

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Efeito da arginina nas respostas fisiológicas e
no desempenho produtivo de tilápias
produzidas em tanques-rede**

Rudã Fernandes Brandão Santos
Engenheiro de Pesca

Jaboticabal - São Paulo
2015

Efeito da arginina nas respostas fisiológicas e no desempenho produtivo de tilápias produzidas em tanques-rede

Rudã Fernandes Brandão Santos
Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Unesp, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal - São Paulo
2015

Dedicatória

A minha filha, Marina.

Labor improbus omnia vincit, apud tempore

Virgilio

Agradecimentos

Vou seguir a mesma lógica utilizada no meu trabalho de conclusão de curso e continuar esses agradecimentos de onde eu parei. A dissertação em si é um passo, talvez a cereja do bolo muitas outras coisas precisaram acontecer antes ou concomitantemente com o desenrolar do mestrado para eu conseguir ter a oportunidade de defender a dissertação.

Assim, a primeira pessoa que eu devo agradecer por ter conseguido apresentar essa dissertação é a Marina, minha filha, pois, o seu nascimento exigiu que eu me tornasse mais dinâmico nos meus afazeres e saísse da minha zona de conforto, pois me apresentou novas necessidades.

A partir do momento que cheguei em São Paulo, comecei a trabalhar na Poytara e aprendi muito sobre os mais variados assuntos. Essa empresa, mesmo com a distância imposta pelo egresso no mestrado, tem sido muito importante para a minha formação e contei com a ajuda de muitos amigos, especialmente do Junior. Mas vale citar a Cris, Tiago, Neto, Regiane, Carlão, Elcio, Livia, Hugo, Dino, Anselmo que sempre estiveram a mão quando foi preciso.

Outro apoio muito grande que recebi durante o período de mestrado, foi dos amigos da República Curva de Rio, especialmente do Willy e o Felipe. Enquanto um núcleo me apoiou profissionalmente, o outro atuou como uma balança que me fazia restabelecer o equilíbrio.

Começando agora a falar de todos os envolvidos diretamente na elaboração dessa dissertação a primeira pessoa que eu gostaria de agradecer é ao meu orientador de iniciação científica, o Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto, que abriu as portas do LAPOA me apresentando a minha orientadora Fabiana Pilarski, e que me ajuda nos mais variados assuntos e sou grato pela oportunidade que me ofereceu. Fui muito bem acolhido, recebendo os mais diferentes tipos de suportes. Desde ajuda para conseguir parceiros para a execução dos experimentos até nos problemas que surgiram durante essa etapa. Espero ter atendido suas expectativas.

Em relação a equipe de alunos do LAPOA, mais que agradecer, é importante ressaltar que foram fundamentais para a execução de todos os experimentos. A Sílvia Umeda Gallani que me ajudou muito com bibliografia na fase pré-experimento e na realização das análises juntamente com o Gustavo Moraes Ramos Valladão. A Gabriela Pala, que atuou praticamente como uma gerente na preparação das coletas, não permitindo que nada fosse esquecido, um adjetivo muito bom que deram para ela e concordo plenamente é assertiva. À Thais H. Vaz Farias e ao Nícolas Levy Pereira, que madrugaram comigo pipetando plasma e me deram suporte nos períodos pré-experimentos. À Jaqueline Custódio da Costa, Katia Suemi Gozi, Fernanda de Alexandre Sebastião, Suzana Kotzent, Lindomar de Oliveira Alves, José Dias Neto, Pedro Henrique de Oliveira Viadanna por toda a ajuda prestada. Os amigos dos outros laboratórios que também foram fundamentais para a execução dos experimentos e aperfeiçoamento dos manejos: Donovan, Vanda, Daniel, Fabio e o Bruno juntamente

com os funcionários do CAUNESP: o Valdecir, que muitas vezes me ajudou no manejo dos peixes e ao Márcio (Perereca), sempre solícito e pró-ativo, a Damares aos funcionários da pós-graduação do Caunesp Veralice e David, ao professor Euclides Braga Malheiros que me ajudou na execução da estatística dos dados. Queria poder atribuir adjetivos a todos, mas, o espaço é pequeno. Aos professores James e Gisele, Universidade Federal do Pará (UFPA) dos quais recebi imensa contribuição. Mas Reiterando o Obrigado ☺.

Outro grupo de colaboradores que não posso esquecer de mencionar e que sem eles nada disso seria possível é composta pelos funcionários da Nutreco (Daniela Nomura Varandas, Fernando, o peixe, Marcelo Toledo e Carlos), que formulou e confeccionou toda a ração experimental. À Ajinomoto (Gabriel e Mariana) que auxiliou desde a escrita do projeto e desenho experimental, bem como a doação de toda a arginina utilizada no experimento e a Piscicultura Toca da Tilápia (Marecelo Berriel) que forneceu o local para o experimento, toda a infra-estrutura, peixes e mão de obra (Gerson, Fernando e Carol), essenciais para a execução do projeto. Vale citar a Daniela Nomura Varandas que juntamente com a Fabiana Pilarski foram as maiores articuladoras para que tudo desse certo com essas parcerias, me ajudando e me ensinando a obter tudo que fosse necessário para conseguir fazer com que as empresas conseguissem nos ajudar.

Aos amigos feitos no Caunesp gostaria de agradecer especialmente ao Jandir, Manuel, Aldo, Juliana, Arno, Tainá, Santiago, Pitoco e Julian. As muitas cervejas tomadas e conversas sobre os mais variados assuntos.

Ao professor Luiz Edivaldo Pezzato, pelo incentivo e conselhos oferecidos ao longo do mestrado, fazendo parecer que o seu conhecimento sobre nutrição é pequeno frente aos demais assuntos conversados. A professora Margarida Maria Barros, que com certeza é uma fonte de inspiração e não deixa pergunta sem resposta, consegue construir uma aula a partir da demanda dos alunos. Ao professor Dalton José Carneiro, que participou da minha banca de qualificação e sempre se mostrou solícito em me ajudar nas dúvidas, por mais simples ou excêntricas que sejam. E por último, mas não menos importante, o professor João Batista Kochenborger Fernandes, que sempre me dá conselhos.

Ao CAUNESP e ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida e pelo financiamento do projeto intitulado: “Suplementação com arginina para tilápias criadas em tanques rede com alta densidade de estocagem e desafiadas com *Aeromonas hydrophilla*”, sob o processo de numero 470522/2012-7.

Como falei anteriormente, os envolvidos são muitos e cada um contribuiu com uma parcela para a realização desse sonho.

Vou fazer mais alguns agradecimentos, aos meus pais, meus maiores incentivadores, cada um do seu jeito e meus familiares, que me devolvem a sensação de que tenho um lar quando os vejo. E inúmeros amigos, Jefferson Cartaxo, Ryuller, Higo Abe, Joel, Cordeiro, Claucia, Valeria, Natalino.

Índice

Capítulo 1 - Arginina e os peixes	10
Resumo e abstrac	11
Introdução geral	12
Revisão bibliográfica	15
Arginina e seu efeito no sistema digestivo e na absorção de nutrientes	15
Digestibilidade e arginina circulante no plasma	16
Analitos e enzimas relacionadas a dieta	17
Parâmetros hematológicos	19
Expressão gênica e secreção de hormônios	21
Função hepática	23
Resposta imunue e oxidativa	23
Índices corporais	26
Composição química corporal	27
Desempenho produtivo	29
Excreção de compostos nitrogenados	35
Considerações finais	36
Referencias Bibliográfica	36
Capítulo 2 - Suplementação de arginina na dieta de tilápias cultivadas em tanque-rede	46
Resumo e abstract	48
Introdução	49
Material e métodos	50
Resultados	57
Discussão	59
Conclusão	65
Agradecimentos	65
Referências bibliográficas	65
Capítulo 3 - Considerações Finais	77
Considerações finais	78

Índice de figuras

Capítulo 2 - Suplementação de arginina na dieta de tilápias cultivadas em tanque-rede

Figura 1. Fotomicrografia de brânquias de tilápias cultivadas em tanque rede. 75
A: tratamento controle, 2,3% de arginina; brânquias apresentando congestão (seta), fusão lamelar (chave) e parasitas (circulo) 1000x- HE. B: 2,3% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave), destacamento epitelial (seta) e aneurisma (circulo) 1000x- HE. C: 2,9% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave), destacamento epitelial (seta) e parasita (circulo) 1000x- HE. D: 3,5% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave) 1000x- HE. E: 4,1% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave) e congestão (seta) 1000x- HE.

Índice de tabela

Capítulo 1 - Arginina e os peixes

Tabela 1. Analitos e enzimas avaliadas por diferentes autores e seu comportamento em relação ao acréscimo de arginina na dieta.	17
Tabela 2. Parâmetros hematológicos e hematimétricos de peixes submetidos a suplementação com diferentes níveis de arginina.	19
Tabela 3. Secreção de hormônios no plasma e expressão gênica em diferentes tecidos em função da concentração de arginina na dieta.	21
Tabela 4. Parametros dos sistema imunológico avaliados pelos diferentes autores em função da suplementação de arginina na dieta.	24
Tabela 4. Tabela 5. Composição bromatológica de peixes submetidos a experimentos de dose-resposta de arginina.	27
Tabela 6. Desempenho produtivo de peixes submetidos a experimentos de dose resposta com a suplementação de arginina na dieta.	33

Capítulo 2 - Suplementação de arginina na dieta de tilápias cultivadas em tanque-rede

Tabela 1- Composição bromatológica e níveis de suplementação de arginina nas dietas experimentais.	70
Tabela 2. Desempenho produtivo de tilápias alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de Arginina baseadas em porcentagem da matéria seca na dieta.	71
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de tilápias alimentadas com dietas suplementadas com diferentes concentrações de arginina.	72
Tabela 4. Parâmetros hematológicos de tilápias alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de arginina.	73
Tabela 5. Índices morfológicos do fígado e baço de tilápias alimentadas com dieta suplementada com diferentes concentrações de arginina.	74

Capítulo 1

Arginina e os peixes

Resumo

Essa revisão aborda os efeitos da suplementação com arginina na saúde e nos aspectos produtivos em peixes. A utilização de arginina na dieta mostrou influência na resposta fisiológica dos peixes de acordo com a dose empregada. Os aspectos estudados pelos autores foram agrupados em dez temas principais: efeitos da arginina no sistema digestório e na absorção de nutrientes; digestibilidade e arginina circulante no plasma; analitos e enzimas relacionadas à dieta; índices hematológicos; expressão gênica e secreção de hormônios; função hepática; resposta imune e oxidativa; índices corporais; composição bromatológica e desempenho produtivo. A arginina exerce um efeito significativo no desempenho produtivo e nas variáveis relacionadas à retenção de nutrientes. Sua associação com o aumento da excreção de nitrogênio pelos peixes é evidente, contudo, a interação entre lisina e arginina ainda precisa ser mais investigada pois não está clara a existência de um antagonismo entre esses aminoácidos. Em sanidade, não está elucidada a resposta das variáveis em consequência à suplementação de arginina. A realização de desafios, seja por manejo ou por infecção bacteriana, mostrou-se uma excelente ferramenta para avaliar o efeito imunestimulante desse aminoácido. Devido sua liberação por células fagocíticas e sua ação bactericida, a síntese de óxido nítrico pela arginina é de extrema importância. Dessa forma, a arginina exibe elevado potencial como aditivo dietário.

Palavras chave: piscicultura, desempenho produtivo, aminoácidos, sanidade, tilápia

Abstract

This review explores the effects of arginine supplementation in health and productive aspects of fish. The use of arginine in diet showed influence on fish physiological response according to the dose applied. The aspects studied by the authors were grouped into ten main themes: effects of arginine in the digestive system and absorption of nutrients; digestibility and circulating arginine in plasma; analytes and enzymes related to diet; hematological indices; gene expression and hormone secretion; liver function; and oxidative immune response; body indexes; chemical composition and productive performance. Arginine has a significant effect on growth performance and on variables related to nutrients retention. Is evident its association with increased nitrogen excretion by fish, however, interaction between lysine and arginine needs to be further investigated since it is not clear the presence of antagonism between these amino acids. In health, is not elucidated variables response due to arginine supplementation. The challenges performances, either by management or by bacterial infection, have proved being an excellent tool to assess the effect of this amino acid immunostimulant. Due to its release by phagocytic cells and its bactericidal action, nitric oxide synthesis by arginine is extremely important. Thus, arginine displays high potential as dietary additive.

Keywords: fish farming, productive performance, amino acids, fish health, tilapia

INTRODUÇÃO

A criação de peixes em tanques-rede é uma atividade que vem crescendo mundialmente, sendo caracterizada como um sistema intensivo de criação, com características de manejo próprias e por utilizar altas densidades de estocagem aumenta a produtividade, apresenta vantagens do ponto de vista técnico, ecológico, social e econômico em relação ao extrativismo e a piscicultura em viveiros escavados (Ono e Kubitza, 2003). Porém, nesse sistema de produção há uma dependência muito grande do alimento fornecido aos animais, o qual deve ser uma dieta balanceada, que forneça em quantidade e qualidade todos os nutrientes necessários para a manutenção, crescimento e saúde desses animais (Sosinski, 1996).

Dentre os peixes criados em tanques-rede, a tilápia é a espécie que tem apresentado as melhores características para esse sistema produtivo. É um peixe de grande aceitação no mercado interno e externo, possui uma alta taxa de crescimento, resistência a doenças, facilidade de manejo e consumo de alimento artificial (Stickney *et al.*, 1979; Shiau e Huang, 1989; Sosinski, 1996). No Brasil em 2009, foram produzidas 132.957,8 toneladas de tilápias, constituindo-se como o “carro chefe” da produção aquícola nacional (MPA, 2013).

Embora a produção nacional de tilápias seja realizada principalmente a partir do cultivo em tanque-rede, poucos estudos foram realizados envolvendo a nutrição e a sanidade dessa espécie nesse sistema de criação. Esse é um fator relevante, pois, no tanque-rede o limiar de equilíbrio entre o hospedeiro-patógeno-ambiente é muito frágil. Os animais nesse sistema estão submetidos constantemente a forte estresse, devido principalmente a alta densidade de estocagem e as variações na qualidade de água, correnteza e má nutrição, fatores que propiciam grandes surtos de doenças oportunistas provocando prejuízos (Fujimoto, 2010).

