

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Danilo Henrique Aguiar

MORFOLOGIA E CRESCIMENTO DO TECIDO MUSCULAR ESTRIADO EM
LARVAS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) ALIMENTADAS COM
DIETAS SUPLEMENTADAS COM LISINA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

D Silva

DANILO HENRIQUE AGUIAR

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maéli Dal Pai Silva



UNIDADE	FL
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Ag 93m
V	EX
TOMBO BC/	61217
PROC.	16-11-04
C ☐	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	18-11-04
1º CPD	

316 Id 335718

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Ag93m**Aguiar, Danilo Henrique**

Morfologia e crescimento do tecido muscular estriado em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas suplementadas com lisina / Danilo Henrique Aguiar. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Maeli Dal Pai Silva

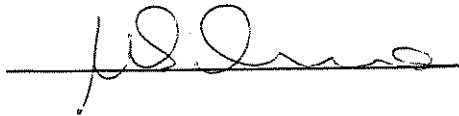
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Morfologia. 2. Músculo. 3. Crescimento. 4. Tilápia(Peixe). I. Silva, Maeli Dal Pai. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

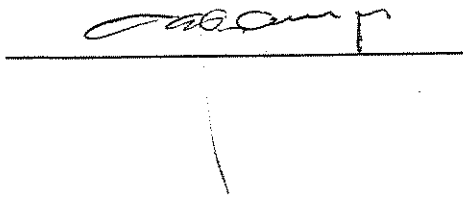
Campinas, 30 de agosto de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maeli Dal Pai Silva (Orientadora)



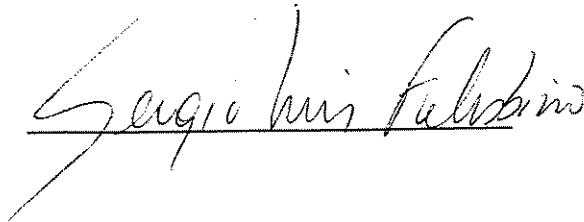
Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos



Prof. Dr. Luis Edivaldo Pezzato



Prof. Dr. Sergio Luis Felisbino



Dedico este trabalho...

*Aos meus pais Laura de Fátima Montanha Aguiar e
José Fernando Aguiar que sempre estão somando todos
os seus esforços e dedicação para proporcionar que
minha jornada seja contemplada de amor e paz.*

Agradecimentos

À DEUS pelo dia-a-dia de luz, amor e paz.

Aos meus pais, Fernando e Laura, que sempre estão ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Andreo, pelo apoio e amizade divididos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva pelo respeito, confiança e dedicação em nosso dia-a-dia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro. Proc. 02/10550-3.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À FUNDUNESP pelo apoio financeiro. Proc. 00101/03-DFP.

Aos docentes de todas as disciplinas cursadas nos programas de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp e aos professores do Departamento de Morfologia da UNESP, por contribuírem para minha formação acadêmico-científica.

Aos professores Luiz Edivaldo Pezzato e Margarida M. Barros pelo apoio no desenvolvimento das atividades experimentais.

Ao professor Gerson Eduardo Rocha Campos pelo ensino e acompanhamento de técnicas experimentais.

Ao professor Carlos Roberto Padovani, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Vitalino Dal Pai por me conceder a oportunidade de realizar estágios com a professora Maeli, pelos ensinamentos transmitidos e por todas as conquistas no campo da Morfologia.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP.

Às secretárias do Departamento de Morfologia, Luciana e Patrícia, e do Departamento de Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, Liliam, pela atenção e ótimo desempenho profissional.

Aos meus colegas, Robson, Fernanda, Francis, Justulin e Spike, entre muitos outros, que compartilharam de muitas alegrias.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Sumário

I. RESUMO.....	08
II. INTRODUÇÃO.....	09
III. OBJETIVOS.....	17
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
V. ARTIGO.....	24
VI. CONCLUSÕES.....	56

I. RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a morfologia e o crescimento do tecido muscular estriado esquelético em larvas de tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com lisina. Foram utilizados cinco tratamentos: quatro contendo níveis crescentes de suplementação do aminoácido lisina – grupo lisina (T1= 0,0; T2= 1,1; T3= 1,7; T4= 4,0%) e um com dieta comercial (T5). Decorridos 30 dias, os peixes foram sacrificados e amostras de músculo foram retiradas e congeladas em n-hexano resfriado em nitrogênio líquido (-159°C). Cortes histológicos obtidos em criostato foram submetidos à coloração HE, às reações NADH-TR, mATPase, após pré incubação ácida e alcalina e à reação imunohistoquímica PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular). Os peixes que receberam dieta comercial (T5) obtiveram maior crescimento comparado aos peixes do grupo lisina (T1-T4). Não houve diferença no padrão morfológico e histoquímico (NADH-TR e mATPase) das fibras musculares em todos os tratamentos analisados. A análise morfométrica (número, área miotomal de contagem e diâmetro das fibras musculares vermelhas e brancas) não apresentou diferença entre os tratamentos do grupo lisina. O tratamento com dieta comercial (T5) apresentou valores significativamente maiores nesses parâmetros. Em todos os tratamentos, o padrão de distribuição dos diâmetros das fibras nos compartimentos superficial (vermelho) e profundo (branco) foi muito variável: no grupo lisina, a frequência das fibras vermelhas com diâmetro $\leq 8\mu\text{m}$ foi maior, enquanto que em T5 a frequência das fibras vermelhas foi maior entre os diâmetros de 16 a $24\mu\text{m}$. Em relação às fibras brancas, no grupo lisina, a maioria das fibras apresentou diâmetro entre 8 a $16\mu\text{m}$, e em T5, a maioria das fibras apresentou diâmetro acima de $24\mu\text{m}$. A proliferação celular foi mais intensa nos tratamentos do grupo lisina, predominando o crescimento hiperplásico em detrimento do crescimento hipertrófico. O crescimento muscular em T5 se deu pela associação dos processos hiperplásico e hipertrófico. Os resultados sugerem que o aminoácido lisina suplementado não foi

utilizado na síntese de proteínas miofibrilares do tecido muscular da tilápia do Nilo no estágio analisado.

II. INTRODUÇÃO

Nos últimos cinquenta anos as tilápias, principalmente as da espécie *Oreochromis niloticus*, pertencentes à Família Cichlidae, naturais da África, Israel e da Jordânia, tiveram sua distribuição expandida para todos os continentes. Isto ocorreu em função de seu potencial para a aquicultura intensiva e para a piscicultura de subsistência em países em desenvolvimento, por apresentar carne de excelente sabor, com boas características organolépticas, por apresentar filé sem espinhos intramusculares em forma de “Y”, de fácil filetagem e boa aceitação no mercado consumidor (Hildsorf, 1995; Lovshin, 1997).

Trata-se de uma das espécies mais adequadas para criação, desde regimes extensivos até superintensivos, estando em ascensão no mercado mundial (Torloni, 1984; Berman, 1997; Fitzsimmons, 1998). A produção de tilápias para a comercialização triplicou nos últimos dez anos, perdendo em produção somente para as carpas e os salmões. A demanda tem aumentado com o crescimento paralelo da pecuária e da avicultura, pois, este peixe é utilizado como fonte de proteínas para estes animais, além de contribuir como alimento em potencial e alternativo para a população (Tacon, 1993; 1997).

Segundo Cantelmo (1989), o desenvolvimento e a rentabilidade do cultivo intensivo de peixes dependem da utilização de rações que contenham todos os nutrientes essenciais, administradas em quantidade suficiente para garantir o

crescimento ótimo, visando o desenvolvimento adequado do tecido muscular estriado, produto final desejado, culminando na obtenção de carne saborosa e que possa atender com êxito o mercado consumidor.

O tecido muscular nos peixes (40 a 75% do peso total) é constituído por várias unidades morfofuncionais repetidas, os miômeros, que estão inseridos por curtos tendões em bainhas de tecido conjuntivo e adiposo, os miosseptos. Essa musculatura está distribuída em compartimentos ou camadas, referidas como vermelha, intermediária e branca. A camada muscular vermelha ou superficial está localizada abaixo da derme, como uma camada uniforme ao longo de todo o corpo do animal ou distribuída mais localmente, com aspecto triangular, na região da linha lateral (Alexander, 1969; Dal Pai Silva et al., 1995a e b). As fibras desta camada apresentam pequeno diâmetro e elevado teor de enzimas da cadeia transportadora de elétrons e do ciclo do ácido cítrico, além de apresentarem intensa vascularização e elevada quantidade de mioglobina e mitocôndrias. A camada muscular branca ou profunda representa a maior parte da massa muscular, com predominância de fibras de maior diâmetro, reduzida atividade oxidativa e pouca mioglobina. Entre as camadas de musculatura vermelha e branca, está a camada intermediária, em menor proporção, que apresenta características intermediárias (Kilarski, 1990; Johnston, 1999).

As características do metabolismo e contratilidade destas fibras são diferentes, sendo a musculatura branca composta principalmente por fibras que utilizam a energia proveniente da glicólise anaeróbica, sendo utilizadas na realização de movimentos rápidos (de explosão) e de aceleração. As fibras da

musculatura vermelha são responsáveis pelas atividades de sustentação prolongada, utilizando energia produzida pela glicólise aeróbica e lipólise (Kilarski, 1990; Johnston, 1999). As fibras intermediárias possuem características intermediárias quanto à intensidade das reações que revelam o metabolismo e a contratilidade, estando relacionadas com vários tipos de movimentos, utilizando energia proveniente dos dois processos.

