Res.**, v. 99, p. 15–24, 2006.

MURRE, C.; MCCAWE, 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. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell.**, v. 58, p.537-544, 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washington, DC: National Academy Press, 102p., 1993.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washington, DC: National Academy Press, 376 p., 2011.

OBA-YOSHIOKA, E. T. Cuidados essenciais no manejo alimentar de peixes redondos cultivados no Estado do Amapá. **Comunicado Técnico**, v. 97, 2014.

VIE, S. O.; EZE, S. S. Lysine requirement and its effects on body composition of *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, 2012.

PATRUNO, M.; SIVIERI, S.; POLTRONIERI, C.; SACCHETTO, R.; MACCATROZO, L.; MARTINELLO, T.; FUNKENSTEIN, B.; RADAELLI, G. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). **Cell Tissue Res**, v.331, p. 643-58, 2008.

PEIXEBR. Associação Brasileira da Piscicultura. **Anuário PeixeBR da Piscicultura 2017/2018**. 2018.

PETTE, D.; STARON, R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microsc. Res. Tech.**, v. 50, p. 500-509, 2000.

PEZZATO, L. E.O Estabelecimento das Exigências Nutricionais das Espécies de Peixes Cultivadas. In: **Anais do Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes**. Piracicaba, SP, 1997.

PEZZATO, L.E. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1595-1604, 2002.

RADAELLI, G.; ROWLERSON, A.; MASCARELLO, F.; PATRUNO, M.; FUNKENSTEIN, B. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. **Cell Tissue Res.**, v. 311, p. 239-50, 2003.

RESCAN, P.Y.; GAUVRY, L.; PABOEUF, G.; FAUCONNEAU, B. Identification of a muscle factor related to MyoD in fish species. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1218, p. 202-204, 1994.

RESCAN, P.Y.; GAUVRY, L.; PABOEUF, G. A gene of homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and *in vitro* during the conversion of myosatellite cells to myotubes. **FEBS Lett.**, v.362, p. 89-92, 1995.

RESCAN, P.Y.; JUTEL, I.; RALLIÈRE, C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.**, v. 204, p. 3523-3529, 2001.

RÍOS, R.; CARNEIRO, I.; ARCE, V.M.; DEVESA, J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, p. 993-999, 2002.

ROBERTS, S.B.; GOETZ, F.W. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. **FEBS Lett.**, v. 491, p. 212-216, 2001.

ROBIANA L.; CORRAZE G.; AGUIRRE, P.; BLANC, D.; MELCION, J.P.; KAUSHIK, S. Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. **Aquaculture**, v. 179, p. 45-56, 1999.

RODGERS, B.D.; WEBER, G.M.; SULLIVAN, C.V.; LEVINE, M.A. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. **Endocrinology**, v. 142, p. 1412-1418, 2001.

ROUBACH, R.; GOMES, L. de C.; CHAGAS, E. C.; LOURENÇO, J. N. de P. Nutrição e manejo alimentar na piscicultura. **Série Documentos**, v. 23. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2002.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston, I.A. (Ed.), **Muscle Development and Growth**. Academic Press, London, p. 103-139, 2001.

SANGER, A.M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.), **Muscle Development and Growth**. Academic Press London, p. 187-250, 2001.

SANTOS, L. R. B.; OBA, E. T. Dieta: ferramenta importante para manejo dos peixes no cultivo. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes cultivados**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 89-105, 2009.

SILVA, L.C.R.; FURUYA, W.M.; SANTOS, L.D. et al. Níveis de treonina em rações para tilápias-do-Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1258-1264, 2006.

SOLBERG, J., BUTTERY, P.J.; BOORMAN, K.N. Effect of moderate methionine deficiency on food, protein and energy utilization in the chick. **British Poultry Science**, v. 12, p. 297-304, 1971.

SOLTAN, M.A. et al. Effect of replacing fish meal by a mixture of different plant protein sources in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. **Global Veterinaria**, v. 37, n. 4, p. 157-164, 2008.

STOREBAKKEN, T.; REFSTIE, S.; RUYTER, B. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. **In: Drackley, J.K. (Ed), Soy in Animal Nutrition**. Fed Anim. Sci. Sco., Savoy, II, USA, p. 127-170, 2000.

TAKISHITA, S.S.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J.L. et al. Níveis de lisina digestível em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 38, p. 2099-2105, 2009.

TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; CREPALDI, D.V. et al. Exigências de aminoácidos para alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) estimadas com base no conceito de proteína ideal. **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.41, 2004, Campo Grande. Anais. Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J. J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 40235–40243, 2000.

VANNUCCINI, S. El enfoque del nuevo mercado de tilapia; en el mundo Occidental. **Panorama Acuicola**, v .4, n. 3, p. 22-25, 1999.

VASYUTINA, E.; LENHARD, D. C.; BIRCHMEIER, C. Notch Function in Myogenesis. **ND SC RIB. Cell Cycle**, p. 1451-1454, 2007.

VIDELER, J. J. An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. **Fish physiology and biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 337-43, 2011.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. **J. Fish Biol**, v. 55, p. 1-18, 1999.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. **Academic Press London**, p. 19-41, 2001.

WEATHERLEY, A.H.; GILL, H.S. The biology of fish growth. London: **Academic Press**, 1987.

WEINBERG, E.S.; ALLENDE, M.L.; Kelly, C.S.; ABDELHAMID, A., MURAKAMI, T.; ANDERMANN, P.; DOERRE, O.G.; GRUNWALD, D.J.; RIGGLEMAN, B. Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, *no tail* and *spadetail* embryos. **Development**, v. 122, p. 271-280, 1996.

WU, G.; KNABE, D.A.; YAN, W. Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. 334–342, 1995.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249-1252. 1998.

WU, R.; BAZER, F.W.; DAI, Z.; LI, D.; JUNJUN, W.; WU, Z. Amino Acid Nutrition in Animals: Protein Synthesis and Beyond. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p. 387-417, 2014.

YOSHIOKA, E. T. O.; ALMEIDA, R. S.; GEMAQUE, S. R. F.; BRASILIENSE, A. R. P.; SILVA, R. S.; MARINHO, R. G. B. Substituição parcial da ração comercial por soja e milho cozidos e sua influência sobre o cultivo de híbridos tambatingas. **Biota Amazônia Open Journal System**, Macapá, v.5, n.1, p.61-67, 2015.

XIE, S.; ZHOU, A.; FENG, Y.; WANG, Z.; FAN, L.; ZHANG, Y.; ZENG, F.; ZOU, J. Effects of fasting and re-feeding on mstn and mstnb genes expressions in *Cranoglanis boudierius*. **Gene**, v. 647, p. 1000-1016, 2018.

XU, C.; WU, G.; ZOHAR, Y.; DU, S.J. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 4067-4079, 2003.

ZANON, G. D. **Teor de proteína e de óleo em grãos de soja obtidos sob diferentes tipos de manejo**. 2007. 62 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Grande Dourados/UFGD, Dourados, 2007.

ZEHRRA, S.; KHAN, M.A., 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**, v. 13, n. 1, 2014.

ZHANG, S.; BHATTACHARYA, H.; LI, H. Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes). **Nature**, 2001.

ZHOU, X.Q.; ZHAO, C.R.; JIANG, J. *et al.* Dietary lysine requirement of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). **Aquacul. Nutrit.**, v. 14, p. 381-386, 2008.