Com base nessas informações, nota-se a relação intrínseca entre a nutrição e a sanidade, pois, os estímulos estressantes determinam o aumento da demanda de energia, proteínas, minerais e de vitaminas dos compartimentos de reserva (Anderson, 1994), que se forem esgotadas podem causar prejuízos ao crescimento e a função imune, além de outros efeitos deletérios (Montero *et al.*, 1999).

Outro fator importante neste tipo de sistema, é que os animais estão continuamente expostos, juntamente com a alta densidade de estocagem, a locais com intensa correnteza de água, a qual exige natação frequente dos animais, podendo ocasionar fadiga muscular, prejudicando o seu crescimento. Esse cenário é verificado em diferentes peixes como no caso de *Salvelinus alpinus* (Christiansen *et al.*, 1992) e *Brycon cephalus* (Arbeláez-Rojas e Moraes, 2009), onde a alta densidade de estocagem aliada à natação sustentada provocou diminuição do desempenho produtivo.

Com relação à sanidade, a alta densidade de estocagem praticada se torna relevante, pois pode atingir de 60-200 Kg/m³ e provocar estresse crônico nos animais e altas taxas de mortalidade, devido a elevação do cortisol plasmático, que atua como agente imunossupressor, comprometendo o sistema de defesa orgânica (Belo, 2002). O estresse provocado também aumenta a demanda de energia pelos peixes, aumenta a excreção de metabólitos, diminui o aproveitamento de nutrientes e aumenta o consumo

da energia de reserva (glicogênio), ocasionando um aumento das exigências alimentares e nutricionais (Anderson, 1994; Papoutsoglou *et al.*, 1998). Além disso, a proximidade entre os animais e a presença de diferentes organismos patogênicos na água, favorece o desequilíbrio da tríade patógeno-hospedeiro-ambiente, favorecendo na maioria das vezes o patógeno (Eiras *et al.*, 2000).

Assim, devido a dependência da dieta nutricionalmente balanceada, do aumento da exigência de nutrientes devido ao estresse e da fadiga muscular que pode ocorrer nesse tipo de sistema de criação, a arginina surge como uma opção para melhorar o desempenho produtivo e aumentar a resistência às doenças de tilápias criadas nesta condição.

A arginina é um aminoácido considerado essencial para os peixes (NRC, 1993), sendo também considerado um aminoácido versátil, que participa de diversas atividades metabólicas (Tesser *et al.*, 2005). Esse aminoácido tem como principais funções: a participação na síntese de proteína muscular; é precursor de diferentes substâncias biologicamente importantes, como poliaminas e óxido nítrico; participa da síntese de uréia, de creatina, do hormônio de crescimento e do IGF1 (insulina como fator de crescimento) (Ahmed e Khan, 2004; Kuçukbay *et al.*, 2008; Khan e Abidi, 2011).

Dentre todas essas funções, destaca-se a importância desse aminoácido como precursor do óxido nítrico, que é um importante vasodilatador e microbicida. Essa vasodilatação ocasionada pelo óxido nítrico possibilita aumento da perfusão muscular, permitindo a diminuição do consumo de glicose pela respiração anaeróbica, evitando assim a fadiga muscular, melhorando o desempenho produtivo dos animais (Angeli *et al.*, 2007, Fayh *et al.*, 2007).

Em humanos a atuação da arginina na produção de substância vasodilatadora e promoção de melhor desempenho foi verificada em atletas suplementados com arginina e posteriormente submetidos a exercícios físicos intensos, onde foi observado melhora a força contrátil do músculo e aumento da massa muscular (Angeli *et al.*, 2007), porém em peixes isso ainda não foi avaliado.

Além do efeito vasodilatador, os macrófagos utilizam o óxido nítrico como microbicida para combater agentes infecciosos (Dusse *et al.*, 2003), melhorando assim o sistema imunológico inato. Esse efeito pôde ser verificado em peixes como *Ictalurus punctatus* infectados com *Edwardsiella ictaluri* (Buentello e Gatlin, 2001) e em *Solea senegalensis* infectados com *Photobacterium damsela* (Costas *et al.*, 2011), porém estudos dessa natureza para tilápias criadas em em tanques-rede são inexistentes.

A arginina também possui relação direta com o hormônio do crescimento (GH), sendo que níveis mais elevados de arginina no plasma sanguíneo ocasionam maior liberação de GH, devido ao efeito antagônico entre o nível de arginina no sangue e a liberação de somatostatina (Alba-Roth *et al.*, 1988). Em humanos e mamíferos, essa liberação do GH depende principalmente da quantidade de exercício físico realizado e da presença de aminoácidos na dieta, sendo que o aminoácido que provoca maior estimulação a liberação do GH é a arginina (Fayh *et al.*, 2007), em peixes isso não está totalmente esclarecido, mas o uso estratégico da arginina pode ser uma opção para se obter um maior crescimento dos peixes nesse sistema de produção.

Logo, a suplementação dietética com arginina se apresenta como alternativa para melhorar o desempenho produtivo e aumentar a resposta do sistema imunológico de tilápias produzidas em sistemas intensivos, como o tanque-rede, uma vez que, há controvérsias nos trabalhos realizados, quanto à exigência de arginina para a tilápia (Santiago e Lovell, 1988; Furuya *et al.*, 2004; Furuya *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2013). Santiago e Lovel (1988) determinaram a exigência da arginina em 1,08% da matéria seca e da lisina de 1,44% obtendo uma relação arginina:lisina de 0,82%.

Santiago e Lovel (1988) fazem a ressalva que para determinar a exigência de arginina, eles realizaram o experimento com uma suplementação maior de lisina (35%), o que pode ter alterado a relação entre os aminoácidos considerando a pesquisa de Jones *et al.*, (1967) que identificaram em frangos a competição da lisina com a arginina durante a reabsorção renal, resultando num aumento na concentração plasmática de lisina, na inibição da reabsorção de arginina e no aumento de sua excreção.

Furuya *et al.*, (2004) aplicando o conceito de proteína ideal, identificaram que a quantidade de arginina necessária na dieta para atender a exigência da tilápia é de 2,4%, obtendo-se uma relação arginina:lisina de 1,51. Furuya *et al.*, (2012) avaliaram a exigência nutricional de lisina, mantendo constante a relação arginina:lisina e determinaram que a exigência de lisina para a tilápia é de 1,51 com a relação arginina:lisina de 1:1,12. Furuya *et al.*, (2013) também determinaram a exigência de lisina digestível para a tilapia em 1,13% mantendo constante a relação arginina:lisina em 1,43%.

No entanto, esses trabalhos foram realizados com peixes de tamanhos diferentes e em sistemas de criação diferentes. Possivelmente Furuya *et al.*, (2013) utilizaram níveis mais altos de arginina em relação a lisina a fim de diminuir o efeito do estresse intrínseco ao sistema de produção empregado. Todavia, Yue *et al.*, (2013) foram os únicos autores que objetivaram determinar a exigência nutricional da arginina para a tilápia e seu efeito no sistema imunológico da espécie. O valor determinado pelos autores foi de 1,51% de arginina e a relação arginina:lisina obtida foi de 2,43. Esse estudo não atendeu a exigência em lisina apresentada na formulação das dietas das publicações realizadas com tilápias (Furuya *et al.*, 2004; Furuya *et al.*, 2012; Furuya *et al.*, 2013) e foi formulada com uma dieta purificada, o que dificulta sua aplicação prática.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A arginina é um aminoácido essencial para peixes (Zhou *et al.*, 2011) e vários trabalhos têm demonstrado sua importância no aumento da produção aquícola. Estudar esse nutriente é relevante, pois, compõe as proteínas, nutriente que afeta diretamente o desempenho produtivo e os custos com alimentação, podendo poluir a água por compostos nitrogenados (Gaylord e Barrows, 2009) e comprometer a saúde dos peixes.

A arginina é a transportadora de nitrogênio mais abundante nas proteínas dos tecidos corpóreos sendo usado em várias vias metabólicas, incluindo a de enzimas-chaves como a arginase, o óxido nítrico, a arginil-ARNt-sintetase, entre outras (Morris, 2006; Wu *et al.*, 2009; Pohlenz *et al.*, (2013). É precursora da síntese de creatina, ornitina, prolina, glutamato, poliaminas e óxido nítrico (Wu *et al.*, 2004; Morris, 2006; Yao *et al.*, 2008), desempenha um papel fundamental na reprodução e desenvolvimento dos peixes, devido a sua capacidade de ativar a produção de hormônios que promovem a eficiência na utilização de nutrientes (Yao *et al.*, 2008; Wu, 2010; Wu *et al.*, 2009; Pohlenz *et al.*, 2013) sendo fundamental no sistema imune dos peixes (Landolt, 1989; Lall, 1994).

Considerando as informações descritas acima, essa revisão procurou estudar os trabalhos com as mais diferentes abordagens sobre a arginina, a fim de identificar o efeito de baixas e elevadas suplementações desse aminoácido na saúde dos peixes e consequentemente no desempenho produtivo dos peixes, a fim de traçar um perfil sobre o uso do mesmo.

A maioria das pesquisas que objetivaram avaliar o efeito da suplementação alimentar com arginina nos peixes focaram no desempenho produtivo dos animais e em uma escala menor na composição corporal e na retenção de nutrientes (Ahemed e Khan, 2004; Ahemed, 2013; Alan *et al.*, 2002b; Daikiri *et al.*, 2013; Farhat *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011). Algumas pesquisas investigaram o efeito da arginina na concentração e distribuição de enzimas digestivas no intestino associada a morfologia do trato intestinal (Chen *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2011). Um aspecto bem abordado pelos pesquisadores foi o efeito da arginina nos produtos proteicos e resíduos nitrogenados e também o entendimento da expressão gênica associada ou não a secreção de hormônios (Lall *et al.*, 1994; Berge *et al.*, 1997; Tulli *et al.*, 2007; Fornier *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011 ; 8, Barziza *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2014; Tesser *et al.*, 2005; Pohlenz *et al.*, 2013; Buentelo *et al.*, 2000; Alan *et al.*, 2002a). Todavia, a área que requer mais estudos está relacionada ao efeito da arginina no sistema imunológico, pois, vários pontos ainda permanecem desconhecidos.

Arginina e seu efeito no sistema digestório e na absorção de nutrientes

O primeiro efeito da arginina ocorre após a ingestão do alimento e está relacionado com a atividade das enzimas intestinais (Chen *et al.*, 2011). A suplementação de arginina relacionada à atividade das enzimas digestivas demonstrou que um aumento na inclusão de arginina provocou aumento da atividade da tripsina, quimotripsina e da amilase sintetizada pelo pâncreas e a atividade de diversas enzimas digestivas no intestino, correlacionando-se positivamente com a taxa de crescimento

específico (Chen *et al.*, 2011). Já os valores de lipase se mantiveram constante evidenciando que a arginina não tem efeito sob esse parâmetro (Chen *et al.*, 2011).

Com base nesses dados os autores inferiram que a arginina e seus produtos possuem um papel importante na absorção e digestão (Chen e Shi, 2007) e ressaltaram que os metabólitos da arginina, tais, como poliaminas e o óxido nítrico podem estar envolvidos nos efeitos benéficos sobre o aparelho digestório e atividades enzimáticas de absorção de nutrientes.

Chen *et al.*, (2011) também observaram que o aumento do nível de arginina no intestino promoveu melhora desenvolvimento do trato digestório, aumento da das vilosidades e da alturas dos vilos, da atividade das enzimas digestivas e da absorção de nutrientes, além de possibilitar a colonização do trato intestinal por bactérias benéficas como os *Lactobacillus* e diminuir a população de bactérias patogênicas como de *Aeromonas* e *E. coli* (Wu *et al.*, 1995; Hurt *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2011).

A melhora na morfologia do sistema digestório dos peixes também foi observada por Cheng *et al.*, (2011) que observaram na suplementação dietética com arginina ou um pool de arginina e glicina mudanças significativas na morfometria do trato gastrointestinal do robalo (*Sciaenops ocellatus*), com aumento da altura das microvilosidades e dos enterócitos, resultando no aumento da altura das dobras da porção proximal e média do intestino, favorecendo um aumento na área do intestino disponível para absorção de nutrientes.

Digestibilidade e arginina circulante no plasma

Além de estudos sobre a influencia da arginina na modulação enzimática do intestino, na morfologia do sistema digestível e na população bacteriana intestinal dos peixes também foi investigado o efeito da arginina sobre a digestibilidade dos macronutrientes, outros aminoácidos e da quantidade dos produtos desses nutrientes no plasma sanguíneo.

Kaushik *et al.*, (1988) avaliaram quatro dietas com níveis crescentes de arginina para a truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) e não observaram diferenças significativas nos índices de digestibilidade de matéria seca, proteína bruta e dos aminoácidos, evidenciando que a arginina não exerce efeito na digestibilidade dos aminoácidos e macronutrientes. Zhou *et al.*, (2011) observaram que o atendimento da relação arginina:lisina é o fator responsável pela manutenção dos índices de digestibilidade da matéria seca, proteínas, arginina e lisina mas não identificaram efeito da suplementação dietética com arginina ou lisina sobre a digestibilidade de lipídeos. Os autores apontaram que o acréscimo na inclusão da lisina provocou a diminuição nos valores da digestibilidade da matéria seca, proteínas, arginina e lisina mas a manutenção da relação argina:lisina, aumentando ou diminuindo a inclusão dos dois aminoácidos simultaneamente não provocou a diminuição significativa da digestibilidade dos nutrientes citados.

No plasma Walton *et al.*, (1986), Berge *et al.*, (1997) Lall *et al.*, (1994), Cho *et al.*, (1992) e Barziza *et al.*, (2000) identificaram que os peixes com maior concentração desse aminoácido apresentaram os melhores resultados de ganho de peso, conversão alimentar e retenção de proteína. Pohlenz *et al.*, (2013) também observaram essa

associação em suas pesquisas e atribuíram essa melhora no desempenho produtivo ao aumento das poliaminas plasmática, produto da arginina, que induz respostas de crescimento mais potentes (Wilson e Poe, 1974; Mommsen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009; Wu, 2010).