Nos peixes são descritas três fases durante a formação do tecido muscular estriado, que podem ser variáveis na dependência da espécie estudada (Raamsdonk et al., 1983; Rowleron & Veggetti, 2001). A primeira fase resulta na formação de fibras musculares embrionárias a partir de mioblastos que surgem antes da eclosão, como fonte de células para o crescimento. Nesta fase, ocorre aumento na área ocupada por tecido muscular, decorrente da hipertrofia dessas fibras. Na segunda fase do crescimento, observada na fase larval, aparecem as zonas germinais de proliferação de mioblastos, localizadas nos ápices dorsal (epiaxial) e ventral (hipoaxial) da musculatura (Veggetti et al., 1990; Brooks & Johnston, 1993; Rowleron et al., 1995). A terceira fase da miogênese, observada nas fases de crescimento juvenil e/ou adulta, envolve população de células progenitoras miogênicas ou mioblastos indiferenciados (Koumans et al., 1994; Johnston et al., 1995; 1998; Rowleron et al., 1995), análogos às células satélites ou mioossatélites, descritas em mamíferos (Mauro, 1961). Na fase adulta dos peixes, essas células estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular, estando distribuídas uniformemente ao longo das fibras musculares (Johnston et al., 1998). No entanto, nas fases larval e juvenil,

mioblastos indiferenciados podem ser observados no tecido conjuntivo, entre as fibras musculares diferenciadas (Veggetti et al., 1990; Koumans & Akster, 1995; Stoiber & Sanger, 1996; Fauconneau & Paboeuf, 2001).

No período pós-embriônico, o crescimento do tecido muscular nos peixes, ocorre pela associação dos processos de hipertrofia (aumento do diâmetro das fibras musculares) e hiperplasia (recrutamento de novas fibras musculares) a partir dos mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites (Johnston, 1999; Dal Pai Silva et al., 2003a, b). A proliferação e a diferenciação dos mioblastos durante o crescimento é controlada por vários fatores de regulação miogênica (Watabe, 2001). Quando ativados por esses sinais celulares, os mioblastos proliferam, se diferenciam e os núcleos podem ser internalizados às fibras existentes culminando assim com o aumento do diâmetro ou área das fibras. No crescimento hiperplásico, os mioblastos indiferenciados agregam-se à superfície das fibras pré-existentes, formam miotubos e estes se separam originando novas fibras musculares. Assim, quando a hiperplasia está ocorrendo, observa-se um mosaico de fibras com diferentes diâmetros (fibras grandes e pequenas associadas), melhor observado nas musculaturas branca e intermediária (Johnston, 1999).

A análise do crescimento muscular por hiperplasia, que ocorre principalmente durante as fases larval e juvenil, tem despertado o interesse em estudos que valorizam o tamanho final dos peixes com finalidade comercial. A relativa contribuição da hiperplasia e da hipertrofia no crescimento muscular tem sido estudada em muitas espécies e foi verificado que nas espécies de crescimento rápido e que atingem um tamanho final maior, o crescimento

hiperplásico persiste por um período mais prolongado (Kiessling et al., 1991; Valente et al., 1999; Rowleron & Veggetti, 2001). Por outro lado, em espécies que atingem um tamanho final menor, o crescimento muscular por hiperplasia cessa rapidamente e a hipertrofia mostrou-se como o mecanismo de crescimento mais efetivo (Veggetti et al., 1993; Koumans & Akster, 1995).

O padrão de crescimento muscular nos peixes pode ser influenciado por vários fatores extrínsecos como a variação de temperatura, o regime alimentar e a composição da dieta (Alami-Durante et al., 1997; Assis et al., 2004). A utilização de dieta para peixes, em condições sub-ótimas, pode comprometer o recrutamento celular, levando a alterações na celularidade, nas características morfofisiológicas e fenotípicas do tecido muscular, podendo alterar a qualidade do filé (Alami-Durante et al., 1997; Fauconneau et al., 1993).

Na alimentação ocorre aumento na taxa metabólica, a qual é referida como ação dinâmica específica (SDA) (Jobling, 1994). Acredita-se que este fenômeno resulta, em grande parte, da estimulação da síntese protéica induzida pela elevação na concentração de aminoácidos livres (Brown & Cameron, 1991a,b; Houlihan et al., 1995). Este aumento da taxa metabólica influenciada pela alimentação, pode ativar mioblastos indiferenciados, processo regulado por vários fatores de crescimento e pelos fatores reguladores miogênicos, que restabelecem o ciclo de divisão celular e coordenam a proliferação e diferenciação destas células (Brodeur et al., 2002).

Durante o desenvolvimento larval e pós-larval, a transição da alimentação endógena para a exógena reflete o acentuado crescimento da massa muscular,

decorrente dos processos de hipertrofia e hiperplasia. A utilização de dietas não adequadas nesse período, pode afetar a sobrevivência e influenciar o crescimento somático (Koumans & Akster, 1995). Esses fatos têm despertado grande interesse na aquicultura comercial, que tem por objetivo formular alimentos alternativos que supram as necessidades dos peixes e favoreçam o crescimento e a melhoria de qualidade da carne (Johnston, 1999).

Nos primeiros estágios de desenvolvimento dos peixes, o pool de aminoácidos do saco vitelínico é utilizado como combustível metabólico e como matéria-prima para a síntese de proteínas, contribuindo com o aumento da massa muscular inicial (Ronnestad, 1993; Thorsen et al., 1993; Ronnestad et al., 1996).

A primeira alimentação exógena fornecida aos peixes torna-se importante durante o crescimento larval, pois fornece aminoácidos essenciais não sintetizados pelo organismo (Wilson, 1989).

Alguns trabalhos têm mostrado que os peixes não possuem exigência verdadeira de proteína, mas de um adequado balanceamento de aminoácidos, definido como proteína ideal, que possibilite elevar a retenção de proteínas na carcaça. A exigência de aminoácidos no cultivo de animais é influenciada por diferentes fatores: população (peso, sexo e genótipo), meio ambiente e estado de saúde. Na proteína ideal, cada aminoácido essencial é utilizado para performance, isto é, manutenção, produção e crescimento, além de contribuir para a produção de enzimas e de hormônios. Consequentemente, a aplicação de um perfil de proteína ideal na formulação da dieta é também uma ferramenta valiosa para

minimizar a excreção de nitrogênio, sem perda na performance durante o cultivo (Wilson, 1985).

Os aminoácidos são unidades formadoras das proteínas e da sua manutenção, sendo de fundamental importância na formação dos tecidos. Entre os aminoácidos essenciais, fundamentais para o crescimento e que o organismo não é capaz de sintetizar em quantidade suficiente para suprir suas necessidades, destacam-se a metionina, fenilalanina, treonina, histidina e a lisina (Devlin, 1997).

Para a confecção de dietas para peixes, entre os aminoácidos utilizados, a lisina foi eleita como aminoácido de referência sendo utilizado em grande proporção para a síntese de proteínas (Mack, 1998). No crescimento dos peixes, a lisina exigida é aquela necessária para ganho de peso quando incorporada em proteínas miofibrilares ou pode ser transformada em componente não-protéico importante na manutenção e no processo de regulação do metabolismo (Millward & Rivers, 1987). Segundo Santiago & Lovell (1988), o aminoácido lisina é fator limitante na alimentação dos peixes e a sua carência pode prejudicar o crescimento.

Chatzifotis et al. (1996), utilizando dois tratamentos com níveis distintos de lisina (10 e 14g de lisina/Kg de dieta), observou que peixes juvenis alimentados com 10g de lisina/Kg apresentaram baixo crescimento e baixa eficiência alimentar. Por outro lado, nos peixes alimentados com 14g de lisina/Kg, foi observada maior taxa de crescimento e de eficiência alimentar, além do aumento de proteínas e triglicerídeos no músculo. O método estatístico mostrou significativo efeito da lisina

no crescimento, ganho de peso, consumo alimentar e eficiência alimentar, reforçando a importância da lisina para o crescimento.

A quantidade de lisina necessária na dieta de peixes varia de acordo com a espécie, a formulação, tamanho e idade do peixe, com as diferenças genéticas e as condições da criação (Santiago & Lovell, 1988).

Na elaboração de uma ração, deve-se buscar o balanço nutricional dos nutrientes e aprimorar o processo de confecção para garantir as propriedades físicas desejáveis e o crescimento dos animais, principalmente em piscicultura, onde os custos com alimentação representam cerca de 70%. Assim, é de suma importância obter informações que possibilitem a formulação de rações que atendam às exigências das espécies em potencial, assim como o uso de técnicas de processamento que visem proporcionar melhor aproveitamento dos nutrientes, de forma a serem rapidamente consumidos e utilizados pelos animais, o que levaria à redução de custos de produção (NRC, 1993; Meer et al., 1995; Pezzato, 1995; Wilson, 1985).

Com a intensificação do cultivo de tilápias no Brasil, principalmente da espécie *Oreochromis niloticus*, seria promissora a fusão de estudos abrangendo a análise das características morfofisiológicas e da performance do crescimento muscular, associada às exigências nutricionais nos estágios iniciais de desenvolvimento, visando acrescentar informações que possam facilitar a exploração adequada dessa espécie.

III. OBJETIVOS

- Analisar a influência dos diferentes níveis de suplementação de lisina sobre o crescimento das fibras musculares estriadas;
- Caracterizar o crescimento hiperplásico ou hipertrófico como resultado da suplementação do aminoácido lisina;
- Determinar se a análise morfológica pode ser utilizada como ferramenta adequada para avaliar a plasticidade do músculo estriado em peixes, envolvendo exigências nutricionais.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A. M. & Bergot, P. (1997). Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth raye. *J. Fish. Biol.* 50, 1285-1302.
- Alexander, R. (1969). The orientation of muscle fibres in the myomeres of fish. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 49, 263-290.
- Assis, J.M.F., Carvalho R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A. & Dal Pai Silva, M. (2004). Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 237, 251-267.
- Berman, Y. (1997). Produccion intensiva de tilapia en agua fluyente. In: Simpósio Centroamericano De Acuicultura - Cultivo Sostenible De Camaron Y Tilapia, 4, Tegucigalpa. Anais. Honduras: *World Aquaculture Society*, pp.59-63.