CAPÍTULO 2 - EFFECTS OF COMBINED LYSINE AND METHIONINE SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE AND EXPRESSION MUSCLE-GROWTH-RELATED GENES OF NILE TILAPIA FINGERLING

ABSTRACT

This work was carried out with the objective of evaluating the effects of the combination of lysine and methionine on the performance of growth and expression of genes related to muscle growth in sexually reversed Nile tilapia fingerlings. Fish ($n = 336$, initial weight 0.90 ± 0.01 g) were randomly distributed into 24 70 L aquaria with a continuous water flow system in an entirely randomized design with four treatments and six replicates. Four isoproteic (~ 330.50 g/kg crude protein) and isocaloric (~ 18.59 MJ / kg) diets without lysine or methionine supplementation (Control), or supplemented with lysine (Lys), methionine (Met) and lysine and methionine (Lys + Met) were elaborated. Fish were hand fed until apparent satiety. Fish fed diets Lys+Met and Met showed higher final body weight and specific growth ratio compared to fish fed other diets. The protein efficiency ratio was higher in fish diet Lys compared to fish fed other diets. Fish fed Met and Lys+Met diets showed lower hepatosomatic index and whole-body fat compared to fish fed the control diet. Feed intake, survival and whole-body moisture, crude protein, ash and mRNA expression of *myostatin* of fish were not affected by diets. Fish fed diet Lys+Met demonstrated higher mRNA expression level of *MyoD* compared to those fed the control diet. In conclusion, Nile tilapia fingerlings fed combined lysine and methionine demonstrates improved growth performance in line to higher mRNA expression of *MyoD* and *myogenin*, and also reduced body fat contents.

Key words: muscle fibers, myogenin, myostatin, MyoD, performance

2.1 Introduction

All-vegetable diet has been proposed to enhance the ecological balance of unsustainable fish meal exploitations from natural resources and minimize pollution soil and water originated from aquafeeds. Elaborating well-balanced considering nutritive ingredients is priority in modern aquaculture to improve growth performance, reproduction and health of fish. However, plant ingredients utilization may be limited by occurrence antinutritional factors, low palatability and energy and nutrients deficiency. Lysine and methionine are the first limiting amino acids in corn and soybean, respectively, and is extensively to their co-products (GATLIN III et al., 2007; VIDAL et al., 2007; VIDAL et al., 2015).

Crystalline lysine and methionine has been successfully used to determine the dietary amino acids requirements and improve nutritive value of diets for carnivorous and non-carnivorous fish (NUNES et al., 2014), including Nile tilapia fed low (FIGUEIREDO-SILVA et al., 2015) or fish meal-free diets (KOCH et al., 2016). The dietary amino acids requirements have been determined for Nile tilapia (NRC, 2011), and extensively focused on lysine (SANTIAGO and LOVELL, 1988; BOMFIM et al., 2010; MICHELATO et al., 2016a) and methionine (SANTIAGO and LOVELL, 1988; MICHELATO et al., 2013; HE et al., 2015) have been properly determined for Nile tilapia (MICHELATO et al., 2013). It is widely known that the efficiency of crystalline amino utilization is quite variable among sources (MAI et al., 2006; NGUYEN and DAVIS, 2016; YUAN et al., 2011; ZHAO et al., 2017), diet composition (ZHAO et al., 2010; NIU et al., 2016)) and fish species (NUNES et al., 2014).

Recent studies have evidenced advantages of combined lysine and methionine supplementation in diets for Atlantic cod, *Gadus morhua* (HANSEN et al., 2011), Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus* (YUAN et al., 2011), grass carp, *Ctenopharyngodon Idella* (GAN et al., 2012) and rohy, *Labeo rohita* (SARDAR et al., 2009), golden pompano, *Tachinotus ovatus* (NIU et al., 2016). Lysine and methionine supplementation improve weight gain, feed efficiency, body composition of fish (SARDAR et al., 2009; YUAN et al., 2011). In addition, more sustainable diets may be considered by lysine and methionine supplementation because of improved dietary protein utilization (YUAN et al., 2013) and consequently lower nitrogen excretion of fish (GAN et al., 2012). However, dietary lysine and methionine availability is largely variable among feed ingredients (ABIMORAD et al., 2011; NOREEN and SALIM,

2008; GAYLORD et al., 2009; KITAGIMA and FRACALOSS, 2011) and fish species (MASAGOUNDER et al., 2009). To date, reduced efficiency crystalline compared to protein-bound amino acids has been attributed to impaired time-course of absorption (AMBARDEKAR et al., 2009) and faster leaching (YUAN et al., 2011). However, the study of blend of lysine and methionine remains poorly studied for Nile tilapia.

Molecular tools have been increasingly introduced in fish nutrition studies to best understanding an integrative approach in response of dietary factors (PANSERAT and KAUSHIK, 2010). Nutritional genomics has been recently used to analyze nutrients as controlling or regulatory factors of muscle growth related-genes of Nile tilapia in response of amino acids in fish diets, including methionine (MICHELATO et al., 2018) and lysine (AGUIAR et al., 2005). Fish is known to recruit new muscle fibers throughout the lifetime (ROWLERSON and VEGGETTI, 2001) and muscle growth processes by hypertrophy and hyperplasia may be influenced by nutrition. The muscle growth processes are regulated by molecular factors such as myogenic regulatory factors (MRFs), including *MyoD* and *myogenin*. While *MyoD* regulates the activation and proliferation of myoblasts, *myogenin* acts on cell differentiation (WATABE, 2001). However, myostatin (*mstn*) is a negatively growth factor and differentiation factor (LEE, 2004).

Nile tilapia has been largely farmed in many tropical and subtropical countries, where fish meal has partially or totally substituted by vegetable ingredients. Crystalline amino acids supplementations should be considered to elaborate well-balanced amino acids diets to improve growth performance of fish and elaborate environmentally oriented diets. Therefore, this approach may be used to assess the molecular regulation of lysine and methionine supplementation on expression of genes related to skeletal muscle growth in fish. Therefore, the objective of the present experiment was to investigate the effect of dietary lysine and methionine supplementation as feeding strategy, on the expression of genes related to muscle-growth and growth performance in Nile tilapia fingerlings fed all-vegetable diets.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Diets

Four all-vegetable isoproteic (~330.50 g/kg of crude protein) and isocaloric (~18.59 MJ/kg) diets based on corn grain-corn gluten-soybean meal as main protein sources supplemented or not with crystalline- lysine and/or DL-methionine (Table 2). L-Lysine and was supplemented at expense of L-alanine to meet the dietary requirement for Nile tilapia at 5.8 g/100g of crude protein (MICHELATO et al., 2016a), while DL-methionine was supplemented to meet the dietary quantitative methionine requirement previously determined at 7.5 g/kg (SANTIAGO and LOVELL, 1988). Both amino acids were supplemented at expense of L-alanine. The analyzed proximate composition and essential and non-essential amino acid content of the experimental diets are presented in Table 3. Macro ingredients were ground into a 800- μ m mesh, prior to mixing all ingredients in an “V” mixer (MA200; Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) and cold granulated through meat grinder with a 3-mm die (CAF5, Rio Claro, SP, Brazil), and dried for 24 h by oven-drying at 55° C. After drying, the diets were broken up (Botini, Bilac, SP, Brazil) and sieved (BertelI1832, Caieras, SP, Brazil) into proper pellets sizes (Tyler 32 = 0.50 mm; body weight $\leq$ 0.9 to < 3.0 g and Tyler 16 = 1.00 mm; body weight $\geq$ 3.0 g until the end of the experimental trial) and stored at 5° C until used.