Nguyen *et al.*, (2014) não identificaram efeito significativo das diferentes concentrações de arginina utilizadas na dieta nos aminoácidos livres no plasma de cobia (*Rachycentron canadum*) indicando que esse aminoácido parece não influenciar negativamente a absorção dos demais aminoácidos. Griffin *et al.*, (1994) utilizando híbridos de *Morone saxatilis* x *Ai. chrysops* e Alan *et al.*, (2002a) utilizando juvenis de *Paralichthys olivaceus* demonstraram que o aumento na suplementação de arginina ou lisina na dieta não interfere significativamente na quantidade de lisina ou arginina livre no plasma. Contudo Barash (1984) identificou que a suplementação elevada de lisina provocou redução no nível de arginina no plasma de *Salmo gairdnerii*.

Kaushik e Fauconneau (1984) estudando *Salmo gairdnerii* e Berge *et al.*, (1997) estudando o *Salmo salar*, observaram que o aumento de arginina na dieta provocou a diminuição nas concentrações plasmáticas e musculares de lisina associada com a diminuição da ingestão alimentar. Kaushik e Fauconneau (1984) e Berge *et al.*, (1997), identificaram que os sítios de absorção de nutrientes apresentaram menor afinidade de absorção da lisina ao invés da arginina e atribuíram esse quadro a concentração maior da lisina na dieta natural da espécie, fazendo com que a mesma priorize absorver arginina.

Assim, a arginina parece não interferir na digestibilidade dos nutrientes. Os níveis de arginina no plasma estão associados ao incremento no desempenho produtivo de uma dada espécie e parecem não interferir na quantidade de outros produtos proteicos no plasma. As pesquisas realizadas demonstram que não é uma regra o antagonismo entre a lisina e a arginina nos peixes.

Analitos e enzimas relacionadas à dieta

A arginina tem um papel fundamental no metabolismo de proteínas, por isso, varias pesquisas foram realizadas investigando o efeito da suplementação dietética da arginina nos analitos e enzimas relacionadas ao metabolismo das proteínas no plasma dos peixes, a fim de identificar quais parâmetros sofrem efeito desse aminoácido, a compilação das associações encontradas pelos diferentes autores esta exposta na tabela 1.

Tabela 1. Analitos e enzimas avaliadas por diferentes autores e seu comportamento em relação ao acréscimo de arginina na dieta.

Parâmetro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Arginase	=	=	+	*	+	=	+			=			+
Ornitina ¹			+						+	*	+		
Ornitina ²			+										
OCT				*	*								
GDH				*	-								
Glutamato								=			+	=	
Glutamina								=			+	=	
Glicina								=				=	

Citrulina	=	+	=
ODC		+	

Associação positiva (+), não mensurável (=) ou negativa (-).

1, Lall *et al.*, (1994); 2, Walton *et al.*, (1986); 3, Berge *et al.*, (1997); 4, Tulli *et al.*, 2007; 5, Fournier e Fauconeone, (2003); 6, Zhou *et al.*, 2012; 7, Zhou *et al.*, 2011 (fígado); 8, Barziza *et al.*, (2000); 9, Gao *et al.*, (2014); 10, Tesser *et al.*, (2005); 11, Pohlenz *et al.*, (2013); 12 Buentelo *et al.*, (2000); 13 Alan *et al.*, (2002b); * apresentado nos resultados.

OCT, ornitina carbomil transferase; GDH, glutamato desidrogenase; ODC, ornitina descarboxilase.

¹ plasma, ² musculo.

O aumento das pesquisas relacionadas com os analitos e enzimas pode ser atribuído a limitação da determinação da exigência nutricional dos peixes baseando-se somente em dados de desempenho produtivo e a investigação dos parâmetros bioquímicos ser uma ferramenta que complementa os resultados de desempenho produtivo (Alam *et al.*, 2002a).

Tulli *et al.*, (2007), Berge *et al.*, (1997), Fournier *et al.*, (2003) e Zhou *et al.*, (2011) indentificaram que a arginase tende a aumentar com o aumento de arginina na dieta. Tulli *et al.*, (2007) demonstraram que existe uma forte relação entre a ingestão de arginina, a atividade da arginase e a excreção de ureia no *Dicentrarchus labrax*, confirmando que a suplementação alimentar com arginina desempenha um papel importante na modulação do catabolismo da arginina, bem como na síntese e excreção de uréia. Berge *et al.*, (1997) demonstraram que a ornitina assim como a arginina plasmática responde positivamente com a suplementação de arginina na dieta.

A enzima ornitina descarboxilase (ODC), que catalisa a síntese de putrescina a ornitina e limita a velocidade da síntese de espermidina e espermina (Benfey *et al.*, 1994) foi avaliada por Zhou *et al.*, (2011) e os autores observaram resposta positiva com o aumento de arginina na dieta, indicando que essa enzima pode ser avaliada em estudos que tentam entender o efeito da arginina no desempenho produtivo dos peixes. Pohlenz *et al.*, (2013) observaram que nos peixes alimentados com dieta suplementada com níveis elevados de arginina (acima de 1%) não foi observado aumento significativo de arginina no plasma, mas sim dos seus produtos (glutamato, glutamina, citrulina e ornitina), indicando que esses produtos podem ser utilizados na biosíntese de poliaminas, mas principalmente que talvez sejam os parâmetros bioquímicos corretos para se avaliar em ensaios que objetivam determinar a exigência de arginina para uma dada espécie de peixe.

As pesquisas realizadas por Barziza *et al.*, (2000) e Buentelo *et al.*, (2000) não observaram diferenças significativas nos valores de glutamato, glicina, glutamina, citrulina e ornitina, indicando que ainda não é possível provar que os peixes realizam a endossíntese de arginina a partir de fontes de glutamina ou glutamato.

Já as pesquisas realizadas por Tulli *et al.*, (2007) e Fournier *et al.*, (2003) observaram que o comportamento do OCT e GDH não depende da suplementação dietética. Lall *et al.*, (1994) e Zhou *et al.*, (2012) apontaram que não é possível

estabelecer a exigências de arginina a partir da atividade de arginase no fígado e no rim de peixes submetidos a experimentos de dose-resposta de arginina.

Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos são considerados bons indicadores da condição de saúde dos peixes, principalmente em resposta a suplementação alimentar (Congleton e Wagner, 2006; Buentello *et al.*, 2007). As pesquisas que avaliaram o efeito da arginina nos parâmetros hematológicos de diferentes espécies de peixes estão espostos na tabela 2, sendo possível identificar se a suplementação com arginina teve uma associação positiva (+), não mensurável (=) ou negativa (-).

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e hematimétricos de peixes submetidos a suplementação com diferentes níveis de arginina.

Parâmetros Hematológicos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tratamentos	4	6	6	6	5	6	6	6	6
Variação arginina (g/kg de ração)	3,5	,	1	1	1,1 4	1,2	1,2 6	2,1	1,6 1
Peso final (g)	35	>5 7	>1 5	>1 6	>6 0	>2 4	>1 8	>4 8	>4 2
Eritrócito	+	+ *	+		=		=		
Hemoglobina	+		+		=		=	=	
Hematócrito	+	+ *	+	=	=		=	=	
Volume Corpuscular Médio VCM	=								
Taxa de sedimentação dos eritrócitos (ESR)			-						
Proteína plasmática	-	=				+		+	+
Leucócitos	=	- *			=				
Trombócitos		- *							
Limfócitos	=	-							
Eusínófilos	=								
Heterófilo	x								
Neutrófilos		+ *							
Monócitos	=	X							

Associação positiva (+), não mensurável (=) ou negativa (-).

1, Buentello *et al.*, (2007); 2, Costas *et al.*, (2012); 3, Khan e Abid, (2012); 4, Tesser *et al.*, (2005); 5, Yue *et al.*, (2013); 6, Zhou *et al.*, (2012a); 7, Zhou *et al.*, (2012b); 8, Rahimnefad *et al.*, (2014); 9 Zhou *et al.*, (2010); *peixes sob estresse, após 60 dias (variação em relação ao tratamento controle, sem estresse); x, com diferenças significativas, mas sem associação com o nível de inclusão de arginina.

Em relação as células sanguíneas da série vermelha (eritrócito, hemoglobina, hematócrito, VCM e ESR) pode se observar dois comportamentos: no primeiro os parâmetros aumentaram até um determinado limite com a inclusão de arginina na dieta (Buentello *et al.*, 2007; Costas *et al.*, 2012; Khan e Abid, 2011). A justificativa atribuída por Buentello *et al.*, (2007) para o aumento de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito é

que a arginina possui um papel fisiológico nos processos hematopoéticos (Goldsby *et al.*, 2003). O segundo comportamento observado em relação às células vermelhas foi a não alteração no número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, VCM e ESR (Tesser *et al.*, 2005; Yue *et al.*, 2013; e Rahimnejad *et al.*, 2014) indicando que a eritropoiese nos peixes não é sensível a alterações nas concentrações de arginina nas dietas (valores de arginina utilizados entre 1% e 2,1%).

Costas *et al.*, (2012) após submeter os peixes à exposição aérea em dias alternados durante 60 dias observaram que os peixes estressados apresentaram aumento nas variáveis hematológicas citadas anteriormente, evidenciando que os peixes realizaram uma adaptação fisiológica e que a mesma conseguiu aumentar a oxigenação dos tecidos.

Khan e Abid (2011) variaram a suplementação de arginina na dieta (1%) de juvenis de *Heteropneustes fossilis* (>15g) e o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito responderam significativamente com a suplementação de arginina. A resposta obtida pode ser atribuída ao tamanho dos animais utilizados, demonstrando que peixes menores podem ser mais sensíveis a suplementação com arginina. Contudo, a não determinação do VCM pelos autores impossibilita identificar se o aumento do hematócrito foi consequência do aumento do tamanho das células ou da eritropoiese.

Buentello *et al.*, (2007) e Yue *et al.*, (2013) não identificaram efeito positivo da arginina sobre os parâmetros hematológicos da série branca. Goldsby *et al.*, (2003) aponta que as células-tronco hematopoiéticas pluripotentes são mantidas em níveis estáveis a menos que ocorra uma demanda para aumentar a hematopoiese, situação que não ocorreu nos experimentos desses autores.

Costas *et al.*, (2012) não observou aumento dos leucócitos, exceto dos neutrófilos, e atribuiu esse quadro ao estresse crônico que os peixes foram submetidos, que reduziu o número de linfócitos circulantes após 60 dias de estímulo e provocou a diminuição na disponibilidade de energia e nutrientes no sistema imunológico, diminuindo a sua eficácia levando-o à depressão ou a supressão imune modulada pelo cortisol (Verburg-van Kemenade *et al.*, 2009).

Buentello *et al.*, (2007) observaram mudança significativa no número de heterófilos e atribuíram esse comportamento a regulação da secreção de citocinas de forma diferente para esse tipo de célula (Secombes *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 2004). Os resultados obtidos por Costas *et al.*, (2012) e Buentello *et al.*, (2007) demonstram que os neutrófilos são as primeiras células brancas a responderem positivamente a suplementação dietética com arginina, os peixes sendo submetidos a estresse ou não.

Em relação aos níveis de proteína plasmática, os autores supra citados observaram uma associação positiva entre o nível de inserção de arginina e o valor das proteínas plasmáticas, essa resposta pode ser atribuído a capacidade da arginina promover a síntese de proteínas e não estar ocorrendo um aumento da exigência das mesmas para a hematopoese (Barbul *et al.*, 1985; Lancaster, 1992). Contudo, Buentello *et al.*, (2007) identificaram a diminuição significativa nesse parâmetro com o aumento da suplementação de arginina e Costas *et al.*, (2012) não observou mudança significativa nas proteínas plasmáticas, fato que pode explicar a diminuição dos

leucócitos observada em seu estudo nos peixes submetidos ao estresse, pois, pode indicar que não ocorreu o aporte necessário de nutrientes para os peixes sob estresse aumentarem a atividade leucocitária.

Resumidamente, o efeito da suplementação dietética com arginina nas células vermelhas fica mais evidente nos experimentos com maior amplitude de suplementação de arginina, em peixes mantidos sobre estresse e de menor porte. Nas células brancas o efeito positivo da arginina ocorre nos neutrófilos. E a proteína plasmática tende a aumentar quando os peixes não são expostos a uma condição de estresse (sem alterar os índices hematológicos da série vermelha) ou diminuir quando os índices da serie vermelha se alteram e os peixes não estão sobre estresse.

Expressão gênica e secreção de hormônios

Investigar o efeito da arginina na secreção de hormônios é importante uma vez que esse aminoácido desempenha um papel fundamental na reprodução e desenvolvimento dos peixes, devido a sua capacidade de ativar a produção dos hormônios que promovem a eficiência na utilização de nutrientes (Yao *et al.*, 2008; Wu, 2010; Wu *et al.*, 2009; Pohlenz *et al.*, 2013). E Investigações no campo da proteômica tendem a crescer em ensaios de nutrição de peixes, uma vez que, o estudo da expressão do proteoma de um organismo, o resultado final da expressão dos seus genes, permite compreender os efeitos estruturais e funcionais causados por fatores ambientais, incluindo a nutrição (Conceição *et al.*, 2009).

O compilado de pesquisas apresentadas nessa revisão permite identificar que os autores focaram em investigar principalmente o efeito da arginina na produção de insulina, hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1), tabela 3.

Tabela 3. Secreção de hormônios no plasma e expressão gênica em diferentes tecidos em função da concentração de arginina na dieta.

Hormônio	Efeito	Observação	Autor
GH, hormônio do crescimento	Constante	Plasma	Lall <i>et al.</i> , 1994
	Constante	Plasma	Pohlenz <i>et al.</i> , 2013
	Aumento	Plasma	Zhou <i>et al.</i> , 2011
	Aumento	RNA	Chen <i>et al.</i> , 2012
Insulina	Constante	Plasma	Lall <i>et al.</i> , 1994
	Constante	RNA	Chen <i>et al.</i> , 2012
	Constante	Plasma	Pohlenz <i>et al.</i> , 2013
IGF-1, fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1	Constante	Plasma	Zhou <i>et al.</i> , 2011
	Diminuiu	RNA	Pohlenz <i>et al.</i> , 2013
	Aumento	RNA	Chen <i>et al.</i> , 2012
	Constante	Plasma	Pohlenz <i>et al.</i> , 2013
T3, tri-iodotironina	Constante	Plasma	Pohlenz <i>et al.</i> , 2013
T4, tiroxina	Constante	Plasma	Pohlenz <i>et al.</i> , 2013

gLYS, g-type lysozyme	Aumento	RNA	Costas <i>et al.</i> , 2011
HIF-1 fator de indução de hipóxia	Aumento	RNA	Costas <i>et al.</i> , 2011
HAMP-1, Hepcidin antimicrobial peptide 1	Aumento	RNA	Costas <i>et al.</i> , 2011
MIP-1-alpha, Macrophage inflammatory protein 1a	Aumento	RNA	Costas <i>et al.</i> , 2011
TOR, target of rapamycin	*	RNA	Chen <i>et al.</i> , 2011
4E-BP, eIF4E-binding protein	*	RNA	Chen <i>et al.</i> , 2011
b-Actin	*	RNA	Chen <i>et al.</i> , 2011
NPY, neuropeptideo Y	Constante	RNA	Nguyen <i>et al.</i> , 2014
CCK, colecistocinina	Constante	RNA	Nguyen <i>et al.</i> , 2014

*Diferença significativa.