- Brodeur, J.C., Peck, L.S. & Johnston, I.A. (2002). Feeding increases MyoD and PCNA expression in myogenic progenitor cells of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology* 60, 1475- 1485.
- Brooks, S. & Johnston, I.A. (1993). Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of myotomal muscle fibre types in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Mar. Biol.* 117, 501-513.
- Brown, C.R. & Cameron, J.N. (1991a). The induction of specific dynamic action in Channel catfish by infusion of essential amino acids. *Physiol. Zool.* 64, 276-297.
- Brown, C.R. & Cameron, J.N. (1991b). The relationship between specific dynamic action (SDA) and protein synthesis rates in the Channel catfish. *Physiol. Zool.* 64, 298-309.
- Cantelmo, O.A. (1989). Nutrição de peixe e aquicultura. In: Hernandez, A. (Ed). *Cultivo de colossoma*. Bogotá: Editora Guadalupe. p. 475.
- Chatzifotis, S., Takeuchi, T. & Seikai, T. (1996). The effect of dietary carnitine supplementation on growth of red sea bream (*Pagrus major*) fingerlings at two levels of dietary lysine. *Aquaculture* 147, 235-248.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V. & Mota, D. L. (1995a). Histochemical study of muscle fibre types in *Synbranchus marmoratus*. *Ann. Anat.* 177, 65-70.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V. & Mota, D. L. (1995b). Características morfológicas e histoquímicas do tecido muscular do *Synbranchus marmoratus*, com fenótipo I e II. *Rev. Bras. Biologia* 55, 685-691.

- Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R. F., Pellizzon, C. H. & Dal Pai, V. (2003a). Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell*, 35(3), 179-187.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E. M. S., Dal Pai, V. & Rodrigues, A. C. (2003b). Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Archive of Fishery And Marine Research* 50 (2), 149-160.
- Devlin, T.M. (1997). Manual de Bioquímica com correlações clínicas. Ed. Edgard Blücher, pp.1007.
- Fauconneau, B. & Paboeuf, G. (2001). Muscle satellite cells in fish. In: Johnston, I.A. Muscle Development and Growth, *Academic Press*, pp. 73-98.
- Fauconneau, B., Chmaitilly, J., Andre, S., Cardinal, M., Cornet, J., Vallet, J.L., Dumont, J.P. & Laroche, M. (1993). Characteristics of rainbow trout flesh: Chemical composition and cellularity of muscle and adipose tissues. *Sciences des Aliments* 13, 173-187.
- Fitzsimmons, K. (1998). O mercado de tilápia nas EUA. *Panor. Aquicultura* 8(45), 28-30.
- Hildsorf, A.W.S. (1995). Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca* 22, 73-87.
- Houlihan, D.F., Pedersen, B.H., Steffensen, J.F. & Brechin, J. (1995). Protein synthesis, growth and energetics in larval herring (*Clupea harengus*) at different feeding regimes. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 195-208.

- Jobling, M. (1994). Fish Bioenergetics. London: Chapman & Hall.
- Johnston, I.A. (1999). Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Johnston, I.A., Cole, N.J. & Abercromby, M. (1998). Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *J. Exp. Biol.* 201, 623-646.
- Johnston, I.A., Vieira, V.L.A. & Abereromby, M. (1995). Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring *Clupea harengus*. *J. Exp. Biol.* 198, 1389-1403.
- Kiessling, A., Storebakken, T. & Asgard, T., (1991). Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*O. Mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture* 93, 335-356.
- Kilarski, W. (1990). Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L.). *J. Fish Biol.* 36, 353-362.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A. & Witkan, A. (1994). Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Fish Biol.* 44, 391-408.
- Koumans, J.T.M. & Akster, H.A. (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A, 3-20.
- Lovshin, L.L. (1997). Tilápia farming: A Growing Worldwide Aquaculture Industry. In: Simpósio sobre Manejo e Nutrição de Peixes. Piracicaba. *Anais*. Piracicaba: CBNA, p. 137-164.

- Mack, S. (1998). Amino acids in broiler nutrition requirements and interrelations. In: Simpósio Internacional sobre nutrição de aves, Campinas. Anais. Campinas, São Paulo, Brasil, pp.69-86.
- Mauro, A. (1961). Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493-495.
- Meer, M.B., Machiels, M.A.M. & Verdegem, M.C.J. (1995). The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult. Res.* 26(12), 901-909.
- Millward, D.J., Rivers, J.P.W. (1987). The nutritional role of indispensable amino acids and the metabolic basis for their requirements. *Eur.J.Clin.Nutr.* 42, 367-393.
- National Research Council – NRC (1993). Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes. Washington: Academy Press. p.102.
- Pezzato, L.E. (1995). Alimentos convencionais e não-convencionais disponíveis para a indústria da nutrição de peixes no Brasil. In: Simpósio Internacional sobre Nutrição de Peixes e Crustáceos. Piracicaba. Anais.Piracicaba: CBNA,pp.34-52.
- Raamsdonk, W., Pool, C.W., Te Kronnie, G. (1983). Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Anat. Embryol.* 153, 137-155.
- Rønnestad, I. (1993). No efflux of free amino acids from yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *J. Exp.Mar.Bio.Ecol.* 167, 39-45.

- Rønnestad, I., Robertson, R.R. & Fyhn, H.J. (1996). Free amino acids and protein content in pelagic and demersal eggs of tropical marine fishes. In: MacKinlay, D.D., Eldridge, M. (Eds), *The Fish Egg*. American Fisheries Society, Physiology Section, Bethesda, pp.81-84.
- Rowlerson, A., Mascarello, F. & Radaelli, G. (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.). II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16, 223-236.
- Rowlerson, A. & Veggetti, A. (2001). Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. In: Johnston, I.A. *Muscle Development and Growth*, Academic Press, p. 103-140.
- Santiago, C.B. & Lovell, R.T. (1988). Amino acid requirement for growth of Nile tilapia. *J.Nutr.* 118, 1540-1546.
- Stoiber, W. & Sängler, A.M. (1996). An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibers in teleost fish. *Anat. Embryol.* 194, 569-579.
- Tacon, A.G.J. (1993). Feed ingredients for warmwater fish. Fish meal and other processed feedstuffs, FAO Fish. Circ. No.856, FAO, Rome, Italy, 64p.
- Tacon, A.G.J. (1997). Global trends in aquaculture and aquafeed production 1984-1995. In: *Aquafeed directory and buyers guide*, 1987/1998. pp.5-37.
- Torloni, C.E. (1984). Criação de tilápias. *A granja* 5, 44-46.
- Thorsen, A., Fyhn, H.J. & Wallace, R. (1993). Free amino acids as osmotic effectors for oocyte hydration in marine fishes. In: Walther, B.T., Fyhn, H.J.

(Eds), Physiology and Biochemistry of Larval Development. University of Bergen, pp. 94-98.

Valente, L.M.P., Rocha, E. & Gomes, E.F.S. (1999). Growth dynamics of white and red muscle fibers in fast and slow growing strains of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 55, 675-691.

Veggetti, A., Mascarello, F. & Scapolo, P.A. (1990). Hiperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*. An ultrastructural and morphometric study. *Anatomy and Embriology* 182, 1-10.

Veggetti, A., Mascarello, F. & Scapolo, P.A. (1993). Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish, *Poecilia reticulata*: a histochemical, imunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embryol.* 187, 353-361.

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

Wilson, R.P. (1985). Fish feed formulation and processing. In: Simpósio Internacional sobre Nutrição de Peixes e Crustáceos. Piracicaba. Anais. Piracicaba: CBNA, pp.53-68.

Wilson, R.P. (1989). Amino acids and proteins. In: J.E. Halver (Editor), Fish Nutrition. 2nd edn., Academic Press, New York, NY, pp.112-151.

**V. GROWTH CHARACTERISTICS OF SKELETAL MUSCLE TISSUE IN NILE
TILAPIA LARVAE (*Oreochromis niloticus*), FED ON A LYSINE
SUPPLEMENTED DIET**

¹Danilo H. Aguiar, ²Maeli Dal Pai-Silva

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP

Submetido para publicação na revista Journal of Fish Biology

Growth characteristics of skeletal muscle tissue in Nile tilapia larvae (*Oreochromis niloticus*), fed on a lysine supplemented diet

¹Danilo H. Aguiar, ²Maeli Dal Pai-Silva

¹Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP

Abstract:

The aim of the present study was to evaluate the effect of the lysine amino acid supplementation on the morphology and growth of the skeletal muscle tissue in larvae of Nile tilapia (*O. niloticus*). We used five treatments: four that received a diet with increasing levels of lysine supplementation - the lysine group (T1=0,0%; T2=1,1%; T3=1,7%; T4=4,0%) and one treatment that received a commercial diet (T5) during thirty days. The fish were sacrificed with MS-222 (3-Aminobenzoic acid ethyl ester - Sigma) anesthesia and small pieces of muscle tissue were previously cooled in n-Hexane, and then frozen in liquid nitrogen (-159°C). Transverse sections of muscles (7 to 10 µm) were submitted to the following reactions: HE, NADH-TR, mATPase after acid (pH 4.6) and alkaline pre-incubation (pH 10.4) and PCNA reaction. In all treatments, the morphological and histochemical analysis of the muscle tissue were similar. Two distinct layers were identified: a superficial red one, more developed in the lateral line region, formed by fibers with intense to moderate NADH-TR reaction and strong acid-stable mATPase activity; a deep white one, composing most of the muscle mass, formed by fibers with weak NADH-TR reaction and strong alkali-stable mATPase activity. An intermediate layer was seen between the superficial and deep layers with fibers presenting either weak acid-stable or acid-labile mATPase activity. Body weight increase was significantly higher in the T5 than in the lysine group (T1-T4). There was not difference in the number and in the muscle fiber diameters in the lysine group. In T5, the muscle fiber diameter and the muscle fiber number in the specific area was higher. The frequency of red fibers with ≤ 8 µm diameter was higher in the lysine group, however, the frequency of red fibers between 16-24µm diameter was higher

in T5. The majority of white fiber diameters was $\geq 24\mu\text{m}$ in T5, whereas, in the lysine group, the majority of white fiber diameters was between 8-16 μm . Cell proliferation was superior in the lysine group. This study results suggest that the lysine amino acid was not used in the myofibrillar protein synthesis in larvae of Nile tilapia. Muscle growth occurred mainly by hyperplasia in the lysine group and in T5, muscle growth occurred by hyperplasia and hypertrophy.