Table 2. Ingredient composition of the experimental diets (g/kg, as fed-basis)

Ingredient	Diets			
	Control	Lys	Met	Lys+Met
Corn grain	293.40	293.40	293.40	293.40
Soybean meal	292.80	292.80	292.80	292.80
Corn gluten meal	140.00	140.00	140.00	140.00
Wheat meal	150.00	150.00	150.00	150.00
Fish oil	60.00	60.00	60.00	60.00
Soybean oil	30.00	30.00	30.00	30.00
Limestone	3.00	3.00	3.00	3.00
Dibasic phosphate	14.00	14.00	14.00	14.00
L-alanine	7.20	1.40	5.80	0.00
L-lysine	0.00	5.80	0.00	5.80
DL-methionine	0.00	0.00	1.40	1.40
L-threonine	0.30	0.30	0.30	0.30
L-tryptophan	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin and mineral mix*	5.00	5.00	5.00	5.00
Salt	4.00	4.00	4.00	4.00

*Composition (IU or mg/kg of mineral and vitamin mix): Vitamin A (retinal palmitate), 1 200 000 IU; vitamin D₃, (cholecalciferol), 200 000 IU; vitamin E (DL- α -tocopherol), 12 000 mg; vitamin K₃ (menadione), 2 400 mg; vitamin B₁ (thiamine HCl), 4 800 mg; vitamin B₂ (riboflavin), 4 800 mg; vitamin B₆ (pyridoxine HCl), 4 000 mg; vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) = 4.800 mg; folic acid, 1 200 mg; D-calcium pantothenate, 12 000 mg; vitamin C (ascorbic acid), 48 000 mg; D-biotin = 48 mg; choline chloride, 65 000 mg; niacin, 24 000 mg; ferrous sulfate (FeSO₄.H₂O.7H₂O), 10 000 mg; copper sulphate (CuSO₄.7H₂O), 600 mg; manganous sulfate (MnSO₄.H₂O), 4 000 mg; zinc sulfate (ZnSO₄.7H₂O), 6 000 mg; cobalt sulfate (CoSO₄.4H₂O), 2 mg; sodium selenite (Na₂SeO₃), = 20 mg; butylated hydroxytoluene (BHT), 15 mg; butylated hydroxyanisole (BHA), 15 mg.

Table 3. Analyzed composition of the experimental diets (g/kg, dry matter basis)

	Diets			
	Control	Lys	Met	Lys+Met
Proximate composition (g/kg)				
Dry matter	897.110	897.800	895.400	897.100
Gross energy, kcal/kg	4391.01	4390.92	4401.42	4396.39
Crude protein	340.08	338.72	340.73	338.31
Crude lipids	65.58	65.53	65.70	65.58
Crude fiber	41.13	41.10	41.21	41.13
Calcium	10.17	10.16	10.19	10.17
Total phosphorus	6.52	6.52	6.53	6.52
Essential amino acids plus cysteine and tyrosine				
Arginine	19.13	19.11	19.16	19.13
Histidine	8.10	8.10	8.12	8.10
Isoleucine	14.05	14.03	14.07	14.05
Leucine	21.10	21.08	21.14	21.10
Lysine	14.69	19.75	14.72	19.76
Methionine	6.06	5.90	7.46	7.45
Methionine + cysteine	11.56	11.55	13.12	11.56
Phenylalanine + tyrosine	31.52	31.1	30.99	30.96
Threonine	12.74	12.73	12.83	12.74
Tryptophan	3.76	3.75	3.76	3.76
Valine	15.92	15.91	15.95	15.92

2.2.2 Fish and experimental conditions

An experiment was conducted in Aquaculture Laboratory at the State University of Ponta Grossa, PR, Brazil, during 8-wk. Three hundred and thirty-six sexually reversed Nile tilapia fingerlings (initial weight 0.90 ± 0.01 g) were randomly distributed into 24-70 L aquaria with a continuous water flow-through system (2.0 L/min), in an entirely randomized design containing four treatments and six replicates ($n = 14$ fish per aquarium). A constant and photoperiod of 12 h light: 12 h dark was maintained during the experimental trial. Fish were hand fed seven days per week at 8, 12, 15 and 18 h until apparent satiety. Water quality parameters were monitored daily during the feeding trial and the parameters values (average $\pm$ SD) were as follow: water temperature was 28.0 ± 0.05 °C, pH was 7.04 ± 0.05 and dissolved oxygen was 6.12 ± 0.43 mg/L. The experiment was conducted according to *Guidelines to Care and Use of Animals for Scientific Research from State University of Ponta Grossa* (Protocol n° 14/18).

2.2.3 Samples collection and chemical analysis

At the beginning of the feeding trial, 100 fish were randomly sampled for whole-body composition. Fish were euthanized with an overdose of 50 mg/L of benzocaine prior to sampling. At the end of the feeding trial, fish were fasted for 24 h, counted and weighed to determine the final body weight (FBW), specific growth ratio (SGR), feed intake (FIN), feed conversion ratio (FCR), protein efficiency ratio (PER), hepatosomatic index (HSI), and survival (SUR). Five fish from each aquarium were randomly sampled for whole-body composition and stored at -20 °C until analysis. Three fish per aquarium were collected to determine hepatosomatic index (HSI). Three fish per aquarium were collected for expression of genes related to muscle-growth. Proximate composition of diets and fish were determined according to standard method (AOAC, 2005). Moisture was determined by oven-drying at 105 °C until constant weight; Crude lipid (CL) was determined by the ether-extraction method using a Soxhlet extractor (Tecnal, TE-044, Piracicaba, SP, Brazil); Crude protein (CP) (N x 6.25) was determined by Kjeldahl method (Tecnal, MA-036, Piracicaba, SP, Brazil) after acid hydrolysis. Ash was determined by combustion in a muffle furnace at 550 °C overnight (Tecnal, 2000B, Belo Horizonte, MG, Brazil). The amino acid profiles of the diets were determined by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) (Hitachi, Tokyo, Japan) after acid hydrolysis (Rayner, 1985). Tryptophan was determined after alkaline hydroxylation of the sample with lithium hydroxide.

2.2.4 Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

At the end of the experimental trial, samples of dorsal white muscle were collected approximately 1.0 cm proximate the dorsal fin. The total RNA was extracted from muscle samples (n = 3 fish per aquarium) using TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacture's protocol. Integrity of extracted RNA was observed by electrophoresis on 1% agarose gel stained with SYBR Safe (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). RNA samples were quantified using NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). at 260 nm of absorbance. One microgram of RNA were treated with DNase enzyme according to the manufacture's protocolo of *DNase I - Amplification Grade* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The cDNA synthesis was performed from 2 µg of total RNA using the *High Capacity cDNA archive kit* (Applied Biosystems Life Technologies), according to recommended by the manufacture's protocol. Primer pairs for *MyoD1*, *myogenin*, *myostatin* and *beta-actin* were designed with reference to cDNA nucleotide sequence from *Oreochromis niloticus*, available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/nucleotide>) (Table 4). Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) was carried out in a thermocycler StepOne™ Real Time PCR System Applied Biosystems™ (Applied Biosystems Life Technologies), using SYBR Green PCR Master Mix Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). A total of 20 ng of cDNA template and 10 µM of each primer in a 20 µL of total volume. RT-qPCR program consisted of denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95 °C, 30 s annealing at 60 °C, 30 s extension at 72 °C, ended with a dissociation curve. For each sample RT-qPCR was performed in duplicate and the threshold cycle (Ct) values obtained by amplification were measured and a relative change in the expression level of one specific gene was presented as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001). The gene expression was normalized relative to a reference gene beta-actin.