Em relação ao GH, a maioria das pesquisas sobre o efeito da suplementação dietética com arginina sobre esse aminoácido foram realizadas com mamíferos (Lall *et al.*, 1994) e observa-se que a injeção ou suplementação alimentar com arginina aumenta a liberação de GH e a resistência imunológica (Swanson, 1990). Lall *et al.*, (1994) não identificaram mudanças significativas no nível deste hormônio em salmão do atlântico (*Salmo salar*) e atribuiu essa resposta a natureza pulsátil de liberação do GH em peixes. Pohlenz *et al.*, (2013) não observaram aumento do GH no plasma do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), mas com um experimento complementar o autor foi capaz de distinguir um padrão de GH em bagres do canal, o que confirma a existência de uma secreção pulsátil de GH, como relatado por Lall *et al.*, (2000). Pohlenz *et al.*, (2013) observaram picos de GH a cada 4 horas quando alimentaram os peixes com dietas contendo níveis elevados de arginina (4%).

Chen *et al.*, (2012) estudando a espécie *Micropterus salmoides* constataram que a insulina não atua sobre o IGF ou expressão do GH e que a arginina exerce um efeito independente sobre a expressão gênica de GH e IGF-1, onde o IGF-I responde mais facilmente a suplementação de arginina que o GH. Pohlenz *et al.*, (2013) observaram que para o cat fish americano (*Ictalurus punctatus*) a expressão gênica e a secreção do IGF-1 relaciona-se com os efeitos de crescimento induzidos pela arginina. Já Zhou *et al.*, (2011) não identificaram nenhum efeito da arginina no IGF-1.

Em relação a insulina Lall *et al.*, (1994) não observaram diferença significativa no nível de insulina no plasma de salmões 6 e 18h após a alimentação com níveis crescentes de arginina na dieta, indicando que essa variável permanece constante no plasma sanguíneo e que os salmões são propensos a um aumento nos níveis de insulina somente quando alimentados com dieta suplementada com níveis de arginina maiores que os exigidos para a espécie.

No que se refere a expressão genica Costas *et al.*, (2011) avaliaram a expressão gênica do gLYS, HIF-1, HAMP-1 e do MIP1-alfa e identificaram que a expressão MIP1-alfa diminuiu paralelamente à suplementação com arginina e há uma relação linear inversa desse gene com o óxido nítrico. Já o aumento da expressão gênica do HAMP-1 com o aumento da arginina na dieta foi atribuído a maior disponibilidade de

poliaminas disponíveis para o crescimento e diferenciação dos leucócitos. E considerando o papel da HAMP-1, HIF-1, gLYS e genes MIP1-alfa sobre a imunidade inata, os autores inferiram que a dieta com 6,9% de arginina (maior concentração do aminoácido) pode ter estimulado a síntese de poliaminas e aumentando sua disponibilidade na proliferação de neutrófilos no rim cranial. O aumento da peroxidase plasmática nos peixes alimentados com o nível de 6,9% de arginina na dieta, variável associada a elevação de neutrófilos nos peixes reforça essa hipótese.

Chen *et al.* (2011) avaliaram a expressão gênica em cinco órgãos (músculo, hepatopâncreas, intestino anterior, médio e posterior) e identificaram que a maior expressão gênica de TOR ocorreu na porção anterior do intestino e do 4E-BP no intestino médio, todavia, não foram observadas diferenças significativas associadas a suplementação da arginina.

Anderson *et al.*, (2014) não identificou diferenças significativas na expressão gênica (espermidina, espermina acetiltransferase, S-adenosil metionina descarboxilase, carnitina palmitol transferase-1, acetil-CoA oxidase, acetil-CoA carboxilase) no fígado de *Salmo salar* alimentados com dietas contendo baixo ou elevado nível de arginina.

De um modo geral, o GH e o IGF-1 foram as variáveis que mais responderam a suplementação de arginina na dieta. Sendo que o GH aumenta com o aumento da arginina e o IGF-1 não apresentou um padrão de resposta, exceto quando aferido no plasma, onde permaneceu constante. E em relação a expressão genica o HAMP-1 e o MIP1-alfa respondem a suplementação com arginina, sendo que o MIP1-alfa apresenta uma relação linear inversa ao do óxido nítrico.

Função hepática

As enzimas AST (aspartato transaminase) e ALT (Alanina transaminase) são geralmente utilizadas como indicadoras de dano celular, tanto em mamíferos como em peixes e a sua concentração no plasma aumenta de acordo com o agente estressor (Raminejad *et al.*, 2014).

Três autores estudaram o efeito da arginina sobre o aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) (Chen *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011; Raminejad *et al.*, 2014). A ALT foi mais sensível a suplementação dietética com que o AST (Chen *et al.*, 2011). A sensibilidade da ALT está relacionada com a atividade de desaminação e transaminação de proteínas e indica o aumento do catabolismo de aminoácidos provocando a diminuição da eficiência de utilização proteica nas maiores concentrações de arginina na dieta (Zhou *et al.*, 2011) resultado semelhante ao obtido por Chen *et al.*, (2011).

Resposta imunue e oxidativa

Nos últimos anos, a função imune da arginina tem recebido atenção em estudos com peixes, pois a arginina é precursora da síntese do óxido nítrico e essa substância é importante em processos fisiológicos que controlam a neurotransmissão, agregação e adesão das plaquetas, proliferação celular e a atividade de macrófagos (Eddy e Tibbs, 2003; NRC, 2011; Ren *et al.*, 2013).

Os estudos que avaliaram a resposta imune nos peixes que receberam dietas suplementadas com arginina estão focados principalmente na avaliação do óxido nítrico, nitrito, atividade respiratória dos leucócitos (burst respiratório), lisozima, complemento, cortisol, taxa de fagocitose, mieloperoxidase, imunoglobulina e antiprotease (tabela 4). De modo geral pode se observar que não ocorre um padrão nas alterações dos valores dos parâmetros imunológicos, evidenciando que os mecanismos dos efeitos reguladores de arginina na dieta sobre a resposta imune em peixes ainda precisam ser melhor investigados (Ren *et al.*, 2014).

Tabela 4. Parametros dos sistema imunológico avaliados pelos diferentes autores em função da suplementação de arginina na dieta.

-	<u>1</u> <u>a</u>	<u>1</u> <u>b</u>	<u>2</u> <u>a</u>	<u>2</u> <u>b</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u> <u>a</u>	<u>7</u> <u>b</u>	<u>8</u>
<u>Oxido nítrico (μM)</u>	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\equiv$	$\pm$	
<u>Burst Respiratório (O.D)</u>	$\pm$	$\pm$	$\equiv$	$\pm$	$\approx$	$\equiv$					$\pm$
<u>Complemento (unidade/ml^{-1})</u>	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\equiv$							$\equiv$
<u>Mieloperoxidase (absorbância)</u>						$\pm$					
<u>Peroxidase (unidade/ml^{-1})</u>	$\equiv$	$\equiv$									
<u>Superoxide dismutase (%)</u>			$\equiv$	$\equiv$		$\equiv$	$\equiv$				
<u>inibição)</u>											
<u>Lysozyme (U ml^{-1})</u>	$\pm$	$\equiv$	$\equiv$	$\pm$	$\equiv$	$\pm$			$\equiv$	$\pm$	$\pm$
<u>Cortisol (ml^{-1})</u>			$\equiv$	$\equiv$							
<u>Immunoglobulina (mg ml^{-1})</u>						$\pm$					

1, Costas *et al.*, 2011, (*solea senegalensis*); 2, Costas *et al.*, 2013 (*Scophthalmus maximus*), 60 dias de experimento; 3, Pohlenz *et al.*, 2012 (*Ictalurus punctatus*); 4, Rahimnejad e Lee, 2014 (*Pagrus major*); 5, Ren *et al.*, 2013 (*Megalobrama amblycephala*); 6, Ren e Mai, 2014 (*Rachycentron canadum*); Yue *et al.*, 2013 (*Oreochromis niloticus*); 8, Zhou *et al.*, 2012 (*Micropterus salmoides*);
a, controle, b, sob estresse.

O óxido nítrico (NO) é o parâmetro que mais responde positivamente a suplementação de arginina na dieta dos peixes. Todos os autores observaram aumento do oxido nitrico em seus experimentos (Costas *et al.*, 2011; Costas *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014; Rahimejad *et al.*, 2014; Yue *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

Yue *et al.*, (2013) observaram esse aumento somente após os peixes terem sido desafiados com bactérias, apontando que o efeito imuno-estimulante da arginina é mais promissor em peixes em condições de estresse. Esses autores destacaram a importância da realização de desafios nos peixes submetidos a experimentos de dose resposta de arginina a fim de identificar o efeito da arginina na resposta ao estímulo estressante e na modulação da resposta adaptativa ao estresse, uma vez que a condição de homeostase dos animais pode mascarar o ponto onde a suplementação extra do nutriente provoca aumento da resposta imune.

Resultado semelhante ao observado por Yue *et al.*, (2013) foi encontrado por Costas *et al.*, (2011), que identificaram aumento do óxido nítrico nos peixes expostos a estresse crônico (exposição aérea) e atribuíram esse quadro ao aumento do cortisol provocado pelo estresse que atuaria nas células do rim cefálico (macrófagos, neutrófilos

e alguns linfócitos) realizando um efeito inibitório da apoptose dos neutrófilos que induzem o aumento do óxido nítrico. Zhou *et al.*, (2012) identificaram que os níveis de TNOS (total de óxido nítrico) no plasma respondem melhor a suplementação de arginina na dieta do que o INOS (óxido nítrico celular), contudo, os peixes não estavam sob estresse.

Costas *et al.*, (2011) identificou que a atividade respiratória dos leucócitos (burst) aumenta com o incremento de arginina na dieta mas apontaram que é normal uma diminuição desta variável quando os peixes são expostos a estresse, como a manipulação, anoxia, adensamento e injeção de cortisol. Contudo, esses autores ponderaram que o aumento do burst associado ao aumento do óxido nítrico resulta na formação do ânion superóxido, que pode gerar peroxinitrito, que tem uma atividade citotóxica elevada.

Cheng *et al.*, (2011) apontam que a glutamina associada à arginina também pode influenciar significativamente na produção de radicais oxidativos pelos neutrófilos. Buentello e Gatlin (1999) também observaram efeito sinérgico da arginina e da glutamina sobre a produção de óxido nítrico (INOS) pelos macrófagos em *Ictalurus punctatus* quando ambos os aminoácidos foram incorporados em meios de cultura.

Costas *et al.*, (2011) observaram efeito positivo na lisozima após a inclusão de arginina na dieta. Cheng *et al.*, (2011) identificaram que a lisozima aumentou após a inclusão de glutamina ou arginina na dieta, todavia, só foi observada diferença significativa após a combinação de arginina e glutamina (1% de cada). E Yue *et al.*, (2013) não observaram alterações significativas na lisozima de peixes que receberam diferentes concentrações de arginina na dieta, exceto quando submetidos a estresse. No entanto, essa resposta só foi maximizada em um determinado grupo, os tratamentos com excesso de arginina não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Assim, os autores concluíram que a imunidade nos peixes só sofre alterações, positivas ou negativas com uma dose ideal de suplementação de arginina. Pohelenz *et al.*, (2013) constaram que o valor da lisozima pode estar ligado à taxa de ciclagem dos granulócitos e monócitos e atribuíram a não ocorrência de diferenças significativas em seu experimento a homeostase que os peixes foram mantidos durante a realização do experimento.

As análises de complemento, cortisol, taxa de fagocitose, mieloperoxidase, imunoglobulina e antiprotease foram realizadas em uma escala menor e seus resultados foram menos homogêneos. Costas *et al.*, (2013) atribuíram o aumento da atividade do complemento ao aumento de neutrófilos. Segundo Raminejad *et al.*, (2014), a taxa de fagocitose, mieloperoxidase, imunoglobulina e peroxidase apresentam potencial para serem utilizadas em ensaios que objetivam determinar o efeito imunoestimulante da arginina.

Raminejad *et al.*, (2014) foram os primeiros autores que demonstraram os efeitos da suplementação dietética da arginina sobre o nível total de imunoglobulinas no plasma de peixes e os resultados obtidos foram semelhantes ao encontrado por Tan *et al.*, (2009) que demonstraram que a inclusão de 0,4-0,8% de arginina em dietas para leitões desmamados precocemente aumenta a resposta imune humoral através da modulação do nível de imunoglobulina no plasma.

Em relação ao cortisol Costas *et al.*, (2013) afirmaram que este hormônio atua como regulador e não necessariamente inibidor das respostas imunológicas. Costas *et al.*, (2011) observaram que o aumento do cortisol provoca apoptose em linfócitos enquanto ao mesmo tempo inibi a apoptose de neutrófilos, indicando uma regulação seletiva nas respostas inata e adaptativa do sistema imune.

Os resultados dos estudos que avaliam o efeito da arginina no sistema imunológico dos peixes ainda não são uniformes e as vias de atuação da arginina ainda não estão totalmente esclarecidas, exceto o óxido nítrico, que em todos os experimentos aumentou com a suplementação de arginina. Mas vale frisar que a realização de desafios seja por manejo ou bacteriano se apresentaram como boas ferramentas para identificar a concentração de arginina que promove o aumento da resposta imune dos peixes. A lisozima parece ser um bom parâmetro para se avaliar em experimentos de dose resposta de arginina.