Introdução

O tecido muscular estriado dos peixes constitui de 40 a 75% do peso total e está distribuído em compartimentos ou camadas, referidas como vermelha, intermediária e branca. A camada muscular vermelha ou superficial está localizada abaixo da derme, sendo constituída por fibras com metabolismo oxidativo e com muita mioglobina. A camada muscular branca ou profunda representa a maior parte da massa muscular, sendo constituída por fibras com reduzida atividade oxidativa e pouca mioglobina. Entre as camadas de musculatura vermelha e branca está a camada intermediária, em menor proporção, que apresenta características intermediárias (Kilarski, 1990; Johnston, 1999).

O crescimento do músculo estriado esquelético nos peixes ocorre pela associação dos processos de hipertrofia e hiperplasia, a partir de mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites (Johnston, 1999). A proliferação e a diferenciação dos mioblastos é controlada pelos fatores de regulação miogênica (Watabe, 2001). Quando ativados por esses sinais celulares, os mioblastos proliferam e se diferenciam e, os núcleos podem ser internalizados às fibras existentes culminando assim com o aumento do diâmetro das fibras. No processo de crescimento hiperplásico, os mioblastos indiferenciados se agregam à

superfície das fibras pré-existentes, formando miotubos e estes se separam originando novas fibras musculares. Assim, quando a hiperplasia está ocorrendo, observa-se um mosaico de fibras com diferentes diâmetros (fibras grandes e pequenas associadas), observado, mais frequentemente, na musculatura branca (Johnston, 1999).

A análise do crescimento muscular, que ocorre principalmente durante as fases larval e juvenil, tem despertado o interesse em estudos que valorizam o tamanho final dos peixes com finalidade comercial. A relativa contribuição da hiperplasia e da hipertrofia no crescimento muscular tem sido estudada em muitas espécies e foi verificado que nas espécies de crescimento rápido e que atingem maior tamanho, o crescimento hiperplásico persiste por um período de tempo mais prolongado (Kiessling et al., 1991; Valente et al., 1999; Rowleron & Veggetti, 2001). Por outro lado, em espécies de tamanho pequeno, o crescimento muscular por hiperplasia cessa rapidamente e a hipertrofia mostrou-se como o mecanismo de crescimento mais efetivo (Veggetti et al., 1993; Koumans & Akster, 1995).

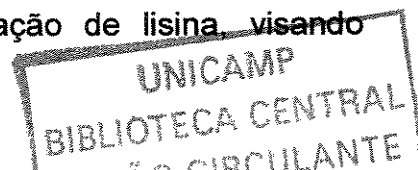
Os fatores reguladores do crescimento e reguladores miogênicos, responsáveis pela ativação e diferenciação de mioblastos, podem ser influenciados por muitas variáveis, entre elas a nutrição (Brodeur et al., 2002; 2003). Tem sido demonstrado que a alimentação pode aumentar a concentração de aminoácidos disponíveis, aumentando a taxa metabólica e favorecendo o crescimento do tecido muscular (Brown & Cameron, 1991a,b; Houlihan et al., 1995). Esse fenômeno é conhecido como ação dinâmica específica (SDA) (Jobling, 1994).

Nos peixes, a transição da alimentação endógena para a exógena, após a eclosão, é fundamental para o desenvolvimento e crescimento dos tecidos e órgãos, entre eles o tecido muscular (Koumans & Akster, 1995). O desenvolvimento e a rentabilidade do cultivo intensivo de peixes, principalmente neste estágio, dependem da utilização de dietas que contenham todos os nutrientes essenciais, administrados em quantidades suficientes para garantir crescimento ótimo (Cantelmo, 1989). Entre os aminoácidos utilizados na confecção de dietas, a lisina foi eleita como aminoácido de referência, pois, além de ser um dos mais importantes para peixes, é limitante no crescimento sendo utilizado em grande proporção para a síntese de proteínas (Mack, 1998).

A utilização de dieta adequada pode influenciar o crescimento e a celularidade do tecido muscular estriado esquelético dos peixes, produto final desejado, favorecendo a produção de carne (filé) de melhor qualidade, que atenderá com êxito o mercado consumidor (Fauconneau et al., 1993).

A tilápia do Nilo é uma espécie com elevado potencial para a aquicultura intensiva e para a piscicultura de subsistência, adequadas para criação desde regimes extensivos até superintensivos (Torloni, 1984; Berman, 1997; Fitzsimmons, 1998). Apresenta carne de excelente sabor, com boas características organolépticas, filé sem espinhos intramusculares em forma de "Y", de fácil filetagem e com boa aceitação no mercado consumidor (Hildsorf, 1995; Lovshin, 1997).

Este trabalho teve como objetivo analisar as características morfológicas e a performance do crescimento muscular em larvas de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de lisina, visando



acrescentar informações que possam facilitar a exploração adequada dessa espécie.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e Laboratório de Histoquímica e Imunohistoquímica do Departamento de Morfologia-IB - da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu. Foram utilizadas larvas recém eclodidas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso e comprimento iniciais de $0,013 \pm 0,012$ g e $1,01 \pm 0,05$ cm, respectivamente, obtidas a partir de matrizes mantidas em cativeiro, procedentes do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal. As larvas foram alojadas num tanque circular de 500L para adaptação e posterior seleção e distribuição nos aquários experimentais.

Após um período de adaptação de cinco dias as larvas foram distribuídas em 20 aquários de 12L, ligados a um sistema de recirculação de água, com aquecimento controlado e temperatura da água constante (26°C), numa densidade média de 1 larva/L. A água do sistema estava acoplada a uma central de aeração e de filtragem física e biológica, a qual manteve a qualidade com renovação total a cada 45 minutos.

Os peixes foram divididos em cinco tratamentos: quatro tratamentos contendo níveis crescentes de suplementação do aminoácido lisina – grupo lisina

(T1=0,0; T2=1,1; T3=1,7; T4=4,0%), correspondente a ração confeccionada para o experimento e um tratamento (T5) com dieta comercial (Tabela 1). Esses tratamentos foram distribuídos completamente ao acaso entre os aquários, totalizando quatro repetições para cada tratamento.

As rações do grupo lisina foram formuladas com base no conceito de proteína ideal, de modo a atender as exigências nutricionais iniciais em proteína, energia, cálcio e fósforo. Para tal, houve suplementação de fósforo e energia, possibilitando aos quatro tratamentos, o perfil recomendado de proteína digestível (35,0%), energia digestível (3500 kcal/kg de dieta), aminoácidos essenciais digestíveis e fósforo disponível (0,60%) (Furuya et al., 2001).

Os valores de digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes dos ingredientes para confecção das rações, bem como as exigências nutricionais da tilápia foram determinadas a partir dos resultados obtidos por Furuya et al. (2001) e Miranda et al. (2001a,b). Para a confecção das rações, os ingredientes foram moídos e padronizados a um diâmetro inferior a 0,45 mm.

As dietas foram oferecidas aos peixes seis vezes ao dia, as 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 e 18:00 horas. Para evitar a dispersão e possível perda das dietas, o sistema de recirculação de água foi interrompido por 15 minutos durante o manejo alimentar. A temperatura da água (26° C) foi monitorada diariamente, e o pH (6,8) e o teor de oxigênio dissolvido (6,7 mg/L), semanalmente. Os aquários foram sifonados semanalmente antes da primeira alimentação.

Decorrido o período do experimento (30 dias), os peixes foram anestesiados com MS-222 (Aminobenzoic acid ethyl ester, SIGMA, A-5040), colocado na água. Foi determinado o ganho de peso (g), o comprimento (cm) e a

taxa de sobrevivência (%). Posteriormente, exemplares foram sacrificados e imersos em formalina neutra tamponada. Após a retirada do fixador, cinco peixes de cada tratamento foram processados e incluídos em Histoiresina. Cortes histológicos com 5-7 μ m, obtidos transversalmente ao corpo da larva, na altura da nadadeira dorsal foram submetidos à coloração pela Hematoxilina-Eosina para a avaliação da morfologia geral das fibras musculares. Esta preparação foi utilizada para a contagem do número de fibras musculares. Como critério para a contagem das fibras musculares e núcleos em proliferação, discriminou-se na região epiaxial (dorsal), uma área miotomal, delimitada pela medula espinhal e pelo septo transversal, separada em três subáreas por finos septos de tecido conjuntivo, conforme mostrado na Figura 1A.

Amostras da musculatura estriada de cinco larvas de cada tratamento foram submetidas à tratamento criobiológico. Os fragmentos musculares foram imersos em n-Hexano resfriado em nitrogênio líquido (-159°C) e os cortes histológicos (7-10 μ m) de cada tratamento, obtidos em criostato a -20° C, foram submetidos às seguintes colorações e reações histoquímicas: HE, para avaliação do padrão morfológico das fibras musculares; NADH-TR, para a avaliação do metabolismo (oxidativo e/ou glicolítico) das fibras musculares; ATPase miofibrilar (mATPase), em pH 9,4, após pré-incubação em meio ácido (pH 4,6) e alcalino (pH 10,4), para estudar as características da ATPase miofibrilar (Dubowitz & Brooke, 1973).

O material submetido à reação NADH-TR foi utilizado para o cálculo do menor diâmetro das fibras musculares conforme a metodologia de Dubowitz & Brooke, (1973). Para isso, foi utilizado o sistema de análise de imagens Leica

Qwin. Na região epiaxial foram medidos os menores diâmetros de 100 fibras do compartimento superficial de musculatura vermelha e de 100 fibras do compartimento profundo de musculatura branca. Posteriormente as fibras musculares foram distribuídas em classes de diâmetros (≤ 8 , $8 \leq 16$, $16 \leq 24$, $24 \leq 32$, >32), conforme a metodologia utilizada por Veggetti et al. (1993).