Table 4. Primers used for quantitative RT-qPCR in this study

Gene name	GenBank	
	number	Primer sequence (5'-3')
<i>MyoD1</i>	GU246722.1	Forward: CATCCAGCCCCCGCTCCAAC Reverse: GTCTGACAGGTGGGGCCGTT
<i>Myogenin</i>	GU246725.1	Forward: CTCAACCAGCAGGACACTGA Reverse: ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT
<i>Myostatin 1</i>	FJ972683	Forward: TGTGGACTTCGAGGACTTTGG Reverse: TGGCCTTGTAGCGTTTTGGT
<i>Beta-actin</i>	EU887951.1	Forward: GCCAACAGGGAGAAGATGACCCA Reverse: ACAGGGACAGCACAGCCTGGAT

2.2.5 Calculations

The parameters were calculated as follows:

Specific growth rate (%/day) = $100 \times [\ln \text{ final weight (g)} - \ln \text{ initial weight (g)}] / \text{experimental duration (days)}$;

Feed intake = dry feed consumed (g)/ number of fish;

Feed conversion ratio = dry feed consumed (g)/ weight gain (g);

Protein efficiency ratio = body weight gain (g)/ protein intake (g);

Hepatosomatic index (%) = $100 \times \text{liver weight (g)} / \text{body weight (g)}$;

Survival (%) = $100 \times \text{number of fish at the end of the experiment} / \text{number of fish at the beginning of the experiment}$.

2.2.6 Experimental design and statistical analysis

Fish were distributed in an entirely randomized design with four independent treatments and six replicates of 14 fish per aquarium. All data were presented as means $\pm$ SEM and subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) to test the effects of the experimental diets using the statistical package SPSS (Version 13.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) for windows. Tukey's multiple range tests at $P < 0.05$ level of significance was used to compare differences among treatment means.

3. Results

3.1 Growth performance and body composition

The feeding trial was carried out without unexpected events with relatively lower mortality (<10%) and was unrelated to the experimental diets evaluated. No external pathological signs were observed, even in fish fed the control diet with no lysine or methionine supplementation. The mean values of growth performance of Nile tilapia fingerlings fed the experimental diets are shown in Table 5. Fish fed combined lysine and methionine showed higher final body weight ($P < 0.001$) and specific growth ratio ($P \geq 0.001$) than fish fed other diets (Figure 6); however, no differences between

final body weight and specific growth ratio between fish fed lysine and methionine were observed ($P > 0.001$). No differences in feed intake ($P \geq 0.210$), and survival ($P = 0.933$) among all treatments were observed. Protein efficiency ratio was significantly improved in fish fed lysine supplemented diet compared to fish fed the other diets (Figure 7). Fish fed control diet showed lower protein efficiency ratio ($P < 0.001$) compared to fish fed other diets. Hepatosomatic index was lower in fish fed isolated methionine and combined lysine and methionine diets ($P < 0.001$) compared to fish fed the control diet. The whole-body moisture, crude protein and ash was not significantly affected ($P > 0.001$) by dietary treatments (Table 6). However, fish fed isolated methionine and combined lysine and methionine diets showed reduced whole-body crude lipids contents Figure 8.

Table 5. Growth performance of Nile tilapia fingerlings fed the experimental diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine and methionine

Variable	Diets				<i>P</i> -value
	Control	Lysine	Methionine	Lysine+Methionine	
Initial weight, g	0.89 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.89 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.860
Final weight, g	7.02 ± 0.19 ^c	8.84 ± 0.12 ^b	8.67 ± 0.06 ^b	10.31 ± 0.12 ^a	<0.001
Specific growth ratio, %/day	4.90 ± 0.20 ^c	5.49 ± 0.11 ^b	5.44 ± 0.05 ^b	5.89 ± 0.12 ^a	<0.001
Feed intake, g/fish	9.00 ± 0.30	8.82 ± 0.31	8.66 ± 0.60	10.53 ± 0.60	0.210
Feed conversion ratio	1.26 ± 0.04 ^a	1.11 ± 0.02 ^b	1.11 ± 0.01 ^b	1.11 ± 0.02 ^b	0.001
Protein efficiency ratio	2.27 ± 0.07 ^b	2.97 ± 0.07 ^a	2.95 ± 0.03 ^a	2.96 ± 0.06 ^a	0.002
Hepatosomatic index, %	2.15 ± 0.06 ^a	1.97 ± 0.04 ^{ab}	1.69 ± 0.01 ^{bc}	1.63 ± 0.00 ^c	0.001
Survival, %	93.75 ± 4.17	93.75 ± 4.17	95.83 ± 4.81	97.92 ± 4.17	0.933

Values are mean ± standard error of mean of four replicates. Superscripts letters in the same row indicate differences by Tukey's test ($P < 0.001$).

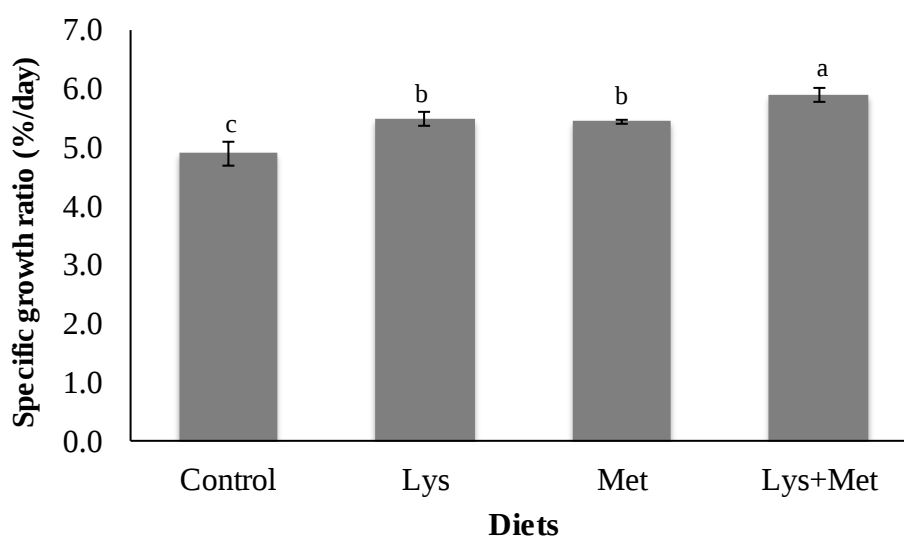


Figure 6. Specific growth ratio of Nile tilapia fingerling fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met). Values are mean ± standard error of mean of four replicates. Superscripts letters in the same row indicate differences by Tukey's test ($P < 0.001$).