Índices corporais

A avaliação dos índices corporais é importante, pois, possibilita uma avaliação ampla sobre o grau de higidez e bem estar dos peixes em ambientes de cultivo (Tavares-Dias *et al.*, 2008). Os trabalhos que investigaram o efeito da arginina na composição corporal dos peixes avaliaram o fator de condição, índice esplenossomático (IES), índice hepatossomático (IHS) e o índice viscerossomático (IVS).

O fator de condição é uma variável que aumenta até um limite e depois diminui com a adição de arginina na dieta o melhor exemplo dessa afirmação são os resultados obtidos por Khan e Abid (2011), Zhou *et al.*, (2012), Yue *et al.*, (2013). Nos trabalhos realizados por Yue *et al.*, (2013), Zhou *et al.*, (2010), Zhou *et al.*, (2011) e Farhat *et al.*, (2012), os autores também observaram uma associação positiva entre o fator de condição e o aumento de proteína da composição bromatológica da carcaça das espécies avaliadas.

Berge *et al.*, (2002) utilizando como material biológico o salmão do atlântico identificaram que dietas com diferente relação arginina:lisina alteram o fator de condição. Nguyen *et al.*, (2014) identificaram que o fator de condição foi mais sensível a variações provocadas pela deficiência de lisina do que de arginina.

Em relação ao índice hepatossomático (IHS), Farhat e Khan (2012) e Khan e Abid (2011) inferiram que esta variável pode ser maior nas dietas com suplementação de arginina abaixo ou acima do ideal. Os resultados obtidos por Tibaldi *et al.*, (1994) após a avaliação de sete rações com níveis crescentes de arginina para o *Dicentrarchus labrax* corroboraram com essa premissa. Farhat e Khan (2012) e Khan e Abid (2011), atribuíram esse resultado a o prejuízo na produção de insulina e glicose e no metabolismo de lipídios no fígado.

Berge *et al.*, (2002) identificaram que o índice IHS foi mais alto em peixes que receberam dietas com níveis mais baixos de arginina e atribuíram esse quadro a uma estratégia evolutiva do animal em primeiramente amadurecer órgãos relacionados a homeostase e depois canalizar os nutrientes para ganho muscular. Essa hipótese foi traçada a partir da associação entre o IHS e o desempenho produtivo, que foram inversamente proporcionais.

Chen *et al.*, (2012) relataram que o índice IHS está associado a atividade de enzimas digestivas no intestino e o aumento do IHS pode estar relacionado ao aumento da suplementação de arginina (aumento das poliaminas, como putrescina, espermidina e espermina), aumentando os produtos de degradação de arginina, essenciais para a proliferação e diferenciação celular (Li *et al.*, 2009).

Tesser *et al.*, (2005), Zhou *et al.*, (2010) e Costas *et al.*, (2013) em suas pesquisas não observaram diferença significativa no índice hepatossomático provocada pela concentração de arginina na dieta. Zhou *et al.*, (2012) também não observaram diferença significativa no índice hepatossomático de peixes alimentados com dieta suplementada com arginina, exceto nas dietas com nível muito baixo de arginina. Possivelmente, o valor desse índice só varia quando a concentração de arginina na dieta não está dentro da faixa recomendada para uma dada espécie.

Tibaldi *et al.*, (1994) também afirmaram que o IHS aumenta com o aumento da concentração de arginina em relação a lisina e diminui quando ocorre o oposto (diminuição de arginina) indicando que a arginina tem uma forte influência sobre o ganho de peso do fígado (maior que a lisina). Zhou *et al.*, (2011) observaram que nas dietas com maior nível de inclusão de lisina ocorre a diminuição significativa no valor do IHS.

Considerando as pesquisas de Khan e Abid (2011), Farhat e Khan (2013) e Costas *et al.*, (2012) pode-se inferir que os animais menores, por possuírem a exigência maior e o crescimento mais longitudinal que radial apresentaram aumento no índice virossomático (VSI) com o aumento de inclusão de arginina na dieta.

Peixes que recebem dietas com níveis adequados de arginina tem o valor de IVS diminuído e/ou constante (Tibaldi *et al.*, 1994; Farhat e Khan, Zhou *et al.*, 2012 e Costas *et al.*, 2012). Esse comportamento indica que o intestino tem a taxa de crescimento próxima às relacionadas com o ganho de musculatura branca. Fournier *et al.*, (2003) atribuíram os altos valores de IVS encontrados para a *Psetta maxima* a baixos níveis de arginina na dieta associada a hiperfagia compensatória provocada pela deficiência de nutrientes na dieta, com base no consumo compensatório na ingestão de alimentos descrita para *Salmo gairdneri* R. que receberam dietas com deficiência de zinco (De la Higuera, 2001).

Composição química corporal

A composição química de um peixe depende de fatores bióticos e abióticos relacionados à espécie e ao cultivo, que influenciam as características físicas e organolépticas do peixe (Burkert *et al.*, 2008). Dentre esses fatores a formulação da ração possibilita maior eficiência no uso de seus nutrientes tornando a composição química do corpo e da carne de peixes mais apropriada para conservação e para o consumo humano (Burkert *et al.*, 2008).

Essa premissa justifica a realização de pesquisas com peixes investigando o efeito da concentração de arginina na dieta na composição bromatológica dos peixes e analisando o conjunto de resultados obtidos pelos autores que realizaram essa investigação, pode se observar que a proteína aumenta com o aumento da inclusão de arginina na dieta. Sendo que em doses elevadas de arginina parece haver uma

diminuição da quantidade de proteína na composição corporal dos animais. Porém, alguns autores como Daikiri *et al.*, (2013), Luo *et al.*, (2007), Luzzana *et al.*, (1998), Ren *et al.*, (2013), Tesser *et al.*, (2005) e Yue *et al.* (2013) não observaram aumento significativo de proteína na composição corporal com o aumento da inclusão de arginina nas dietas, tabela 5.

Tabela 4. Tabela 5. Composição bromatológica de peixes submetidos a experimentos de dose-resposta de arginina.

Composição corporal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tratamentos	6	6	6	3	5	6	3	6	8	3	6	6	4	6	6	6	5	6	5	4
Proteína	+	+	+	+	=	+	+	+	+1		=	=	=	+	+	=	=	+1	+	+1
	q	q	q	q		q		q						q	q					
Lipídios	x	+1	+	+	=	-1	-	-1	-q		=	=	=	=	+	=	=	=	=	=
			q	q											q					
Cinzas	+	-1	-	-1	-q	-1	=	=	=	+1	=	=	=	=	-1	X	=	=	=	=
	q																			

Associação positiva (+), não mensurável (=) ou negativa (-).

1, Ahemed e Khan (2004); 2, Ahemed (2013); 3, Alan *et al.*, (2002a); 4, Alan *et al.*, (2002b); 5, Daikiri *et al.*, (2013); 6, Farhat e Khan (2012); 7, Zhou *et al.*, (2011); 8, Khan e Abid (2011); 9, Kin *et al.*, (1992); 10, Kucukbai *et al.*, (2008); 11, Luo *et al.*, (2007); 12, Luzzana *et al.*, (1998); 13, Ren *et al.*, (2013); 14, Ren *et al.*, (2014); 15, Singh e Khan, (2007); 16, Tesser *et al.*, (2005); 17, Yue *et al.*, (2013); 18, Zhou *et al.*, (2012); 19, Gao, (2014); 20, Pohlenz *et al.*, (2013).

Ahemed e Khan, (2004) relataram que a não obtenção de uma correlação linear entre a suplementação com arginina e a síntese de proteínas na carcaça pode ser resultado do excesso de ingestão de arginina nas dietas com maiores níveis de inclusão desse nutriente, o que provocaria um desbalanceamento de aminoácidos na dieta (Coloso *et al.*, 1999) fazendo com que nem todos os aminoácidos estejam presentes simultaneamente em seus locais de síntese (Zhou *et al.*, 2011) e afeta a utilização dos aminoácidos. Já Ahemed (2013) atribuíram a não obtenção de uma correlação entre a suplementação com arginina e a síntese de proteínas ao excesso de arginina ser destinado a oxidação e a desaminação gerar gasto energético com a excreção dos grupos amina diminuindo a utilização de energia para o ganho de peso (Siddiqui e Khan, 2009).

Luo *et al.*, (2007) não observou na carcaça de juvenis de garoupas *Epinephelus coioides* alimentadas com dietas com diferentes suplementações de arginina alterações nos aminoácidos valina, isoleucina e fenilalanina enquanto os aminoácidos treonina, metionina, lisina e arginina aumentaram com a suplementação de arginina e a leucina diminuiu (Luo *et al.*, 2007). A diferença na participação de cada aminoácido na composição corporal pode ser atribuída a disponibilidade de cada aminoácido nas diferentes dietas experimentais e a eficiência na utilização dos diferentes aminoácidos pelo *Epinephelus coioides*, fato observado por outros autores (Ng e Hung, 1995; Alam *et al.*, 2002b; Alam *et al.*, 2005) ou ainda devido às diferenças nos níveis teciduais de

aminoácidos livres, como observado na *Salmo gairdneri* R. por Yamamoto *et al.*, (2000).

Em relação aos minerais não foi observado um padrão nas respostas obtidas pelos diferentes autores. Kucukbai *et al.*, (2008) avaliaram a suplementação de arginina silicato inositol (ASI; arginina 49,47%, silício 8,2%, inositol 25%), uma composição que fornece uma fonte biodisponível de silicato e arginina e identificaram um aumento na concentração de minerais no plasma, atribuindo esse efeito positivo as propriedades do ingrediente.

Para a composição lipídica da carcaça dos peixes foram observados diferentes comportamentos desde aumento do teor de lipídios na carcaça ate uma diminuição com o aumento da suplementação de arginina nas dietas. Khan e abidi (2011), Singh e Khan (2007), Ahmed e Khan (2004) e Alam *et al.*, (2002) observaram efeito positivo da arginina sobre a composição de lipídios da carcaça. Zhou *et al.*, (2011) testaram o efeito da relação arginina:lisina e concluíram que o conteúdo lipídico corporal diminui com o aumento da lisina e da arginina quando mantido constante o nível de inserção de lisina. Zehra e Khan (2013) atribuíram esse resultado ao papel da arginina na regulação das vias de sinalização extra-endócrinas que tem efeito inibitório sobre vias biossintéticas de lipídeos levando a redução linear de lipídios na carcaça.

Desempenho produtivo

A arginina é um aminoácido essencial para os peixes (Zhou *et al.*, 2011) e vários trabalhos abordando o efeito desse aminoácido têm demonstrado a sua importância em diversos aspectos relacionados ao aumento da produção aquícola.

Considerando as informações acima esse tópico teve como objetivo reunir os trabalhos com as mais diferentes abordagens possíveis a fim de identificar o efeito de baixas e elevadas doses de arginina no efeito produtivo dos peixes. De um modo geral a maioria dos trabalhos realizados testaram a suplementação de arginina na dieta avaliando o desempenho produtivo dos animais (37 trabalhos) sendo possível observar dois comportamentos, tabela 6. No primeiro grupo foi observado a diminuição nos índices de desempenho produtivo com o aumento da inclusão de arginina. E no segundo grupo um aumento no desempenho produtivo dos peixes com o aumento da inclusão de arginina na dieta.

Os autores que identificaram diminuição do desempenho produtivo com a suplementação da arginina na dieta atribuíram esse quadro a deficiência de arginina na dieta que implica na redução do crescimento e da retenção de proteína (Tibaldi *et al.*, 1994; Luzzana *et al.*, 1998). Khan e Abid (2011) atribuíram a diminuição no desempenho produtivo de peixes alimentados com dietas com baixas concentrações de arginina a diminuição do suprimento de poliaminas dos organismos (Khan e Abid, 2011), substância percursora da espermidina e espermina substâncias necessárias para os animais crescerem (Pegg, 1986; Luzana *et al.*, 1998).

O excesso de arginina na dieta pode resultar em um desbalanço de aminoácidos da dieta (Coloso *et al.*, 1999; Murilo-Gurrea *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2011) afetando a absorção e utilização do pool de aminoácidos (Borlongan e Coloso, 1993; Ahemd e Khan, 2004; Khan e Adib, 2011) podendo provocar a toxicidade da arginina (Choo *et al.*,

1991; Chen *et al.*, 2011) devido a acumulação de aminoácidos ou dos seus produtos de degradação que podem atuar como agentes estressantes das enzimas digestivas, diminuindo sua eficiência (Alam *et al.*, 2003) e aumentando o gasto metabólico do animal para excretar e desaminar o excesso de aminoácidos do corpo (Walton, 1985; Murth e Varghese, 1995; Fournieu *et al.*, 2003; Ahemed e Khan, 2004; Singh e Khan, 2007; Abid e Khan, 2009; Chen *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012; Zehra e Khan *et al.*, 2013). Plisetskay *et al.*, (1991) apontou que dietas suplementadas com altas concentrações de arginina podem diminuir o desempenho de trutas por aumentar a quantidade de insulina liberada pelas mesmas, reduzindo o apetite dos peixes.

O antagonismo existente entre a arginina e a lisina também é apontado como um fator que diminui o desempenho produtivo dos peixes quando a dieta é suplementada com excesso de arginina (Murilo-Gurrea *et al.*, 2001; Singh e Khan *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2013; e Ren *et al.*, 2014). Essa premissa é baseada principalmente nos dados obtidos por Berge *et al.*, (1999) que afirmam que a arginina inibe a absorção de lisina, pelos dois aminoácidos utilizarem o mesmo transportador para serem absorvidos através da membrana da borda do intestino e a arginina possuir maior afinidade com esse transportador. Porém alguns autores não observaram essa interação antagônica (Alam *et al.*, 2002a; Ahemed e Khan, 2004; Tibaldi *et al.*, 1994). Robinson *et al.*, (1981) e Alam *et al.*, (2002) demonstraram que níveis excessivos de lisina na dieta não tem efeito aparente sobre a exigência de arginina quando a dieta apresenta níveis satisfatórios do segundo aminoácido. Zhou *et al.*, (2010) suplementando com arginina dietas com excesso de lisina obteve melhora significativa na taxa de retenção de proteína.