Do material fixado em formalina tamponada, parte foi incluído em Paraplast e cortes histológicos com 5 a 7 μm foram submetidos à reação imunohistoquímica para PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) para avaliar o grau de proliferação celular na musculatura estriada. As lâminas histológicas foram incubadas com o anticorpo primário (NCL-PCNA – NOVOCASTRA), anticorpo secundário (Anti-mouse IgG – VECTOR) e posteriormente com a solução ABC (Avidina-Biotina-Peroxidase – VECTOR). Após a revelação com DAB (3,3' Diaminobenzidine, SIGMA, D-5637), as lâminas foram montadas em permount (Hsu et al., 1981; Veggetti et al., 1999). A contagem dos núcleos em proliferação foi expressa em porcentagem.

Para a análise estatística dos parâmetros comprimento, área miotomal de contagem e diâmetro das fibras musculares, foi utilizada a análise de variância paramétrica. Para os parâmetros: peso e número de fibras musculares, utilizou-se a análise de variância não-paramétrica, complementada com o respectivo teste de comparações múltiplas (Norman & Streiner, 1994). O estudo da distribuição dos diâmetros em classes e a taxa de sobrevivência foi realizado pelo teste de Goodman (Goodman, 1964;1965). A análise da frequência de núcleos em proliferação foi realizada pelo Teste de Kruskal – Wallis (Norman & Streiner, 1994). Os dados foram discutidos no nível de 5% de significância.

Resultados

O aumento do peso e comprimento foi significativo nos peixes que receberam dieta comercial (T5), não havendo diferença entre os tratamentos do grupo lisina (T1-T4). A taxa de sobrevivência dos peixes, em todos os tratamentos, variou de 96 a 100% (Tabela 2).

A análise morfológica do tecido muscular possibilitou distinguir dois compartimentos distintos nos peixes de todos os tratamentos: um superficial, abaixo da derme, mais espesso na região do nervo da linha lateral, formado por fibras em geral pequenas, e outro profundo, com fibras maiores, ocupando a maior parte da massa muscular. As fibras musculares apresentaram-se separadas por finos septos de tecido conjuntivo, o endomísio, e septos mais espessos de tecido conjuntivo separavam as fibras musculares em fascículos, o perimísio. O septo transversal, constituído de tecido conjuntivo, separava a massa muscular em regiões epiaxial ou dorsal e hipoaxial ou ventral (Figura 1).

Os cortes histológicos submetidos à reação NADH-TR demonstraram os compartimentos musculares, superficial e profundo, separados distintamente, porém não houve diferença no padrão desta reação. No compartimento superficial, as fibras musculares reagiram intensamente ao NADH, apresentando a formazana, distribuída em grumos na região subsarcolemal e intermiofibrilar. Nas fibras do compartimento profundo, a reação foi fraca, em forma de finos grumos na região intermiofibrilar. Entre o compartimento superficial e o profundo foi evidenciado um fino compartimento intermediário, com fibras apresentando reação enzimática moderada (Figura 2A).

Após a realização da reação mATPase em meio ácido (pH=4,6), observou-se que as fibras musculares do compartimento superficial reagiram fortemente, enquanto que, a maioria das fibras dos compartimentos intermediário e profundo mostraram reação fraca ou negativa. Nestes dois compartimentos foram observadas áreas com fibras apresentando diferentes intensidades de reação, fibras pequenas com intensa reação e fibras maiores com reação variando de moderada a forte (Figura 2B). Em pH alcalino (pH=10,4) as fibras musculares do compartimento superficial reagiram fracamente, enquanto que as fibras dos compartimentos intermediário e profundo apresentaram reação de moderada a forte. Não se constatou variações na intensidade de reação e nos tipos de fibras nos tratamentos estudados.

Em relação à área miotomal de contagem e diâmetro das fibras musculares vermelhas e brancas, estes foram significativamente maiores nos peixes do tratamento T5, não sendo observada diferença entre os tratamentos do grupo lisina (T1-T4).

O número de fibras musculares na área miotomal de contagem nos peixes do tratamento T5 foi maior do que no grupo lisina (T1-T4). A área miotomal de contagem também foi significativamente maior nos peixes do tratamento T5 em relação aos tratamentos do grupo lisina. Os tratamentos T2 e T3 apresentaram valores estatisticamente similares a T5, não havendo diferença entre os tratamentos do grupo lisina. O diâmetro das fibras vermelhas e brancas não variou entre os tratamentos do grupo lisina, cujos valores médios foram entre 10 a 11,72 μ m para as fibras vermelhas e entre 15 a 16,07 μ m para as fibras brancas. Nos peixes do tratamento T5 o diâmetro das fibras musculares foi

significativamente maior, sendo de 13,28 μ m para as fibras vermelhas e de 22,44 μ m para as fibras brancas (Tabela 3).

A distribuição da frequência das fibras musculares em classes de diâmetros mostrou, no compartimento muscular vermelho de todos os tratamentos, maior porcentagem de fibras com diâmetros no intervalo entre 8,0 e 16,0 μ m. A porcentagem de fibras com diâmetro menor ou igual a 8,0 μ m foi maior nos tratamentos do grupo lisina (T1-T4), enquanto que T5 apresentou maior porcentagem de fibras com diâmetro acima de 16,0 μ m. No compartimento de musculatura branca, os tratamentos do grupo lisina (T1-T4) apresentaram maior porcentagem de fibras com diâmetros no intervalo entre 8,0 e 16,0 μ m. A porcentagem de fibras com diâmetro menor ou igual a 8,0 μ m foi maior nos tratamentos do grupo lisina (T1-T4), enquanto que T5 apresentou maior porcentagem de fibras com diâmetro acima de 24,0 μ m (Tabelas 4 e 5).

Os núcleos em proliferação foram evidenciados pela reação imunohistoquímica PCNA (Figura 3). A proliferação celular foi superior no grupo lisina, quando comparada à menor quantidade de células em proliferação do tratamento T5. No entanto, os tratamentos T3 e T4 apresentaram valores estatisticamente similares ao tratamento T5 (Tabela 6).

Tabela 1. Composição percentual das rações utilizadas no experimento .

INGREDIENTES	(T1) SSL *	(T2) 1,1% Lisina	(T3) 1,7% Lisina	(T4) 4,0 % Lisina	(T5) RC **
Farelo de algodão	6,00	6,00	6,00	6,00	-
Glúten de milho	57,67	57,67	57,67	57,67	25,00
Farinha de peixe	5,00	5,00	5,00	5,00	10,00
Amido de milho	20,00	19,53	18,46	15,40	-
Celulose	3,50	3,50	3,50	3,50	-
Óleo de soja	3,40	3,50	3,80	3,90	-
Óleo de peixe	3,40	3,50	3,80	3,90	-
Fosfato bicálcico	3,50	3,50	3,50	3,50	-
Vitamina C	0,10	0,10	0,10	0,10	-
Sal	0,01	0,01	0,01	0,01	-
Suplemento	0,80	0,80	0,80	0,80	-
Butil Hidroxí Tolueno	0,02	0,02	0,02	0,02	-
NUTRIENTES					
Energia Díg.	3204,28	3204,28	3204,28	3204,28	3200,00
Prot. Bruta	39,45	39,45	39,45	39,45	40,00
Fibra Bruta	4,04	4,04	4,04	4,04	7,00
Extrato Etéreo	5,92	5,92	5,92	5,92	3,50
Ca	1,13	1,13	1,13	1,13	1,80
P	0,71	0,71	0,71	0,71	0,80
Met	0,92	0,92	0,92	0,92	-
AAS	1,60	1,60	1,60	1,60	-
Trp	0,21	0,21	0,21	0,21	-
Tre	1,38	1,38	1,38	1,38	-

*SSL = sem suplementação de lisina ** RC = ração comercial

Tabela 2. Peso (g), comprimento (cm) e taxa de sobrevivência (%) dos peixes dos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5.

T	P (g) ⁽¹⁾	C (cm) ⁽²⁾	TS (%)
T1	0,11 ± 0,46 ^a	1,97 ± 0,23 ^a	96,67
T2	0,12 ± 0,46 ^a	2,10 ± 0,27 ^a	100,0
T3	0,11 ± 0,13 ^a	2,02 ± 0,26 ^a	96,67
T4	0,12 ± 0,09 ^a	2,04 ± 0,20 ^a	96,67
T5	0,25 ± 0,45 ^b	2,59 ± 0,46 ^b	100,0
	P<0,0001	P<0,0001	

(1) (mediana ± semi-amplitude total)

(2) (média ± desvio-padrão)

Tabela 3. Área miotomal de contagem (AC) em mm², número (N) e diâmetro (µm) das fibras musculares vermelhas (V) e brancas (B) na musculatura estriada da tilápia do Nilo (*O. niloticus*), nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5.

T	AC ⁽¹⁾	N ⁽²⁾	V ⁽¹⁾	B ⁽¹⁾
T1	0,27 ± 0,03 ^a	600 ± 64 ^a	11,11 ± 1,19 ^a	15,77 ± 1,23 ^a
T2	0,27 ± 0,07 ^a	693 ± 106 ^{ab}	11,72 ± 1,33 ^{ab}	15,11 ± 0,53 ^a
T3	0,29 ± 0,04 ^a	802 ± 114 ^{ab}	10,92 ± 1,10 ^a	15,73 ± 0,90 ^a
T4	0,22 ± 0,07 ^a	578 ± 93 ^a	10,75 ± 0,97 ^a	16,07 ± 2,46 ^a
T5	0,48 ± 0,09 ^b	831 ± 111 ^b	13,28 ± 0,65 ^b	22,44 ± 1,30 ^b
	P<0,0001	P<0,05	P<0,01	P<0,0001

(1) Média ± desvio-padrão

(2) Mediana ± semi-amplitude total

Tabela 4. Frequência (%) das fibras musculares vermelhas, nas classes de diâmetros (μm), nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5.