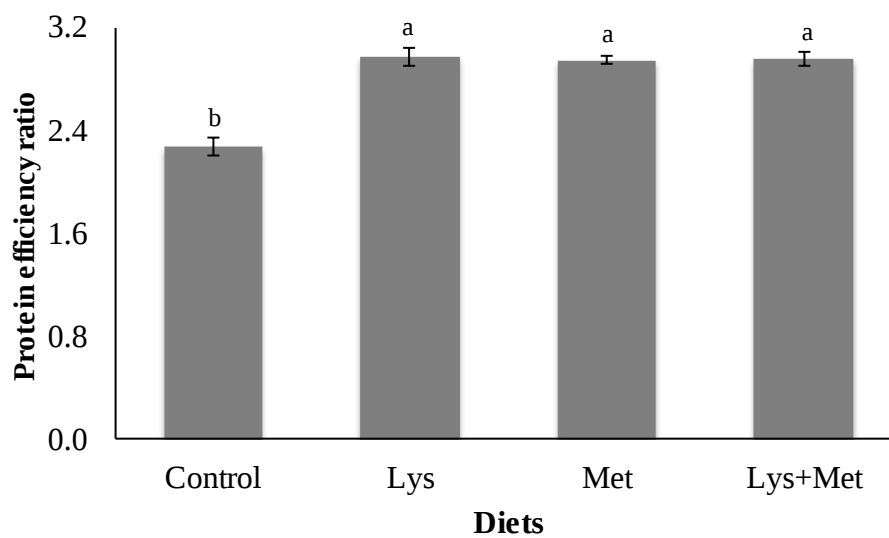


Figure 7. Protein efficiency ratio of Nile tilapia fingerling fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met). Values are mean $\pm$ standard error of mean of four replicates. Superscripts letters in the same row indicate differences by Tukey's test ($P < 0.001$).

Table 6. Body composition (g/100g, wet basis) of Nile tilapia fingerlings fed the experimental diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine and methionine

Variable	Diets				<i>P-value</i>
	Control	Lysine	Methionine	Lysine+Methionine	
Moisture	70.55 ± 0.17	69.99 ± 0.22	70.74 ± 0.09	69.77 ± 0.09	0.134
Crude protein	17.77 ± 0.15	18.01 ± 0.15	17.60 ± 0.09	18.31 ± 0.09	0.341
Crude lipids	10.34 ± 0.02 ^a	10.19 ± 0.07 ^a	9.52 ± 0.02 ^b	9.33 ± 0.02 ^b	<0.001
Ash	2.01 ± 0.01	2.02 ± 0.04	1.98 ± 0.03	2.09 ± 0.03	0.634

Values are mean ± standard error of mean of four replicates. Superscripts letters in the same row indicate differences by Tukey's test ($P < 0.001$).

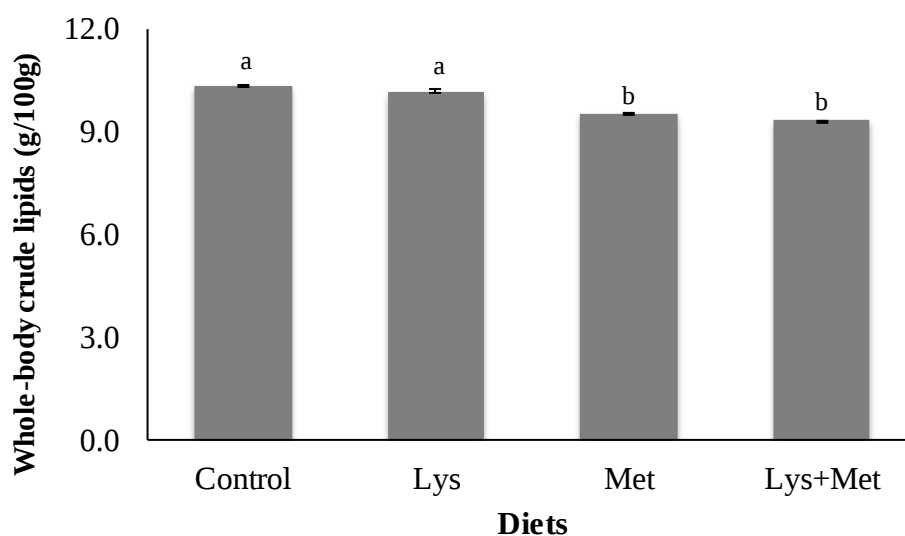


Figure 8. Whole-body crude lipids contents of Nile tilapia fingerling fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met). Values are mean $\pm$ standard error of mean of four replicates. Superscripts letters in the same row indicate differences by Tukey's test ($P < 0.001$).

3.2 Expression of muscle growth-related genes

The mRNA expression of *MyoD* and *myogenin* were significantly affected ($P < 0.001$) by dietary treatments evaluated (Figure 9). However, mRNA expression of *myostatin* was not affected ($P > 0.001$) by dietary lysine, methionine or combined methionine and lysine supplementation. The mRNA expression level in fish fed the control diet were lower ($P < 0.001$) than that observed in fish fed lysine and methionine supplemented diet. However, no differences ($P > 0.001$) in fish fed isolated lysine and methionine diets were observed. The mRNA expression of *myogenin* was higher in fish fed combined lysine and methionine supplemented diet compared to observed in fish other diets. However, expression of *myogenin* in fish fed control and isolated lysine supplemented diets was not affected. Similarly, the expression of *myostatin* was not affected by dietary treatments evaluated.