A redução no crescimento provocada pelo excesso de arginina na dieta pode ser explicada a partir da diminuição do apetite dos peixes provocada pela diminuição da palatabilidade da dieta, que resulta em uma diminuição da ingestão da ração (Borlongan, 1991; Murthy e Varghese, 1995; Berge *et al.*, 1997; Murillo-Gurrea *et al.*, 2001; Ahmed e Khan, 2004; Luo *et al.*, 2007; Singh e Khan, 2007; Ahemed, 2013; Zarate e Lovell, 1997; Peres e Oliva-Teles, 2005; Ambardekar *et al.*, 2009; Khan e Adib, 2011). Gao *et al.*, (2014) aponta como a principal causa na diminuição do desempenho produtivo de carpa capim a redução da ingestão da ração. Esses autores justificaram esse resultado através da metodologia usada que foi alimentar os peixes baseando-se em porcentagem do peso vivo, fazendo ajustes da quantidade de ração ofertada a cada duas semanas e do comportamento reportado para mamíferos que é a rejeição de dietas com deficiência de aminoácidos essenciais.

Dentre os fatores que podem influenciar a determinação da exigência em arginina por uma dada espécie Kin *et al.*, (1992), Ngamsnae *et al.*, (1999) e Ahmed e Khan (2004) apontam a fonte de aminoácidos utilizada. Luo *et al.*, (2007) identificou que dietas suplementadas com fontes cristalinas de aminoácidos não são tão boas quanto dietas práticas para promover o desempenho produtivo dos peixes e atribuem esse resultado a taxa de absorção dos aminoácidos que na sua forma livre são mais absorvidas do que os ácidos aminoácidos ligados a proteínas (Murai *et al.*, 1982; Zhou *et al.*, 2012) provocando um desbalanço na absorção dos mesmos.

Já o desempenho produtivo positivo com o acréscimo de arginina na dieta pode ser atribuído ao aumento das concentrações plasmáticas de insulina, do hormônio do

crescimento, da síntese de proteínas (Wu *et al.*, 2009; Pohlenz *et al.*, 2012, Gao *et al.*, 2014) e da expressão gênica (Kong *et al.*, 2012). Um detalhe importante a ser frisado é que a liberação de insulina já foi reportada como um fator positivo e negativo para promover uma melhora no desempenho produtivo dos peixes.

A capacidade desse aminoácido transportar compostos nitrogenados no organismo, associado a sua participação em diversas vias sintéticas (Morris, 2006; Wu *et al.*, 2009) é um dos fatores que promovem melhora no desempenho produtivo dos peixes. Pohlenz *et al.*, (2012) aponta que a suplementação de arginina na dieta pode favorecer que ocorra concentrações mais elevadas de produtos relacionados a ingestão de arginina nos organismos, aumentando os níveis de substâncias como a ornitina, glutamina e glutamato para a biossíntese de poliaminas em um dado tecido-alvo.

Estudos têm mostrado que as poliaminas putrescina, espermidina e espermina exercem efeito significativo sobre o crescimento da mucosa gastrointestinal de uma variedade de animais (McCormack e Johnson, 1991), incluindo os peixes (Peres e Zambonino-Infante, 1997) e vários estudos correlacionam altos níveis intracelulares de poliaminas com períodos de maior crescimento em bactérias, plantas e espécies animais (McCormack e Johnson, 1991; Li *et al.*, 2009; Wu, 2010), assim, é possível que a arginina também influencie o crescimento dos peixes através deste mecanismo (Pohlenz *et al.*, 2012).

No geral há grandes variações na exigência de arginina entre as diferentes espécies. Resultado que pode ser atribuído a variações entre condições de laboratório (Murilo-Gurtea *et al.*, 2001; Ahemed, 2013; Yue *et al.*, 2013), incluindo a qualidade da água, vazão de água, a biomassa, tipo de dieta (purificada, semipurificada ou prática), a quantidade de energia da dieta, digestibilidade dos ingredientes e aminoácidos, frequência e taxa de alimentação adotada, o tamanho, idade do peixe (Akiyama *et al.*, 1997; Luzzana *et al.*, 1998; Millamena *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 1999; De Silva *et al.*, 2000; Alam *et al.*, 2004; Khan e Abid, 2011; Yue *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2014), o modelo matemático adotado para se determinar a exigência (Zhou *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013), as diferenças genéticas entre as famílias de peixes (Yue *et al.*, 2013); e até mesmo os níveis de eletrólitos na dieta (Chiu, 1984).

As variáveis mais avaliadas de desempenho produtivo são o ganho de peso; a taxa de crescimento específico; a eficiência alimentar; a deposição de proteína; a retenção de proteína; a retenção de arginina; além de índices bioquímicos. Luzzana *et al.*, (1998) defende que a retenção de nitrogênio é o parâmetro mais preciso e sensível para estimar as exigências nutricionais de aminoácidos, uma vez que o ganho de peso pode ser resultado da deposição de gordura, ao invés do aumento da síntese de proteínas, não podendo ser uma medida exata do verdadeiro benefício resultante da suplementação com a arginina na dieta (Cho *et al.*, 1992; Cowey, 1992; Rodehutscord *et al.*, 1995).

Cowey (1995) e Luzzana *et al.*, (1998) reportam que experimentos que visam determinar a exigência de arginina devem realizar a alimentação até a saciedade do animal, uma vez que a suplementação da dieta com arginina objetiva sempre melhorar o desempenho produtivo ao máximo e isso é possível através de duas vias: melhora da

metabolização e absorção do nutriente testado e o aumento da ingestão do nutriente em questão (Chiu *et al.*, 1988; Baker, 1984).

Chiu *et al.*, (1988) identificou que a exigência de arginina foi de cerca de 4,2% da proteína da dieta quando a ingestão de alimentos foi restrita e caiu para 3,5%, quando os peixes foram alimentados até a saciedade, o que em termos relativos representa uma diminuição na exigência de 1,7% a 1,2% da dieta. Evidenciando que os animais que recebem a dieta *ad libitum* apresentam melhores resultados produtivos por regular a quantidade de alimento que tem que ingerir para alcançar a quantidade de arginina diária que atende sua exigência nutricional.

A suplementação de glutamato na dieta pode interferir na exigência de arginina de uma dada espécie, uma vez que, o mesmo é um precursor da arginina endógena (Ren *et al.*, 2013). Buentello e Gatlin (2000) encontraram a exigência de arginina 33% maior quando o glutamato substituiu glicina na dieta de catfish americano.

Outra alternativa na formulação de rações para determinar a exigência em arginina é estima-la com base na composição de uma espécie próxima por extrapolação de dados é possível (Wilson e Cowey, 1985). Twibell e Brown (1997), realizando estudos com juvenis de perca amarela identificaram que independente do hábito alimentar, tolerância a salinidade e temperatura a exigência em aminoácidos da espécie foi semelhante ao predict a partir da composição de aminoácidos da carcaça, fato reinterado por Ngamsanae *et al.*, (1999) e Zhou *et al.*, (2012) que aponta o padrão de aminoácidos da carcaça como referência na formulação de rações.

Tabela 6. Desempenho produtivo de peixes submetidos a experimentos de dose resposta com a suplementação de arginina na dieta.

<i>Índices de desempenho</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tratamentos	6	6	6	6	6	6	6	3x2	5	6	6	5	5	8	8	6	8	5	6
Repetições	3	3	3	3	3	4	4	3	4	3	3	3	3	3		3	4	3	3
Duração (dias)	60	60	45	40	124	84	63	60	60	70	84	84	84	54	63	84	42	54	54
N de alimentações	2	2	2	2	3	3	6	2		2	2	2	2	2	2				
Alimentação (% _s)	5	4	5	5	Sc	SC	SC	1,5		5	Sc	SC	sc	SC	SC	sc			sc
Temperatura (°C)	26,5	22-24	19,5	20,6		28-30	26	18-20	26,7	28	27	17	17	28	17		15	15	24-28
Local (aberto/indoor)	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	Ab	In	In	In	In
Água (salgada/doce)	D	D	S	S	S	S	D	34	D	D	D	S		S		d	d	S	S
Variação de arginina (%)	1,25	1,25	2	2	17,3	1,16	1,5		2	1	1,25	2,4	2,4	2,24	1,4	1	2,03		1,53
Peso inicial	0,6	4,8	1,85	1,85	383	0,7	6,34	57,6	27	16,6	5,87	7,4	9,3	10	100	5	12,6	110	16,1
Proteína bruta	40	40	50	50	42	40	34	53-56	43	40	38	54	42	38	46	40	50	40	48
Dieta (p/s/pr)	P	P	Sp	P	Sp	P	P	P	Sp	P	P	P	P	Sp	Sp	P	P	P	P
Exigência (g/kg)	18,4	16,32	ax1	2,04	21,2	21,1	18		14	18	15,1-			Ax1	1,2	20,4-	1,41	1,6	2,7
Ganho de peso (wg)	=	=	+l ⁻	+	=	=	+q		=	+q	+q	+	n	+ ⁻	=	+q	+l	+l	+l
Ganho de peso (%)	+q	+q	+l ⁻	+	=	+q		=		+q								+l	=
TCE (SGR)	+q	+q	+l ⁻	+	=	+	+q	=	=	+q					=			+	=
Consumo de ração (FI)		+q					+q				+q			= ⁻					+
Conversão alimentar (FCR)	-q	-q		+	=	-			-q	-q	-q					-q			
Eficiência alimentar (FE)			+l ⁻				+q					+	-q	+ ⁻			+l	+	
PER	+q	+q			=		+q					+	-q	+ ⁻	=				
Efici. na retenção de N (%)				+	=*		+q				+q	+	+			+q	+l	+*	+q
Efici. na retenção de lip (%)											+q							+*	
Efici. na retenção de En (%)																+q			
Sobrevivência	=	=	+l ⁻	+		+q			=	+	+			= ⁻			=		n

Associação positiva (+), não mensurável (=) ou negativa (-).

P: purificada; **S:** semi-purificada ; **pr:** pratica; **NI:** não informado; ***g/kg/dia;** **sc:** ate a saciedade; **n:** não ocorreu um padrão; **ax1:** o estudo focou a relação arginina lisina; ⁻, foi considerado somente o efeito da arginina nas dietas que o nível de lisina se manteve constante. 1, Ahemed e Khan, 2004 (*Cirrhinus mrigala*); 2, Ahemed, 2013 (*Heteropneustes fossilis*); 3, Alam *et al.*, 2002 (*Paralichthys olivaceus*) A; 4, alam *et al.*, 2002 (*Paralichthys olivaceus*) B; 5, Berge *et al.*, 1997 (*Salmo salar*); 6, Borlongan, 1991 (*Chanos chanos*); 7, Chen *et al.*, 2011 (*Cyprinus carpio*); 8, Costas *et al.*, 2012 (*Scophthalmus maximus*); 9, Daikiri *et al.*, 2013 (*Salminus brasiliensis*); 10, Fagbenro *et al.*, 1999 (*Clarias gariepinus*); 11, Farhat e Khan (2012) (*Heteropneustes fossilis*); 12 e 13, Fournier *et al.*, 2003 (*Oncorhynchus mykiss* e *Psetta maxima*); 14, Zhou *et al.*, 2011 (*Acanthopagrus schlegelii*); 15, Kaushik *et al.*, 1988 (*Salmo gairdneri* R.); 16, Khan e Abid, 2011 (*Heteropneustes fossilis*); 17, Kin *et al.*, 1992 (*Oncorhynchus mykiss*); 18, Lall *et al.*, 1994 (*Salmo salar*); 19, Luo *et al.*, 2007 (*Epinephelus coioides*); 20, Luzana *et al.*, 1998 (*Oncorhynchus kisutch*);

Continuação, tabela 6. Desempenho produtivo de peixes submetidos a experimentos de dose resposta com a suplementação de arginina na dieta.

<i>Índices de desempenho</i>	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Tratamentos	6x2	6	6	5	6	6	6	4	6	6	9	5	8	6	5	4	6	6
Repetições	3	2	3	3	3	3	3	3		4	2	3	3	3		3	3	3
Duração (dias)	54	84	60	84	63	63	30	56		54	63	54	42	56	84	45	70	84
N de alimentações	3	2	2	2	3	2	2	4	3	2	8	3	2	2		2	3	3
Alimentação (% sç)		10-4	Sc	Sc	Sc	Sc	8	--	2,5	Sc	6	Sc	6,5-5	Sc		SC 4	3-5	SC
Temperatura (°C)	15	29	26-	19	21-24	29-32	25-27	26,5-	28	28	25	28-29	29	28		27	27,5	27,2
Local (aberto/indoor)	In	In	In	In	Ab	In	In	In	In	In	In	In	In	In		In	In	In
Água (salgada/doce)	S	S	d	S		S	D	D	D		S	D				D	D	D
Variação de arginina (%)	2,8	2	2,4		2,53	1,99	1,25	0,7	1	1,4	1,8	1,39	2,1	1,61	1,93	3,5	1,48	1,25
Peso inicial	0,9	2,56	1,7	0,35	2,6	3,38	6,35	21,6	4,3	24	2,1	6	56,6	10,5		22,9	3,84	0,61
Proteína bruta		48	40	40	34	46	40	32	55	45,9	46	28	35	38		26,5	38	33
Dieta (p/s/pr)	S	S	P	S	S	p	P	Pr	P	P	S	S	S	P		Sp	SP	P
Exigência (g/kg)		18,2	23	27	2,26	2,96	17,8/2	--	--	19,1	18,1	15,3		2,79-			2,17	1,67
Ganho de peso (wg)	=		=	+q	+	+q	+q	+	+	+	+	+q	+			+q	+q	=
Ganho de peso (%)	n	n	+q	+q			+q					+q		+				
TCE (SGR)	+		=	+q	+q	+q	+q	+	+	+	+	+q		+			+q	
Consumo de ração (FI)	=							+	=	+l						=	+q	=
Conversão alimentar (FCR)	-		=	-q			-q		=	=	-	=					-q	=
Eficiência alimentar (FE)					+	+q		+					+	+#		+		
PER	+			+q	+		+q		+	=	+	+	+	+		+		=
Efici. na retenção de N (%)	=*			+q*	+q				=	+	+	+q	=			+l		=
Efici. na retenção de lip (%)	=*																	
Efici. na retenção de En (%)																		
Sobrevivência	-l		=		=	=				=		=	=	=		=	=	

Associação positiva (+), não mensurável (=) ou negativa (-).