T	0,0 – 8,0	8,1 – 16,0	16,1 – 24,0	24,1 – 32,0
T1	22,0 ^{bc}	68,8	9,2 ^a	0,0 ^a
T2	14,8 ^b	73,4	11,8 ^a	0,0 ^a
T3	23,0 ^c	69,2	7,4 ^a	0,4 ^a
T4	24,2 ^c	68,0	7,8 ^a	0,0 ^a
T5	6,6 ^a	67,8	24,6 ^b	1,0 ^a

$p < 0,05$

Tabela 5. Frequência (%) das fibras musculares brancas, nas classes de diâmetros (μm), nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5

T	0 – 8,0	8,1 – 16,0	16,1 – 24,0	24,1 – 32,0	> 32,0
T1	3,2 ^{ab}	51,8 ^{bc}	40,2	4,8 ^{ab}	0,0 ^a
T2	2,2 ^{ab}	60,2 ^c	34,6	2,8 ^a	0,2 ^a
T3	4,4 ^b	49,6 ^b	40,4	5,6 ^{ab}	0,0 ^a
T4	3,0 ^{ab}	52,6 ^{bc}	35,6	8,0 ^b	0,8 ^a
T5	0,8 ^a	18,6 ^a	38,2	34,8 ^c	7,6 ^b

$p < 0,05$

Tabela 6. Relação entre a frequência de núcleos PCNA positivos (N) e a área mitotomal de contagem (A) em mm², nos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5.

T	N/A ⁽¹⁾
T1	500,0 ± 214,28 ^b
T2	448,13 ± 92,94 ^b
T3	292,96 ± 99,13 ^{ab}
T4	310,73 ± 122,22 ^{ab}
T5	133,33 ± 17,19 ^a
P < 0,01	

(1) Mediana ± semi-amplitude total

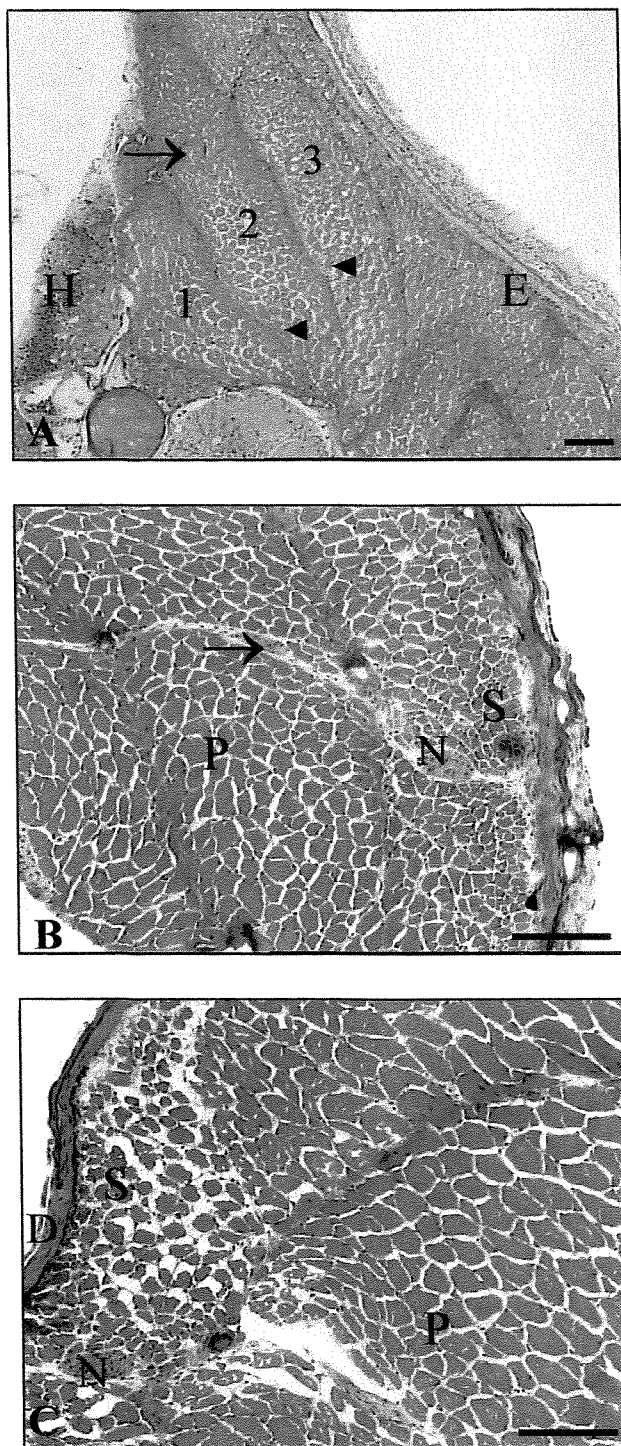


Figura 1. Musculatura estriada da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). **A:** Corte transversal mostrando a área miotomal de contagem (1, 2 e 3). Septo transverso (seta) separando a musculatura epiaxial(E) da hipoaxial(H) e septos de tecido conjuntivo separando a musculatura em fascículos (pontas de setas). **B:** Compartimento superficial (S), compartimento profundo (P), nervo da linha lateral (N) e septo transverso (seta). **C:** Compartimento superficial (S), compartimento profundo (P), nervo da linha lateral (N) e derme (D). HE, Barra = 100 μm .

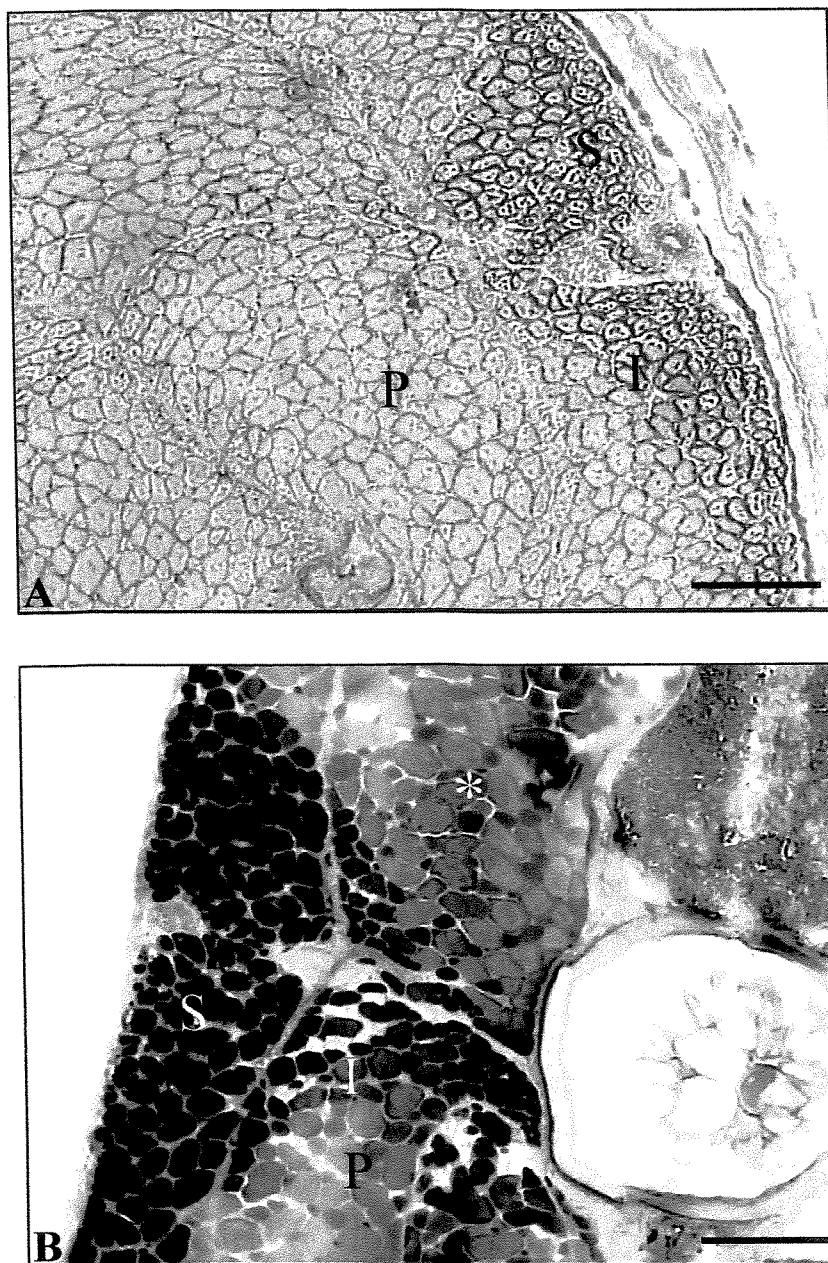


Figura 2. Musculatura estriada da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). **A:** Compartimento superficial (S) com fibras oxidativas, compartimento profundo (P) com fibras glicolíticas e compartimento intermediário (I) com fibras apresentando reação moderada. **NADH-TR, Barra = 100µm.** **B:** Fibras do compartimento superficial (S) com forte reação mATPase, compartimento profundo (P) com reação fraca a negativa e do compartimento intermediário (I) com moderada intensidade de reação. Fibras pequenas com diferentes intensidades de reação (asterisco). **mATPase, pH 4,6. Barra = 100µm.**