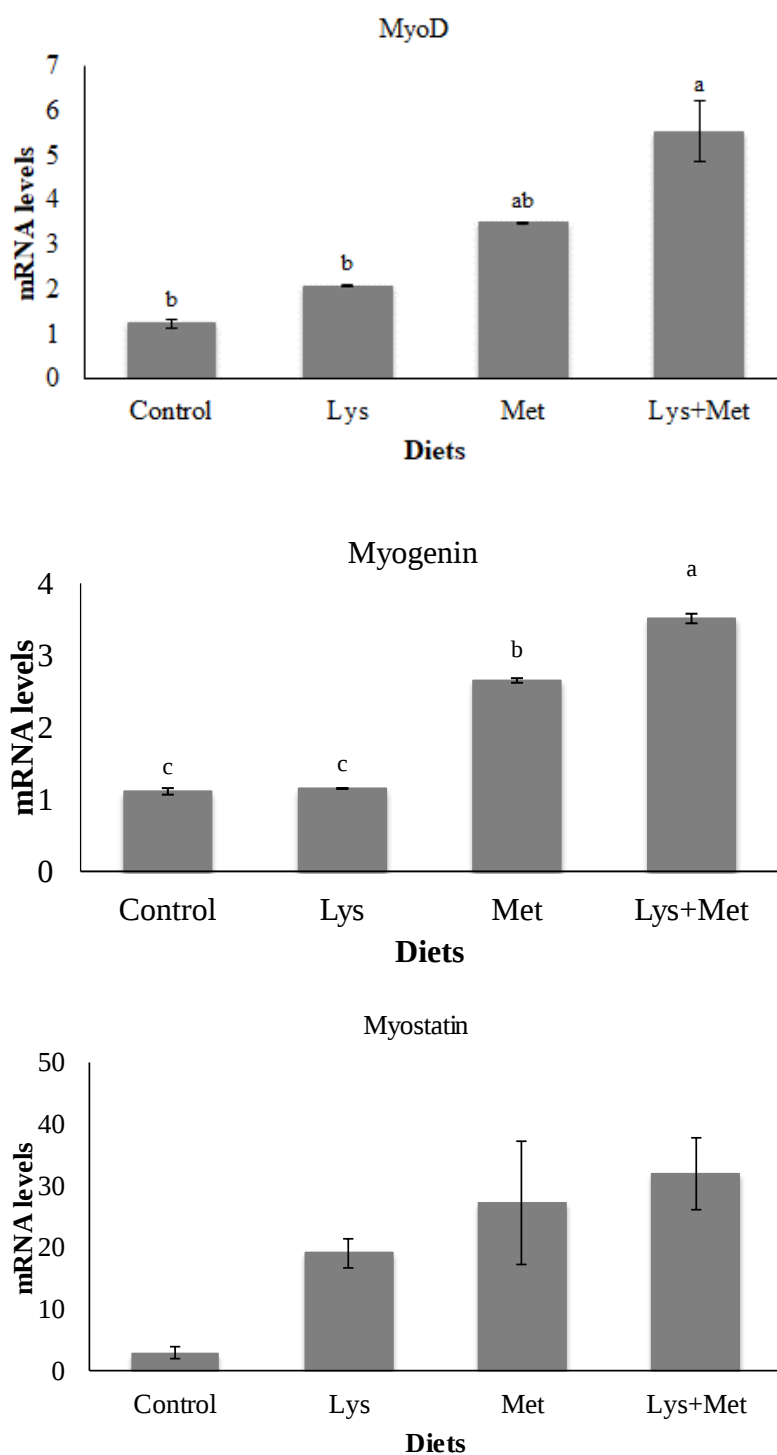


Figure 9. Real-time PCR quantification of *MyoD*, *myogenin* and *myostatin* performed on the white skeletal muscle tissue of Nile tilapia juveniles fed diets supplemented with lysine, methionine or combined lysine (Lys) and methionine (Met). Data are expressed in arbitrary units. Bars represent the mean $\pm$ SEM for each treatment (n = 6). Treatments that differed significantly at $P < 0.001$ are indicated by different letters (Tukey's test).

4. Discussion

No external pathological symptoms of cataract were visually observed in this study throughout the experiment. Cataract occurrence in lens attributed to methionine deficiency is more frequent in cold water fish species such as rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (COWEY et al., 1994) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) (BJERKAS et al., 2004) and remains poorly documented in tilapias.

In the present study, lysine and methionine showed as limiting amino acids for Nile tilapia fingerlings, respectively, showing their importance to elaborate well-balanced aquafeeds to reach maximum growth performance. However, fish fed diet containing combined lysine and methionine showed improved growth compared to observed in fish fed isolated lysine and methionine supplemented diets. In general terms, lysine and methionine are the first limiting amino acids for tilapias in corn and soybean meal, respectively, extended to their respective co-products (VIDAL et al., 2015; VIDAL et al., 2017). This finding has been confirmed for many fish species, regardless of food habits and size (HANSEN et al., 2011; KAMASZEWSKI et al., 2014; NIU et al., 2016). Because of the limiting presence, the dietary lysine requirements have been determined based on corn and/or co-products protein (CHENG et al., 2003; WANG et al., 2005; GATRELL et al., 2017), while the methionine requirement has been determined using soybean and co-products as main source of protein (WANG et al., 2016; ZHOU et al., 2011) for many fish species.

To improve corn-soybean based-diets, combined lysine and methionine has been considered in fish fed vegetable-based diets (GAN et al., 2012). The establishment of first or second limiting amino acids is attributed to the relative contribution of corn or soybean to the overall dietary protein content, as previously described in Atlantic Cod, *Gadus morhua* diets (HANSEN et al., 2011). The limiting presence of lysine and methionine in corn, soybean and respectively co-products to meet the dietary requirements based on total and available amino acids was recently published for Nile tilapia (VIDAL et al., 2015; VIDAL et al., 2017).

In recent years, establishment of dietary lysine and methionine requirements have been a major focus of fish nutrition research, especially due to the efforts to produce not only least-cost diets but high-performance diets, but also to sustain fish sustainability by improving dietary protein utilization (NIU et al., 2016) and reducing nitrogen excretion (ROLLAND et al., 2015). However, few studies were designed to evaluate the

combined effects of lysine and methionine supplementation for Nile tilapia fed all-vegetable diets. In this study, corn gluten meal was used to reduce quantitative contents of lysine; however, this feed ingredient is rich in methionine and resulted in lower quantitative deficiency of methionine in the control diet compared to observed for lysine.

High supplementation of soybean meal and lower supplementation of corn gluten meal would induce higher deficiency of methionine compared to lysine, and methionine might be the first limiting amino acid. However, soybean inclusion has been limited at 30 g/kg in commercial feeds for tilapia and corn meal and co-products has been extensively included in tilapia diets for economical and feed processing reasons. Soybean meal is widely known to its lower starch contents negatively associated to extrusion processing, even because of higher cost and alternative vegetable protein source has been suggested to increase the cost-effectiveness of tilapia culture. In addition, corn gluten meal is also considered due to its higher protein and lower crude fiber content, even possessing higher digestible energy and digestible protein content than soybean meal for tilapias (GUIMARÃES et al., 2008b).

Dietary supplementation of crystalline amino acids may provide new strategies to develop amino acid-balanced feeds to improve profitability of the aquaculture industry. The use of crystalline amino acids to formulated aquatic feed is an increasingly practice in formulated feed and has been extensively used to determine lysine and methionine requirements of fish. The effectiveness of crystalline lysine was demonstrated to be not different from protein-bound lysine in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (NGUYEN and DAVIS, 2016). Similarly to observed in the present study, the efficiency of combined crystalline lysine and methionine on growth, feed conversion ratio and protein efficiency ratio was found in Chinese sucker (YUAN et al., 2011).

For precision amino acids supplementation, the knowledge of the amino acid content and availability from feeds, and also nutritional requirements of fish must be established. In recent years, amino acids contents and availability of feeds have been determined for Nile tilapia (GUIMARÃES et al., 2008a, 2008b; VIDAL et al., 2015; VIDAL et al., 2017) avoiding elaborating more precisely diets based on available amino acids data. Determining the lysine and methionine requirements are also mandatory to elaborate well-balanced diets because of the requirements is quite variable among fish species and size. This approach may be verified in many studies, where the dietary lysine was found be 20.7 g/kg (55.4 g/kg of crude protein) for grass carp

Ctenopharyngodon idella (WANG et al., 2015), 28.3 g/kg (55.6 g/kg of crude protein) for grouper *Epinephelus coioides* (Luo et al., 2006), 25.0 g/kg (50.0 g/kg of crude protein) in turbot, *Scophthalmus maximus* (PERES and OLIVA-TELES, 2014), 31.7 g/kg (73.5 g/kg of crude protein) dusky kob, *Argyrosomus japonicus* (ADESOLA et al., 2017). Similarly, large variations of the dietary methionine has also been described for fish, described to be 17.6 g/kg (26.7 g/kg of crude protein) for Arctic char, *Salvelinus alpinus* (Simmons et al., 1999), 14.9 g/kg (29.8 g/kg crude protein) for Japanese flounder (ALAM et al., 2001), 11.9 g/kg (26.4 g/kg of crude protein) for Cobia, *Rachycentron canadum* (ZHOU et al., 2008), 14.1 g/kg (32.0 g/kg of crude protein) for Chinese sucker (CHU et al., 2014), and 14.3 g/kg (34.8 g/kg of dietary crude protein) for *Pseudobagrus ussuriensis* (WANG et al., 2016). On the other hand, the dietary lysine requirements of Nile tilapia is well-established at 14.1 g/kg (50.0 g/kg of crude protein) (SANTIAGO and LOVELL, 1988) to 14.6 g/kg (58.0 g/kg of crude protein) (MICHELATO et al., 2016a), while the dietary methionine has been well-established at 7.5 g/kg (26.8 g/kg of crude protein) for maximum growth (SANTIAGO and LOVELL, 1988).