P: purificada; **S:** semi-purificada; **pr:** prática; **NI:** não informado; ***g/kg/dia;** **sc:** ate a saciedade; **n:** não ocorreu um padrão; **axl:** o estudo focou a relação arginina lisina; **---** foi considerado somente o efeito da arginina nas dietas que o nível de lisina se manteve constante. 21, Murilo-Gurra et al., 2001 (Asian sea bass); 22 Murthy e Varghese et al., 1995 (*Labeo rohita*); 23, Ngamsnae et al., 1999 (*Bidyanus bidyanus*); 24, Ren et al., 2013 (*blunt snout bream*); 25, Ren et al., 2014 (*Rachycentron canadum*); 26, Singh e Khan et al., 2007 (*Clarias gariepinus* – *Clarias macrocephalus*); 27, Suprayudi et al., 2000 (*Osphronemus gouramy*); 28, Tesser et al., 2005 (*Piaractus mesopotamicus*); 29, Zhou et al., 2012 (*Micropterus salmoides*); 30, Tibaldi et al., 1994 (*Dicentrarchus labrax*); 31, Yue et al., 2012 (*Oreochromis niloticus*); 32, Barziza et al., 2000 (*Sciaenops Ocellatus*); 33, Zhou et al., 2010 (*Sparus macrocephalus*); 34, Walton et al., 1986 (truta arco-iris); 35, Pohlenz et al., 2012 (*Ictalurus punctatus*); 36, Gao et al., 2014 (*Ctenopharyngodon idella*); 37, Zehra e Khan, 2013 (*Catla catla*).

Excreção de compostos nitrogenados

Os primeiros ensaios buscando determinar a exigência de arginina nos peixes baseados em dados bioquímicos como os relacionados à excreção de produtos nitrogenados foram motivados devido ao grande número de fatores que podem alterar os resultados de desempenho produtivo (Cowey e Luquet, 1983; Tacon e Cowey, 1985; Kim *et al.*, 1992) associado há resultados que demonstraram que a produção de ureia medida no plasma tem confirmado a exigência da arginina baseada em dados de desempenho produtivo como os obtidos por Allan *et al.*, (2002b).

Nos peixes a uréia é usada principalmente como um osmólito ou é excretada como um produto residual da excreção de amônia. Os peixes teleósteos embora sejam amoniotéticos possuem a capacidade de sintetizar uréia devido a quebra de purinas (Vellas e Serfaty, 1974) e a degradação de arginina (Kaushik e Fauconeoni, 1984). Allan *et al.*, (2002a) identificaram que o *Paralichthys olivaceus* excreta mais amônia do que ureia. Resultado semelhante foi obtido por Kikuchi *et al.*, (1992) que avaliaram a excreção de nitrogênio para essa espécie.

Para a amônia foram observados dois comportamentos quando os peixes receberam dietas suplementadas com arginina. Alguns autores reportam que não ocorre aumento significativo dos níveis de amônia no plasma com o aumento de arginina na dieta (Ren *et al.*, 2013) e atribuíram esse comportamento a rápida excreção da amônia a partir das brânquias (Berge *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2013). Outros autores observaram aumento da amônia plasmática ou a liberada pelos com o acréscimo de arginina na dieta (Allan *et al.*, 2002a, Kaushik e Fauconeone, 1984).

Esse acréscimo pode ser um fator negativo, pois, é resultante da perda de energia do alimento que foi assimilado e posteriormente desaminado no organismo (Jobling, 1981) indicando que a dieta possui proteína e seus produtos em excesso, fontes da produção de amônia (Koshio *et al.*, 1993), ou que não há um equilíbrio de aminoácidos dietético (Kaushik *et al.*, 1988), podendo provocar o aumento do catabolismo de arginina (Allan *et al.*, 2002a).

Em relação a ureia Kaushik e Fauconeone (1984) observaram que concentrações elevadas de arginina na dieta do *Salmo salar* aumenta a excreção de uréia, um fenômeno bem conhecido em outros animais (Fico *et al.*, 1982). Cho *et al.*, (1992) indicaram que as concentrações de uréia no soro pós-prandial da truta arco-íris pode ser tão sensível quanto o crescimento na determinação da exigência de arginina. Alguns autores atribuíram o aumento da uréia a atuação da arginina como doador de amina no metabolismo do nitrogênio (Alan *et al.*, 2002a; Alam *et al.*, 2002b). Fournier *et al.*, (2003) atribuem esse quadro a degradação direta da arginina dietética na ureagenese conforme relatado por outros autores (Kaushik *et al.*, 1988; Gouillou-Coustans *et al.*, 2002).

Em relação a arginase, última enzima do ciclo da ureia, que catalisa a transformação de L-arginine em uréia e ornitina, Kaushik *et al.*, (1988) relataram que a produção de uréia por via de arginase é afetada pelo nível de arginina na dieta, sendo precisamente controlada pelo nível de arginina livre no fígado. Porém, Walton *et al.*, (1986) não foram capaz de detectar qualquer alteração significativa na atividade da arginase do fígado *in vitro* quando elevaram o nível de inclusão da arginina. Berge *et*

al., (2002) e Tulli *et al.*, (2007) identificaram aumento da atividade da arginase após maior inclusão de arginina na dieta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, podemos observar que a arginina exerce efeito significativo sobre o desempenho produtivo e sobre as variáveis relacionadas com a retenção de nutrientes. Sua associação com o aumento da excreção de nitrogênio pelos peixes é evidente. A interação entre lisina e arginina precisa ser melhor elucidada e ainda não está claro a existência de um antagonismo entre esses aminoácidos para a maioria das espécies de peixes. Em relação aos estudos que avaliaram o efeito da arginina na sanidade e imunologia dos peixes ainda não está totalmente clara quais são as variáveis que respondem positivamente ou negativamente a suplementação de arginina na dieta, exceto o óxido nítrico. A realização de desafios seja por manejo ou bactérias se mostraram como ferramenta para avaliar o efeito imunestimulante desse aminoácido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, I. (2013). Dietary arginine requirement of fingerling Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*, Bloch). *Aquaculture International*, 21(2), 255-271.
- Ahmed, I., & Khan, M. A. (2004). Dietary arginine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, 10(4), 217-225.
- Akiyama, T., Oohara, I., & Yamamoto, T. (1997). Comparison of Essential Amino Acid Requirements with A/E Ratio among Fish Species (Review Paper). *Fisheries science*, 63(6), 963-970.
- Alam, M. D., TESHIMA, S. I., Ishikawa, M., & Koshio, S. (2002a). Effects of dietary arginine and lysine levels on growth performance and biochemical parameters of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries science*, 68(3), 509-516.
- Alam, M. S., Teshima, S. I., Koshio, S., & Ishikawa, M. (2002b). Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters. *Aquaculture*, 205(1), 127-140.
- Alba-Roth, J., Müller, O. A., Schopohl, J., & Werder, K. V. (1988). Arginine Stimulates Growth Hormone Secretion by Suppressing Endogenous Somatostatin Secretion*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 67(6), 1186-1189.
- Ambardekar, A. A., Reigh, R. C., & Williams, M. B. (2009). Absorption of amino acids from intact dietary proteins and purified amino acid supplements follows different time-courses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 291(3), 179-187.
- Andersen, S. M., Taylor, R., Holen, E., Aksnes, A., & Espe, M. (2014). Arginine supplementation and exposure time affects polyamine and glucose metabolism in primary liver cells isolated from Atlantic salmon. *Amino acids*, 46(5), 1225-1233.
- Anderson, R. A. (1994). Stress effects on chromium nutrition of humans and farm animals. *Biotechnology in the feed industry*, 267-274.
- Angeli, G., Barros, T. L. D., & Barros D. F. L., L. M. (2007). Investigação dos efeitos da suplementação oral de arginina no aumento de força e massa muscular. *Rev. Bras. Med. Esporte*, 13(2).

- Arbeláez-Roja, G. A., Moraes, G. (2009). Interação do exercício de natação sustentada e da densidade de estocagem no desempenho e na composição corporal de juvenis de matrinxã *Brycon amazonicus*. *Ciência Rural*, 39(1), 201-208.
- Baker, D. H. (1984). Equalized versus ad libitum feeding. *Nutrition reviews*, 42(8), 269-273.
- Barash, H. (1984). The influence of the lysine level in the diet on nitrogen excretion and on the concentration of ammonia and free amino acids in the plasma of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Nutrition reports international*.
- Barbul, A. (1986). Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 10(2), 227-238.
- Barziza, D. E., Buentello, J. A., & Gatlin, D. M. (2000). Dietary arginine requirement of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) based on weight gain and feed efficiency. *The Journal of nutrition*, 130(7), 1796-1799.
- Batra, J., Singh, T. P., Mabalirajan, U., Sinha, A., Prasad, R., & Ghosh, B. (2007). Association of inducible nitric oxide synthase with asthma severity, total serum immunoglobulin E and blood eosinophil levels. *Thorax*, 62(1), 16-22.
- Belo, M. A. A. (2002). Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)*.
- Berge, G. E., Bakke-McKellep, A. M., & Lied, E. (1999). In vitro uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 179(1), 181-193.
- Berge, G. E., Sveier, H., & Lied, E. (1998). Nutrition of Atlantic salmon (*Salmo salar*); the requirement and metabolic effect of lysine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(3), 477-485.
- Berge, G. E., Sveier, H., & Lied, E. (2002). Effects of feeding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) imbalanced levels of lysine and arginine. *Aquaculture Nutrition*, 8(4), 239-248.
- Borlongan, I. G. (1991). Arginine and threonine requirements of milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) juveniles. *Aquaculture*, 93(4), 313-322.
- Borlongan, I. G., & Coloso, R. M. (1993). Requirements of juvenile milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) for essential amino acids. *The Journal of nutrition*, 123(1), 125-132.
- Buentello, J. A., & Gatlin, D. M. (1999). Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. *Aquaculture*, 179(1), 513-521.
- Buentello, J. A., & Gatlin, D. M. (2000). The dietary arginine requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is influenced by endogenous synthesis of arginine from glutamic acid. *Aquaculture*, 188(3), 311-321.
- Buentello, J. A., Reyes-Becerril, M., de Jesús Romero-Geraldo, M., & de Jesús Ascencio-Valle, F. (2007). Effects of dietary arginine on hematological parameters and innate immune function of channel catfish. *Journal of aquatic animal health*, 19(3), 195-203.

- Burkert, D., Andrade, D. D., Sirol, R. N., Salaro, A. L., Rasguido, J. D. A., e Quirino, C. R. (2008). Rendimentos do processamento e composição química de filés de surubim cultivado em tanques-rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(7), 1137-1143.
- Chen, G., Feng, L., Kuang, S., Liu, Y., Jiang, J., Hu, K., ... & Zhou, X. (2012). Effect of dietary arginine on growth, intestinal enzyme activities and gene expression in muscle, hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *British Journal of Nutrition*, 108(02), 195-207.
- Chen, N., Jin, L., Zhou, H., & Qiu, X. (2012). Effects of dietary arginine levels and carbohydrate-to-lipid ratios on mRNA expression of growth-related hormones in largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *General and comparative endocrinology*, 179(1), 121-127.
- Chen, X., & Shi, Z. (2007). cDNA sequence analysis and tertiary structure prediction of alkaline phosphatase from *Paralichthys olivaceus*.
- Cheng, Z., Buentello, A., & Gatlin, D. M. (2011). Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 319(1), 247-252.
- Chiu, Y. N., Austic, R. E., & Rumsey, G. L. (1984). Effect of dietary electrolytes and histidine on histidine metabolism and acid-base balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 78(4), 777-783.
- Chiu, Y. N., Austic, R. E., & Rumsey, G. L. (1988). Effect of feeding level and dietary electrolytes on the arginine requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 69(1), 79-91.
- Cho, C. Y., Kaushik, S., Woodward, B. 1992. Dietary arginine requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 102, 211-216.
- Cho, C. Y., Kaushik, S., & Woodward, B. (1992). Dietary arginine requirement of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 102(1), 211-216.
- Christiansen, J. S., Svendsen, Y. S., e Jobling, M. (1992). The combined effects of stocking density and sustained exercise on the behaviour, food intake, and growth of juvenile Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Canadian Journal of Zoology*, 70(1), 115-122.
- Coloso, R. M., Murillo-Gurrea, D. P., Borlongan, I. G., & Catacutan, M. R. (1999). Sulphur amino acid requirement of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. *Journal of Applied Ichthyology*, 15(2), 54-58.
- Congleton, J. L., & Wagner, T. (2006). Blood-chemistry indicators of nutritional status in juvenile salmonids. *Journal of fish biology*, 69(2), 473-490.
- Costas, B., Conceição, L. E., Dias, J., Novoa, B., Figueras, A., & Afonso, A. (2011). Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & shellfish immunology*, 31(6), 838-847.
- Costas, B., Rego, P. C. N. P., Conceicao, L. E. C., Dias, J., & Afonso, A. (2013). Dietary arginine supplementation decreases plasma cortisol levels and modulates immune

mechanisms in chronically stressed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Nutrition*, 19(s1), 25-38.

Cowey, C. B. (1992). Nutrition: estimating requirements of rainbow trout. *Aquaculture*, 100(1), 177-189.

Cowey, C. B. (1995). Protein and amino acid requirements: a critique of methods. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3-4), 199-204.

Cowey, C. B., & Luquet, P. (1983). Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analysis of allowances. *Colloques de l'INRA (France)*.

Dairiki, J. K., Dias, C. T. D. S., & Cyrino, J. E. P. (2007). Lysine requirements of largemouth bass, *Micropterus salmoides*: a comparison of methods of analysis of dose-response trials data. *Journal of Applied Aquaculture*, 19(4), 1-27.

De la Higuera, M. (2001). Effects of nutritional factors and feed characteristics on feed intake. *Food Intake in Fish*, 250, 268.

De Silva, S. S., Gunasekera, R. M., & Gooley, G. (2000). Digestibility and amino acid availability of three protein-rich ingredient-incorporated diets by Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell) and the Australian shortfin eel *Anguilla australis* Richardson. *Aquaculture Research*, 31(2), 195-205.

Dusse, L. M. S., Vieira, L. M., & Carvalho, M. D. G. (2003). Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39(4), 343-350.

Eddy, F. B., & Tibbs, P. (2003). Effects of nitric oxide synthase inhibitors and a substrate, L-arginine, on the cardiac function of juvenile salmonid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(2), 137-144.

Eiras, J. D. C., Takemoto, R. M., & Pavanelli, G. C. (2000). *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. Eduem.

Fagbenro, O. A., Nwanna, L. C., & Adebayo, O. T. (1999). Dietary arginine requirement of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(1), 59-64.