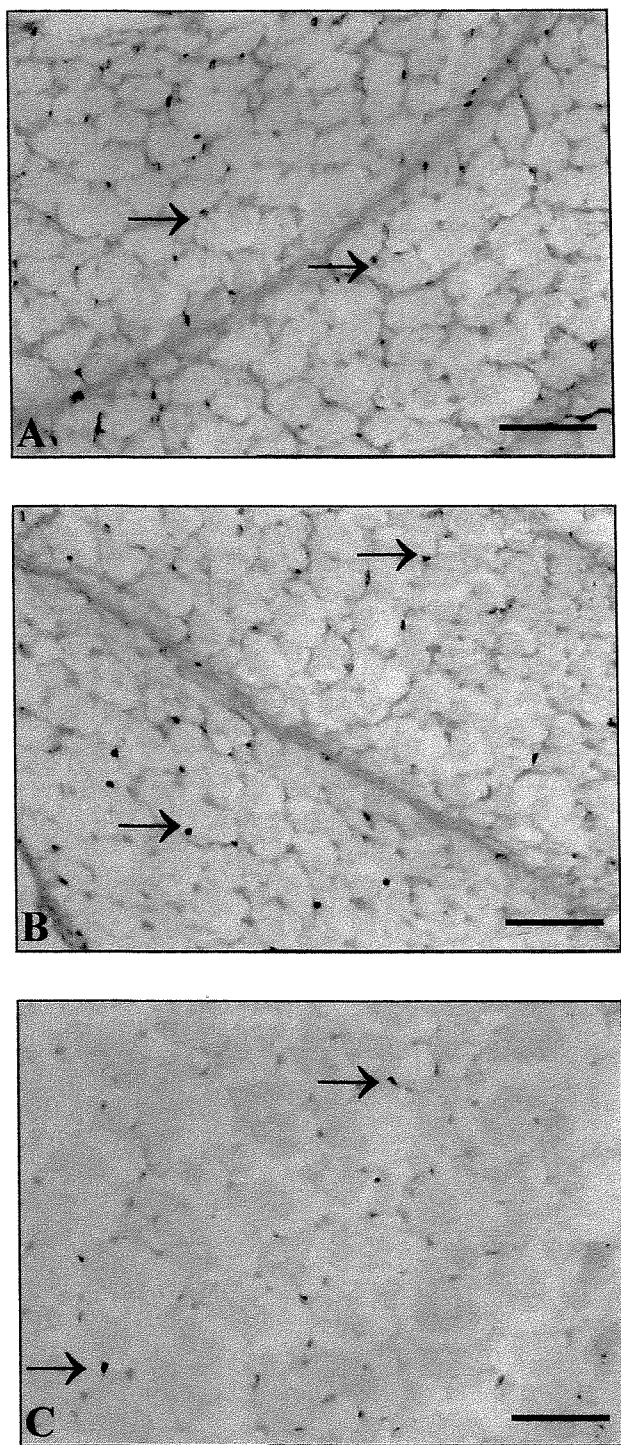


Figura 3. Musculatura estriada da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Reação imunohistoquímica PCNA. Núcleos de células PCNA positivas (setas). **A:** T1, **B:** T3. Barra = 100 μ m. **C:** T5. Barra = 50 μ m. PCNA.

Discussão

A musculatura estriada da tilápia do Nilo (*O. niloticus*), mostrou um compartimento superficial ou subdermal, com fibras apresentando metabolismo oxidativo, distribuídas em padrão semelhante a um triângulo, na região do nervo da linha lateral. Estas fibras constituem a musculatura vermelha. Um compartimento profundo, com fibras de metabolismo glicolítico, formou a maior parte da massa muscular, constituindo a musculatura branca. Um fino compartimento intermediário, com fibras oxidativas/glicolíticas, ficou localizado entre os compartimentos superficial e o profundo.

A distribuição das fibras musculares em compartimentos é característica comum em peixes (Scapolo et al., 1988; Veggetti et al., 1993; Galloway et al., 1999). No entanto, o padrão de distribuição das fibras nos compartimentos pode variar de acordo com a espécie (Te Kronnie et al., 1983; Dal Pai Silva et al., 1995a e b), com a fase de crescimento considerada (Dal Pai Silva et al., 2003a e b) e está relacionado com o tipo de atividade realizada durante a locomoção. Desde a eclosão é possível a identificação de dois compartimentos na musculatura miotomal dos peixes, onde as fibras musculares constituintes apresentam características indiferenciadas (Galloway et al., 1995, Assis et al., 2004). No entanto, o compartimento superficial nunca ultrapassa 30% do total da musculatura e o compartimento profundo forma a maior parte da massa muscular (Greer-Walker, 1975, Luther et al., 1996). As fibras da musculatura vermelha (superficial) são utilizadas na realização de movimentos lentos e contínuos enquanto as fibras da musculatura branca (profunda), são utilizadas na realização

de atividades bruscas de locomoção, como na fuga de predadores e captura de presas (Akster et al., 1995; Johnston, 1999).

As fibras da musculatura intermediária apresentam características intermediárias entre as fibras vermelhas e brancas. Com base nas suas características histoquímicas e fisiológicas são caracterizadas como de contração rápida e de metabolismo oxidativo/glicolítico, podendo ser recrutadas para atividades de sustentação e movimentos rápidos (Akster et al., 1995, Johnston et al., 1997, Johnston, 1999). Nesse estudo, a musculatura intermediária da tilápia apresentou-se como uma fina camada pouco diferenciada entre a musculatura vermelha e branca. O período em que essa musculatura é evidenciada e a proporção depende da espécie estudada e do estágio de desenvolvimento considerado (Dal Pai Silva et al, 2003a e b ; Assis et al., 2004).

Nas tilápias de todos os tratamentos, observou-se variação na intensidade da reação mATPase em pH ácido principalmente nas fibras das musculaturas intermediária e branca. Esse fato pode refletir as diferenças na isoforma da miosina que essas fibras estão expressando (Scapolo et al., 1988; Brooks & Johnston, 1993; Veggetti et al., 1993; Mascarello et al., 1995), fato comumente observado durante o crescimento. São conhecidas várias isoformas de miosina de cadeia pesada, entre as quais, a embrionária, neonatal, "fast" e "slow", que podem ser avaliadas e utilizadas como marcador para a determinação fenotípica das fibras durante o crescimento, regeneração e adaptação muscular (Goldspink et al., 2001; Rowleron et al., 1995). Por outro lado, as fibras podem co-expressar mais de uma isoforma da miosina e assim, para melhor identificação, podem ser utilizadas reações imunohistoquímicas utilizando-se anticorpos específicos para as

miosinas (Veggetti et al., 1993) ou a análise bioquímica por eletroforese (Staron, 1991).

Nesse experimento, os peixes que receberam dieta comercial (T5) apresentaram valores maiores de peso e comprimento em relação aos tratamentos do grupo lisina. Tal fato foi consequência do maior crescimento, com ganho de massa muscular, confirmado pelo maior valor da área miotomal e pelo maior diâmetro das fibras musculares nos compartimentos vermelho e branco, em relação aos peixes que receberam dietas suplementadas com lisina.

O crescimento pós-embriônico do músculo estriado esquelético em peixes ocorre por hipertrofia e/ou por hiperplasia, pela atividade dos mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites (Alami-Durante et al., 1997; Johnston, 1999). A contribuição da hipertrofia e hiperplasia no crescimento varia entre as espécies, na dependência do tamanho final alcançado ou da ação de fatores ambientais (Weatherley & Gill, 1985; Assis et al., 2004).

A área miotomal e o diâmetro das fibras musculares revelaram valores significativamente menores para os peixes dos tratamentos do grupo lisina, mostrando que o crescimento muscular por hipertrofia das fibras foi baixo no período estudado, prevalecendo o recrutamento ou formação de fibras musculares (hiperplasia). Já nos peixes que receberam dieta comercial, o crescimento muscular por hipertrofia foi mais acentuado. Esse fato foi confirmado também pela frequência dos diâmetros das fibras.

Segundo Brown & Cameron (1991a,b) e Houlihan et al. (1995), durante a alimentação ocorre aumento na taxa metabólica, a qual é referida como ação dinâmica específica (SDA) (Jobling, 1994) e acredita-se que este fenômeno

resulta, em grande parte, da estimulação da síntese protéica induzida pela elevação na concentração de aminoácidos livres. O menor crescimento observado nas tilápias do grupo lisina pode ter sido consequência do menor aproveitamento dos nutrientes contidos na ração, principalmente do aminoácido lisina suplementado.

Para a confecção da ração contendo baixa lisina, a fonte protéica utilizada em maior quantidade foi o glúten de milho, que segundo estudos de Robaina et al. (1997), possui baixa palatabilidade e desbalanço de seus aminoácidos. Isto pode ter provocado o menor consumo e, portanto, a menor disponibilidade dos nutrientes, inclusive do aminoácido lisina suplementado, provocando o menor crescimento das larvas em relação aos peixes que se alimentaram de ração comercial. A baixa palatabilidade pode ter causado menor consumo da dieta, não disponibilizando a quantidade de nutrientes necessários, principalmente, o aminoácido lisina suplementado, desfavorecendo um melhor ganho de massa muscular.

A reação imunohistoquímica para PCNA mostrou maior porcentagem de núcleos em proliferação nos tratamentos do grupo lisina em comparação com o tratamento que recebeu dieta comercial, onde a taxa de proliferação celular foi menor. A intensa proliferação celular observada nos tratamentos que receberam dieta com lisina (T1-T4), indica que no período analisado, o crescimento nesses peixes, estava ocorrendo principalmente por hiperplasia das fibras musculares. Por outro lado, a menor proliferação celular dos peixes que receberam dieta comercial (T5), no mesmo período, indica que a hiperplasia foi menor e o crescimento muscular ocorreu pela associação dos mecanismos hiperplásico e,

principalmente, hipertrófico das fibras musculares. Este fato foi confirmado pela maior frequência das fibras musculares de diâmetros maiores em T5 comparado com os tratamentos do grupo lisina (T1-T4). É possível que tenha ocorrido um retardo do crescimento hipertrófico das fibras musculares nos tratamentos que receberam suplementação de lisina. Entretanto, houve uma tendência para o início da hipertrofia das fibras onde os níveis de lisina estavam altos (T3 e T4), associada à queda na proliferação celular quando comparado com os tratamentos T1 e T2, que continham níveis menores de suplementação do aminoácido. A administração desta dieta por um período maior, poderia favorecer o crescimento hipertrófico, como consequência da utilização dos nutrientes da dieta, inclusive da lisina suplementada.

A variação nas taxas de proliferação celular pode ter sido decorrente de uma alteração nos processos que regulam a proliferação e a diferenciação dos mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites. No crescimento muscular, a proliferação e a diferenciação dos mioblastos são eventos controlados pelos fatores de regulação miogênica (MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4) (Watabe, 2001). Segundo alguns pesquisadores, a expressão desses fatores transcricionais músculo específicos pode ser influenciada por vários fatores ambientais e nutricionais (Brodeur et al., 2002; 2003).