In the present study, whole-body moisture and protein content were unaffected by dietary treatments evaluated. However, hepatosomatic index and whole-body lipids were affected by lysine and methionine supplementation, similarly to observed in Atlantic cod fed plant-based diets supplemented with crystalline amino acids (HANSEN et al., 2011).

Lysine and methionine acts as a precursor in the biosynthesis of carnitine, which is involved in the transport of fatty acids through the mitochondria membrane (WALTON et al., 1984). It is shown in some fish species that lysine deficiency can lead to reduced β -oxidation and increased storage of lipid in the liver, and consequently higher hepatosomatic index (PERES and OLIVA-TELES, 2014) and whole-body lipids (SARDAR et al., 2009; ZHOU et al., 2010). However, other studyie showed that lysine and methionine supplementation resulted in no effect on whole-body lipid (GAN et al., 2012). These disagreements may be related to differences in fish species and size, diet formulation and feeding regimes used.

In the present work, the expressions of MyoD, myogenin and myostatin were affected by dietary treatments. To date, this is the first mention of experiment evaluating expression of muscle growth-related genes of Nile tilapia fingerlings fed combined lysine and methionine diets. In the present study, fish fed combined lysine and

methionine supplemented diet shower higher expression of *MyoD* and *myogenin* mRNA levels compared to fish fed other diets, indicating a high rate of satellite cell proliferation and differentiation related with hyperplastic and hypertrophic active process in muscle growth (LEVESQUE et al., 2007). Moreover, in this study, *myostatin* mRNA levels in fish fed combined lysine and methionine diets was affected by dietary treatments. In this study, the relative expression of *myostatin* was affect by dietary treatments evaluated, in agreement to observed in fish fed to graded levels of feed intake (NEBO et al., 2013) and also described in fish submitted to changes in dietary macronutrients such as protein source (ALAMI-DURANTE et al., 2010; ULLOA et al., 2013) and nucleotides (ASADUZZAMAN et al., 2017). However, similarly to observed in this study, no effects of graded histidine levels on myostatin expression level was observed in Nile tilapia (MICHELATO et al., 2016b). During muscle growth, *myostatin* is associated with the inhibition of myoblasts and satellite cells proliferations in a quiescent and undifferentiated state (WATABE, 2001). This hypothesis was previously demonstrated in Nile tilapia after fasting conditions. After refeeding, the levels of *MyoD* increased whereas an increasing in *myostatin* mRNA expression occurred (NEBO et al., 2013).

In recent years all-vegetable protein ingredients have been proposed to elaborate commercial diets for tilapias. Fish meal has been substituted by many vegetable ingredients with consequent inclusion of crystalline amino acids to meet the dietary requirement and reach the ideal pattern of amino acids. Among all essential amino acids, lysine and methionine are considered the most limiting amino acids. In this work, to improve crystalline amino acids utilization, fish were hand fed four times a day to minimize crystalline amino acids leaching and enhance utilization by fish. Crystalline amino acids are absorbed shortly after feeding compared to protein-bound amino acids (MURAI et al., 2002). Increased feed frequency was adopted to minimize asymeric absorption and utilization of dietary amino acids.

5. Conclusion

In conclusion, combine lysine and methionine affected growth performance and also validated by expression of muscle growth-related genes and must be considered to elaborate well-balanced diets based on vegetable ingredients for tilapias.

6. Acknowledgments

The authors wish to thank to Ajinomoto do Brazil – Animal Nutrition Division for the partial financial support to carry out this study. We also thank the Fundação Araucária to funded this work.

7. References

- AGUIAR, D.H. et al. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Jounal of Fish Biology**. V. 67, p. 1-12, 2005.
- AGUIAR, D.H.; BOCK, C.; PADOVANI, C.R.; DAL PAI-SILVA, M. MyoD, Myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquac. Res.**, v. 39, 1673–1679, 2008.
- ABIMORAD, E.G.; CASTELLANI, D. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari do rabo amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. **Bol. Inst. Pesca**, v.37, n.1, p.31-38, 2011.
- AHMED, I.; KHAN, M.A. Dietary histidine requirements of fingerling Indian major carp (*Cirrhinus mrigala*). **Aquac. Nutr.**, v. 11, p. 359-366, 2005.
- AKIYAMA, T.; ARAI, S.; MURAI, T.; NOSE, T. Threonine, histidine and lysine requirements of chum salmon fry. **B. Jnp. Soc. Sci. Fish**, v. 51, p. 635-639, 1985.
- AKIYAMA, T.; OOHARA, I.; YAMAMOTO, T. Comparison of essential amino acid requirements with A/E ratio among fish species. **Jnp. Soc. Sci. Fish**, v. 63, p. 963–970, 1997.
- ALAM, G. L.; PARKINSON, S.; BOOTH, M. A.; STONE, D. A. J.; ROWLAND, S. J.; FRANCES, J.; WARNER-SMITH, R. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. **Aquaculture**, Amsterdam, v.186, n.3-2, p.293-310, 2001.
- ALAMI-DURANTE, H.; WRUTNIAK CABELLO, C.; KAUSHIK; S.J., MÉDALE, F. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 156, p. 561–568, 2010.
- ALMEIDA, F.L.A.; CARVALHO, R.F.; PINHAL, D.; PADOVANI, C.R.; MARTINS, C.; DAL PAI-SILVA, M. 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**, p. 1306–1311, 2008.
- AOAC. (Association of official analytical chemists) **Official Methods of Analysis of AOAC international**. 18th. ed. AOAC International, Gaithersburg, Md, 2005.
- BANCROFT, J.D.; STEVEN, A. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd ed. **Churchill Livingstone**, New York, 1990.

BARROS, M.M.; FALCON, D.R.; ORSI, R.O.; PEZZATO, L.E.; FERNANDES-JR., A.C.; GUIMARÃES, I.G.; FERNANDES-JR., A.; PADOVANI, C.R.; SARTORI, M.M. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 39, p. 188-195, 2014.

BERKES, C.A.; TAPSCOTT, S.J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 585-595, 2005.

BISMUTH, K.; RELAIX, F. Genetic regulation of skeletal muscle development. **Exp. Cell Res.**, v. 316, p. 3081-3086, 2010.

BOMFIM, M.A.D.; LANNA, E.A.T.; DONZELE, J.L. *et al.* Níveis de lisina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1-8, 2010.

CAMPOS, C.; VALENTE, L.M.P.; BORGES, P.; BIZUAYEHU, T.; FERNANDES, J.M.O. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegale sole (*Solea senegalensis* Kaup). **J. Exp. Biol.**, v. 213, p. 200-209, 2010.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Assist. J.**, v. 50, p. 550-552, 1944.

COWEY, C.B. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. **Aquaculture**, v. 124, p. 1 – 11, 1994.

DAL PAI, V.; DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, E.D.; FUJIHARA, C.Y.; GREGÓRIO, E.A.; CURI, P.R. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). **Anat. Histol. Embriol.**, v. 29, p. 283-289, 2010.

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.H. **Muscle Biopsy: A Modern Approach**. Saunders, London, 1973.

ENCARNAÇÃO, P.; LANGE, C.; RODEHUTSCORD, M.; HOEHLER, D.; BUREAU, W.; BUREAU, D.P. Diet digestible energy content affects lysine utilization, but not dietary lysine requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for maximum growth. **Aquaculture**, v. 235, p. 569–586, 2004.

FARHAT, K.M.A. Effects of varying levels of dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition in fingerlings stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*). **Aquaculture**, v. 404-405, p. 130-138, 2013.

GAN, L.; ZHOU, L.-L.; LI, X.-X.; YUE, Y.-R. Dietary leucine requirement of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 1040–1046, 2012.

GATLIN III, D. M.; BARROWS, F. T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T. G.; HARDY, R. W.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, Å.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E. J.; STONE, D.; WILSON, R.; WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, New York, v. 38, n. 6, p. 551-579, 2007.

GAYLORD, T. G.; BARROWS, F. T.; RAWLES, S. D.; LIU, K.; BREGITZER, P.; HANG, A.; OBERT, D. E.; MORRIS, C. Apparent digestibility of nutrients and energy in extruded diets from cultivars of barley and wheat selected for nutritional quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 306–312, 2009.

GUIMARÃES, I. G.; FALCON, D. R.; SCHICH, D.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1397–1402, 2009.

GUIMARÃES, I. G.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; TACHIBANA, L. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 781–789, 2008.

GOLDENFARD P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Am. J. Clinic. Path.**, v. 56, p. 35-39, 1971.

HAN, Y.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S. Interactive effects of dietary arginine and histidine on the performances of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) juveniles. **Aquaculture**, v. 414-415, p. 173-182, 2013.

HELLAND, S.; HELLAND, B.G. Dietary threonine requirement of Atlantic salmon smolts. **Aquaculture**, v. 321, p. 230–236, 2011.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary haematology**. 4th ed. Philadelphia: Lea e Febiger. 1221p, 1986.

JOHANSEN, K.A.; OVERTURF, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Mar. Biotechnol.**, v. 7, p. 576–587, 2005.

KANJANAWORAKUL, P.; SRISAPOOME, P.; SAWATDICHAIKUL, O.; POOMPUANG, S. cDNA structure and the effect of fasting on myostatin expression in walking catfish (*Clarias macrocephalus*, Günther 1864). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 41, p. 177-191, 2015.

KHAN, M.A.; ABIDI, S.F. Optimum histidine requirement of fry African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). **Aquac. Res.**, v. 40, p. 1000-1010, 2009.

KHAN, M.A.; ABIDI, S.F. Dietary histidine requirement of Singhi, *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch). **Aquac. Res.**, v. 45, p. 1341–1345, 2014.

LEE, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 61-86, 2004

LEVESQUE, H.M.; SHEARS, M.A.; FLETCHER, G.L.; MOON, T.W. Myogenesis and muscle metabolism in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) made transgenic for growth hormone. **J. Exp. Biol.**, v. 211, p. 128–137, 2007.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. New developments in fish amino acids nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino acids**, v. 37, p. 43-53, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MAI, K.L. et al. Dietary lysine requirement of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 258, p. 535-542, 2006.

MANCEAU, M.; GROS, J.; SAVAGE, K.; THOMÉ, V.; MCPHERRON, A.; PATERSON, B.; MARCELLE, C. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. **Genes Dev.**, v. 22, p. 668–681, 2008.

MEHRIM, A.I. Physiological, biochemical and histometric responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) by dietary organic chromium (chromium picolinate) supplementation. **J. Adv. Res.**, v. 5, p. 303-310, 2014.

MICHELATO, M.; FURUYA, W.M.; GRACIANO, T.S., Digestible methionine + cystine requirement for Nile tilapia from 550 to 700 g, **R. Bras. Zootec.**, v. 42, n. 1, p. 7-12, 2013.

MICHELATO, M.; VIDAL, L. V. O.; XAVIER, T. O.; GRACIANO, T. G.; MOURA, L. B.; FURUYA, V. R. B.; FURUYA, W. M. Dietary threonine requirement to optimize protein retention and fillet production of fast-growing Nile tilapia. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, p. 759–766, 2016a.

MICHELATO, M.; ZAMINHAN, M.; BOSCOLO, W. R.; NOGAROTO, V.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; FURUYA, V. R. B.; FURUYA, W. M. Dietary histidine requirement of Nile tilapia juveniles based on growth performance, expression of muscle-growth-related genes and haematological responses. **Aquaculture**, v. 467, p. 63–70, 2018.

NEBO, C.; PORTELLA, M.C.; CARANI, F.R.; ALMEIDA, F.L.A.; PADOVANI, C.R.; CARVALHO, R.F.; DAL PAI-SILVA, M. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 164, p. 268–274, 2013.

NRC (National Research Council). **Nutrient requirements of fish and shrimp**. National Academy Press, Washington, DC, USA, 2011.

PERES, H.; COSTAS, B.; PEREZ-JIMENEZ, A.; GUERREIRO, I.; OLIVA-TELES, A. Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 31, p. 65-71, 2014.

RAYNER, C. Protein hydrolysis of animal feeds for amino acid content. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, p. 722–725, 1985.

REMO, S.C.; HEVROY, E.M.; OLSVIK, P.A.; FONTANILLAS, R.; BRECK, O.; WAAGBO, R. Dietary histidine requirement to reduce the risk and severity of cataracts is higher than the requirement for growth in Atlantic salmon smolts, independently of the dietary lipid source. **Br. J. Nutr.**, v. 111, p.1759-1772, 2010.

RODEHUTSCORD, M.; BECKER, A.; PACK, M.; PFEFFER, E. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. **J. Nutr.**, v. 127, p.1166-1175, 1997.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Muscle Development and Growth. (Johnston, I.A. ed.). p. 103–139. **Academic Press**, London, 2001.

SANTIAGO, C.B.; LOVELL, R.T. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. **J. Nutr.**, v. 118, p. 1540–1546, 1988.

ULLOA, P.E.; PEÑA, A.A.; LIZAMA, C.D.; ARANEDA, C.; ITURRA, P.; NEIRA, R.; MEDRANO, J.F. **Growth response and expression of muscle growth-related candidate genes in adult zebrafish fed plant and fishmeal protein-based diets.** V. 10, p. 99-109, 2013.

VALENTE, L.M.P.; ROCHA, E.; GOMES, E.F.S. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast and slow growing strains of rainbow trout. **J. Fish Biol.**, v. 55, p. 675–691, 1999.

WAAGBO, R.; TROBE, C.; KOPPEW.; FONTANILLAS, R.; BRECK, O. Dietary histidine supplementation prevents cataract development in adult Atlantic salmon (*Salmo salar*), in seawater. **Brit. J. Nutr.**, v. 104, p. 1460-1470, 2010.

WANG, M.; LU, M. Tilapia polyculture: A global review. **Aquaculture Research**, New York, v.47, n.8, p.1-12, 2015.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. **Academic Press London**, p. 19-41, 2001.

WILSON, R.P.; POE, W.E.; ROBINSON, E.H. Leucine, isoleucine, valine and histidine requirements of fingerling channel catfish. **J. Nutr.**, v. 110, p. 627-633, 1980.

WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematol.**, v. 51, p. 32-49, 1934.

ZEHRA, S.; KHAN, M.A. Dietary histidine requirement of fingerlings (*Catla catla*) based on growth, protein gain, histidine gain, RNA/DNA ratio, haematological indices and carcass composition. **Aquac. Res.**, p. 1-12, 2014.

ZEITOUN, I.H.; ULLREY, D.E.; MAGEE, W.T.; GILL, J.L.; BERGEN, W.G. Quantifying nutrient requirements of fish. **J. Fish. Res. Board Can.**, v. 33, p. 167–172, 1976.

ZHOU, X.Q.; ZHAO, C.R.; JIANG, J. *et al.* Dietary lysine requirement of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). **Aquacul. Nutrit.**, v. 14, p. 381-386, 2008.