Nos peixes dos tratamentos com suplementação de lisina, a proliferação celular indica que o crescimento muscular ocorreu principalmente por hiperplasia, com pouca síntese de proteínas miofibrilares. Entretanto, nos peixes que receberam dieta comercial, ocorreu a associação dos mecanismos de crescimento

muscular por hiperplasia e síntese de proteínas miofibrilares, evidenciada pela hipertrofia das fibras musculares.

A hiperplasia observada entre os tratamentos do grupo lisina poderia ser importante para o desenvolvimento posterior desses peixes, principalmente pelo crescimento hipertrófico dessas fibras. É possível, que um período maior de administração desta dieta poderia favorecer o ganho de massa muscular pelo aproveitamento dos nutrientes e, principalmente, do aminoácido lisina suplementado.

Embora não tenha sido constatada variação significativa no crescimento do tecido muscular estriado esquelético entre os tratamentos que receberam suplementação do aminoácido lisina, as respostas encontradas são importantes do ponto de vista nutricional e reforçam a importância de se utilizar análises morfológicas como ferramenta de auxílio na caracterização dos processos de crescimento muscular envolvendo a nutrição.

Referências Bibliográficas

- Akster, H.A., Verreth, J.A.J., Spierts, I.L.Y., Berbner, T., Schmidbauer, M. & Osse, J.M.W. (1995). Muscle growth and swimming in larvae of *Clarias gariepinus* (Burchell). *ICES Marine Science Symposia* 201, 45-50.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A. M. & Bergot, P. (1997). Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth raye. *J. Fish. Biol.* 50, 1285-1302.

- Assis, J.M.F., Carvalho R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A. & Dal Pai Silva, M. (2004). Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 237, 251-267.
- Berman, Y. (1997). Produccion intensiva de tilapia en agua fluyente. In: Simpósio Centroamericano de Aquacultura- Cultivo Sostenible de Camaron Y Tilapia, 4, Tegucigalpa. Anais. Honduras: *World Aquaculture Society*, pp 59-63.
- Brodeur, J.C., Peck, L.S. & Johnston, I.A. (2002). Feeding increases MyoD and PCNA expression in myogenic progenitor cells of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology* 60, 1475- 1485.
- Brodeur, J.C., Calvo, J., Clarke, A. & Johnston, I.A. (2003). Myogenic cell cycle duration in *Harpagifer* species with sub-Antartic and Antartic distributions: evidence for cold compensation. *Journal of Experimental Biology* 206,1011-1016.
- Brooks, S. & Johnston, I.A. (1993). Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of myotomal muscle fibre types in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Mar. Biol.* 117, 501-513.
- Brown, C.R. & Cameron, J.N. (1991a). The induction of specific dynamic action in Channel catfish by infusion of essential amino acids. *Physiol. Zool.* 64, 276-297.
- Brown, C.R. & Cameron, J.N. (1991b). The relationship between specific dynamic action (SDA) and protein synthesis rates in the Channel catfish. *Physiol. Zool.* 64, 298-309.

- Cantelmo, O.A. (1989). Nutrição de peixe e aquicultura. In: Hernandez, A. (Ed). *Cultivo de colossoma*. Bogotá: Editora Guadalupe. pp. 475.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V. & Mota, D. L. (1995a). Histochemical study of muscle fibre types in *Synbranchus marmoratus*. *Ann. Anat.* 177, 65-70.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V. & Mota, D. L. (1995b). Características morfológicas e histoquímicas do tecido muscular do *Synbranchus marmoratus*, com fenótipo I e II. *Rev. Bras. Biologia* 55, 685-691.
- Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R. F., Pellizzon, C. H. & Dal Pai, V. (2003a). Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell*, 35(3), 179-187.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E. M. S., Dal Pai, V. & Rodrigues, A. C. (2003b). Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Archive of Fishery And Marine Research* 50 (2), 149-160.
- Dubowitz, V. & Brooke, M. (1973). Muscle biopsy: A Modern Approach. *London: Saunders*, pp. 475.
- Fauconneau, B., Chmaitilly, J., Andre, S., Cardinal, M., Cornet, J., Vallet, J.L., Dumont, J.P. & Laroche, M. (1993). Characteristics of rainbow trout flesh: I. Chemical composition and cellularity of muscle and adipose tissues. *Sciences des Aliments* 13, 173-187.
- Fitzsimmons, K. (1998). O mercado de tilápia nas EUA. *Panorama da Aquicultura* 8(45), 28-30.

- Furuya, W.M., Pezzato, L.E. & Pezzato, A.C. (2001). Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootecnia* 30(4), 1143-1149.
- Galloway, T.F., Lein, I., Akster, H.A. & Kjorsvik, E. (1995). Growth of swimming musculature during the yolk sac stage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) In: larvi Fish and Shefish Larviculture (Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. Eds). *European Aquaculture Society Special Publication* 24, 94-97.
- Galloway, T.F., Kjorsvik, E. & Kryvi, H. (1999). Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus Morhua* L.) related to different somatic growth rates. *J. Exp Biol.* 202, 2111-2120.
- Goldspink, G., Wilkes, D. & Ennion, S. (2001). Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth, and adaptation. In: Muscle development and growth. JOHNSTON, I.A., *Academic Press*, Califórnia 18, 43-72.
- Goodman, L.A. (1964). Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics* 35(2), 716-725.
- Goodman, L.A. (1965). On Simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7(2), 247-254.
- Greer-Walker, M. & Pull, G.A. (1975). A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.* 7, 295-300.
- Hildsorf, A.W.S. (1995). Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. *Boletim do Instituto de Pesca* 22, 73-87.

- Houlihan, D.F., Pedersen, B.H., Steffensen, J.F. & Brechin, J. (1995). Protein synthesis, growth and energetics in larval herring (*Clupea harengus*) at different feeding regimes. *Fish Physiol. Biochem* 14, 195-208.
- Hsu, S.M., Raine, L. & Fanger, H. (1981). Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 577-580.
- Jobling, M. (1994). *Fish Bioenergetics*. London: Chapman & Hall.
- Johnston, I.A., Cole, N.J., Vieira, V.L.A. & Davison, I. (1997). Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. *J. Exp. Biol.* 200, 849-868.
- Johnston, I.A. (1999). Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Kiessling, A., Storebakken, T. & Asgard, T. (1991). Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*O. Mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture* 93, 335-356.
- Kilarski, W. (1990). Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L.). *J. Fish Biol* 36, 353-362.
- Koumans, J.T.M. & Akster, H.A. (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A, 3-20.
- Lovshin, L.L. (1997). Tilapia farming: A Growing Worldwide Aquaculture Industry. In: Simpósio Sobre Manejo E Nutrição De Peixes. Piracicaba. *Anais*. Piracicaba: CBNA, pp. 137-164.

- Luther, P.K., Munro, P.M.G. & Squire, J.M. (1996). Muscle ultrastructure in the teleost fish. *Micron* 26, 431-459.
- Mack, S. (1998). Amino acids in broiler nutrition requirements and interrelations. In: Simpósio Internacional sobre nutrição de aves, Campinas. Anais. Campinas, São Paulo, Brasil, pp.69-86.
- Mascarello, F., Rowlerson, A., Radaelli, G., Scapolo, P.A. & Veggetti, A. (1995). Differentiation and growth of muscle fibers in the fish *Sparus aurata* (L). Myosin expression and organisation of fibers types in lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, pp. 16.
- Miranda, E.C.; Pezzato, A.C. & Pezzato, L.E.(2000 a). Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). *Acta Scientiarum*, 22, 669-675.
- Miranda, E.C.; Pezzato, A.C. & Pezzato, L.E. (2000b) .Relação cálcio/fósforo disponível em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, 29, 2162-2171.
- Norman, G.R. & Streiner, D.L. (1994). Biostatistics. The bare essentials. Mosby-Year Book, St.Louis, pp.260.
- Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M. & Montero, D. (1997). Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture* 157, 347-359.
- Rowlerson, A., Mascarello, F. & Radaelli, G. (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.). II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 16, 223-236.

- Rowlerson, A. & Veggetti, A. (2001). Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. Muscle development and growth, *Academic Press*, pp. 103-140.
- Scapolo, P.A., Veggetti, A., Mascarello, F. & Romanello, M.G. (1988). Developmental transitions of myosin isoforms and organization of the lateral muscle in the teleost *Discentrarchus labrax* (L.) *Anat. Embriol.* 178, 287-195.
- Staron, R.S. (1991). Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry* 96, 21-24.
- Te Kronnie, G., Tatarczuch, L., Van Raamsdonk, W. & Kilarski, W. (1983). Muscle fibre types in the myotome of stickleback *Gasterosteus aculeatus* L.: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *J. Fish Biol.* 22, 303-316.
- Torloni, C.E. (1984). Criação de tilápias. *A granja* 5, 44-46.
- Valente, L.M.P., Rocha, E. & Gomes, E.F.S. (1999). Growth dynamics of white and red muscle fibers in fast and slow growing strains of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 55, 675-691.
- Veggetti, A., Mascarello, F. & Scapolo, P.A. (1993). Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish, *Poecilia reticulata*: a histochemical, imunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embryol.* 187, 353-361.
- Veggetti, A., Rowlerson, A., Radaelli, G., Arrighi, S. & Domeneghini, C. (1999). Post-hatching development of the gut and lateral muscle in the sole. *J. Fish Biology*, 55 A, 44-65.

Watabe, S. (2001). Myogenic regulatory factors. In: Johnston, I.A. Muscle development and growth, *Academic Press*, pp. 19-41.

Weatherley, A.H. & Gill, H.S. (1985). Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia* 41, 353-354.

VI. CONCLUSÕES

- O padrão morfológico e histoquímico das fibras musculares não foi alterado com a suplementação do aminoácido lisina;
- O crescimento muscular por hiperplasia predominou no grupo lisina enquanto que no tratamento que recebeu dieta comercial, o crescimento muscular ocorreu pela associação da hipertrofia e hiperplasia;
- A análise morfológica pode ser utilizada como ferramenta para a caracterização dos processos de crescimento muscular envolvendo a nutrição.