Farhat., Khan, M. A. (2012). Effects of dietary arginine levels on growth, feed conversion, protein productive value and carcass composition of stinging catfish fingerling *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture International*, 20(5), 935-950.

Fayh, A. P. T., Friedman, R., Sapata, K. B., & Oliveira, Á. R. D. (2007). Efeito da suplementação de L-arginina sobre a secreção de hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina em adultos. *Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia= Brazilian archives of endocrinology and metabolism. São Paulo. Vol. 51, n. 4 (jun. 2007), p. 587-592.*

Fico, M. E., Hassan, A. S., & MILNER, A. A. (1982). The Influence of Excess Lysine on Urea Cycle Operation and Pyrimidine Biosynthesis¹2. *Urbana*, 51, 61801.

Fournier, V., Gouillou-Coustans, M. F., Metailler, R., Vachot, C., Moriceau, J., Le Delliou, H. & Kaushik, S. J. (2003). Excess dietary arginine affects urea excretion but does not improve N utilisation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture*, 217(1), 559-576.

Fujimoto, R. Y., Castro, M. P. D., Martins, M. L., Moraes, F. R. D., Varella, J. E. D. A., & Diniz, D. G. (2010). Effects of chromium supplementation on the infrapopulations of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenoidea) and *Piscinoodinium pillulare* (Dinoflagellida) parasites of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4), 827-833.

- Furuya, W. M., Graciano, T. S., Vidal, L. V. O., Xavier, T. O., Gongora, L. D., Righetti, J. S., & Furuya, V. R. B. (2012). Digestible lysine requirement of Nile tilapia fingerlings fed arginine-lysine-balanced diets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(3), 485-490.
- Furuya, W. M., Michelato, M., Graciano, T. S., Vidal, L. V. O., Xavier, T. O., Furuya, V. R. B., & de Moura, L. B. (2013). Digestible lysine requirement of Nile tilapia from 86 to 227 g fed arginine to lysine balanced diets. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)*, 34(4), 1945-1954.
- Furuya, W. M., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Pezzato, A. C., Furuya, V. R., & Miranda, E. C. (2004). Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research*, 35(12), 1110-1116.
- Gao, Y., Yang, H., Guo, D., Liu, Y., Yu, Y., Chen, S., & Tian, L. (2014). Dietary arginine requirement of juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes in Cuvier & Valenciennes, 1844). *Aquaculture Research*. 1–9.
- Gaylord, T. G., & Barrows, F. T. (2009). Multiple amino acid supplementations to reduce dietary protein in plant-based rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, feeds. *Aquaculture*, 287(1), 180-184.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby, J. 2003. Immunology, 5th edition. Freeman, New York.
- Gouillou-Coustans, M. F., Fournier, V., Métailler, R., Vachot, C., Desbruyères, E., Huelvan, C. & Kaushik, S. J. (2002). Dietary arginine degradation is a major pathway in ureagenesis in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(2), 305-319.
- Griffin M. E, Wilson, K. A., Brown, P. B. (1994). Dietary Arginine Requirement of Juvenile Hybrid Striped Bass¹2.
- Hurt, R. T., Matheson, P. J., Mays, M. P., & Garrison, R. N. (2006). Immune-enhancing diet and cytokine expression during chronic sepsis: An immune-enhancing diet containing L-arginine, fish oil, and RNA fragments promotes intestinal cytokine expression during chronic sepsis in rats. *Journal of gastrointestinal surgery*, 10(1), 46-53.
- Jobling, M. (1981). Some effects of temperature, feeding and body weight on nitrogenous excretion in young plaice *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology*, 18(1), 87-96.
- Jones, J. D., Petersburg, S. J., & Burnett, P. C. (1967). The mechanism of the lysine-arginine antagonism in the chick: effect of lysine on digestion, kidney arginase, and liver transaminidase. *The Journal of nutrition*, 93(1), 103-116.
- Kaushik, S. J., & Fauconneau, B. (1984). Effects of lysine administration on plasma arginine and on some nitrogenous catabolites in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 79(3), 459-462.
- Kaushik, S. J., Fauconneau, B., Terrier, L., & Gras, J. (1988). Arginine requirement and status assessed by different biochemical indices in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 70(1), 75-95.
- Khan, M. A., & Abidi, S. F. (2011). Dietary arginine requirement of *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch) based on growth, nutrient retention and haematological parameters. *Aquaculture Nutrition*, 17(4), 418-428.

- Kikuchi, K., Takeda, S., Honda, H., & Kiyono, M. (1992). Nitrogenous excretion of juvenile and young Japanese flounder [*Paralichthys olivaceus*]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Kim, K. I., Kayes, T. B., & Amundson, C. H. (1992). Requirements for lysine and arginine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 106(3), 333-344.
- Kong, X., Tan, B., Yin, Y., Gao, H., Li, X., Jaeger, L. A. & Wu, G. (2012). L-Arginine stimulates the mTOR signaling pathway and protein synthesis in porcine trophectoderm cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(9), 1178-1183.
- Koshio, S., Teshima, S. I., Kanazawa, A., & Watase, T. (1993). The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 113(1), 101-114.
- Küçükbay, F. Z., Yazlak, H., Sahin, N., Akdemir, F., Orhan, C., Juturu, V., & Sahin, K. (2008). Effects of dietary arginine silicate inositol complex on mineral status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 14(3), 257-262.
- Lall, S. P., Kaushik, S. J., Le Bail, P. Y., Keith, R., Anderson, J. S., & Plisetskaya, E. (1994). Quantitative arginine requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in sea water. *Aquaculture*, 124(1), 13-25.
- Lancaster Jr, J. R. (1992). Nitric oxide in cells. *American Scientist*, 80, 248-259.
- Landolt, M. L. (1989). The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture*, 79(1), 193-206.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., & Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino acids*, 37(1), 43-53.
- Lovell, T. 1988. Feeding tilapia. *Aquaculture magazine*, 7(1), 42-43.
- Luo, Z., Liu, Y. J., Mai, K. S., Tian, L. X., Tan, X. Y., & Yang, H. J. (2007). Effects of dietary arginine levels on growth performance and body composition of juvenile grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of Applied Ichthyology*, 23(3), 252-257.
- Luzzana, U., Hardy, R. W., & Halver, J. E. (1998). Dietary arginine requirement of fingerling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 163(1), 137-150.
- McCormack, S. A., & Johnson, L. R. (1991). Role of polyamines in gastrointestinal mucosal growth. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 260(6), G795-G806.
- Millamena, O. M., Bautista-Teruel, M. N., Reyes, O. S., & Kanazawa, A. (1998). Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. *Aquaculture*, 164(1), 95-104.
- Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. (2013). Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. 60p. Brasília.
- Mommsen, T. P. (2001). Paradigms of growth in fish. *Comparative biochemistry and physiology part B: Biochemistry and molecular biology*, 129(2), 207-219.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Vergara, J. M., & Tort, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171(3), 269-278.
- Morris, S. M. (2006). Arginine: beyond protein. *The American journal of clinical nutrition*, 83(2), 508S-512S.

- Morrison, R. N., Lyons, A. B., Nowak, B. F., & Hayball, J. D. (2004). Snapper (*Pagrus auratus*) leucocyte proliferation is synergistically enhanced by simultaneous stimulation with LPS and PHA. *Fish & shellfish immunology*, 16(3), 307-319.
- Murai, T., Akiyama, T., Ogata, H., Hirasawa, Y., Nose, T. (1982). Effect of coating amino acids with casein supplemented to gelatin diet on plasma free amino acids of carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 48, 703-710.
- Murillo-Gurrea, D. P., Coloso, R. M., Borlongan, I. G., & Serrano, A. E. (2001). Lysine and arginine requirements of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. *Journal of Applied Ichthyology*, 17(2), 49-53.
- Murthy, H. S., & Varghese, T. J. (1995). Arginine and histidine requirements of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, 1(4), 235-239.
- National Research Council. 1993. Nutrient Requirements of Fish. *National Academy Press*, Washington, DC.
- National Research Council. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. *The National Academies Press*, Washington, D.C.
- Ng, W. K., & Hung, S. S. O. (1995). Estimating the ideal dietary indispensable amino acid pattern for growth of white sturgeon, *Acipenser transmontanus* (Richardson). *Aquaculture Nutrition*, 1(2), 85-94.
- Nguyen, M., Rønnestad, I., Buttle, L., Lai, H., & Espe, M. (2014). Imbalanced lysine to arginine ratios reduced performance in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed high plant protein diets. *Aquaculture Nutrition*, 20(1), 25-35.
- Ono, E. A., & Kubitza, F. (2003). *Cultivo de peixes em tanques-rede*. EA Ono.
- Papoutsoglou, S. E., Tziha, G., Vrettos, X., & Athanasiou, A. (1998). Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquacultural Engineering*, 18(2), 135-144.
- Pegg, A. E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochemical Journal*, 234(2), 249.
- Péres, A., Cahu, C. L., & Infante, J. Z. (1997). Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16(6), 479-485.
- Peres, H., & Oliva-Teles, A. (2005). The effect of dietary protein replacement by crystalline amino acid on growth and nitrogen utilization of turbot *Scophthalmus maximus* juveniles. *Aquaculture*, 250(3), 755-764.
- Plisetskaya, E. M., Buchelli-Narvaez, L. I., Hardy, R. W., & Dickhoff, W. W. (1991). Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of Pacific salmon and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 98(1), 165-170.
- Pohlenz, C., Buentello, A., J Helland, S., & Gatlin, D. M. (2014). Effects of dietary arginine supplementation on growth, protein optimization and innate immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818). *Aquaculture Research*, 45(3), 491-500.
- Pohlenz, C., Buentello, A., Mwangi, W., & Gatlin, D. M. (2012). Arginine and glutamine supplementation to culture media improves the performance of various channel catfish immune cells. *Fish & shellfish immunology*, 32(5), 762-768.

- Rahimnejad, S., & Lee, K. J. (2014). Dietary arginine requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 434, 418-424.
- Ren, M., Ai, Q., & Mai, K. (2014). Dietary arginine requirement of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Research*, 45(2), 225-233.
- Ren, M., Liao, Y., Xie, J., Liu, B., Zhou, Q., Ge, X. & Chen, R. (2013). Dietary arginine requirement of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*, 414, 229-234.
- Robinson, E. H., Wilson, R. P., & Poe, W. E. (1981). Arginine requirement and apparent absence of a lysine-arginine antagonist in fingerling channel catfish. *The Journal of nutrition*, 111(1), 46-52.
- Rodehutsord, M., Jacobs, S., Pack, M., & Pfeffer, E. (1995). Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growing from 50 to 170 g to supplements of either L-arginine or L-threonine in a semipurified diet. *The Journal of nutrition*, 125(4), 970-975.
- Santiago, C. B., & Lovell, R. T. (1988). Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *The journal of nutrition*, 118(12), 1540-1546.
- Secombes, C. J., Hardie, L. J., & Daniels, G. (1996). Cytokines in fish: an update. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(4), 291-304.
- Shiau, S. Y., & Huang, S. L. (1989). Optimal dietary protein level for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) reared in seawater. *Aquaculture*, 81(2), 119-127.
- Siddiqui, T. Q., & Khan, M. A. (2009). Effects of dietary protein levels on growth, feed utilization, protein retention efficiency and body composition of young *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Fish physiology and biochemistry*, 35(3), 479-488.
- Silva, D. (1999). Arginine and phenylalanine requirement of juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus* and validation of the use of body amino acid composition for estimating individual amino acid requirements. *Aquaculture Nutrition*, 5(3), 173-180.
- Simmons, L., Moccia, R. D., Bureau, D. P., Sivak, J. G., & Herbert, K. (1999). Dietary methionine requirement of juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Nutrition*, 5(2), 93-100.
- Singh, S., & Khan, M. A. (2007). Dietary arginine requirement of fingerling hybrid *Clarias* (*Clarias gariepinus* × *Clarias macrocephalus*). *Aquaculture Research*, 38(1), 17-25.
- Sosinski, L. T. W. (1996). Efeito da densidade e peso à estocagem na produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) recriadas em gaiolas no sul do Brasil.
- Stickney, R. R., Hesby, J. H., McGeachin, R. B., & Isbell, W. A. (1979). Growth of *Tilapia nilotica* in ponds with differing histories of organic fertilization. *Aquaculture*, 17(3), 189-194.
- Suprayudi, M. A., Takeuchi, T., Mokoginta, I., & Kartikasari, A. T. (2000). The effect of additional arginine in the high defatted soybean meal diet on the growth of giant gouramy *Osphronemus gouramy* Lac. *Fisheries science*, 66(5), 807-811.
- Swanson, D. R. (1990). Somatomedin C and arginine: implicit connections between mutually isolated literatures. *Perspectives in biology and medicine*, 33(2), 157-186.
- Tacon, A. G. J., & Cowey, C. B. (1985). Protein and amino acid requirements. In *Fish Energetics* (pp. 155-183). Springer Netherlands.

- Tan, B., Li, X. G., Kong, X., Huang, R., Ruan, Z., Yao, K. & Wu, G. (2009). Dietary L-arginine supplementation enhances the immune status in early-weaned piglets. *Amino acids*, 37(2), 323-331.
- Tavares-Dias, M., Marcon, J. L., Lemos, J. R., Fim, J. D., Affonso, E. G., & Ono, E. A. (2008). Índices de condição corporal em juvenis de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e *Colossomoma macropomum* (Cuvier, 1818) na Amazônia. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 34, 197-204.
- Tesser, M. B., Terjesen, B. F., Zhang, Y., Portella, M. C., & Dabrowski, K. (2005). Free-and peptide-based dietary arginine supplementation for the South American fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture Nutrition*, 11(6), 443-453.
- Tibaldi, E., Tulli, F., & Lanari, D. (1994). Arginine requirement and effect of different dietary arginine and lysine levels for fingerling sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 127(2), 207-218.
- Tulli, F., Vachot, C., Tibaldi, E., Fournier, V., & Kaushik, S. J. (2007). Contribution of dietary arginine to nitrogen utilisation and excretion in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets differing in protein source. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(1), 179-188.
- Twibell, R. G., & Brown, P. B. (1997). Dietary arginine requirement of juvenile yellow perch. *The Journal of nutrition*, 127(9), 1838-1841.
- Vellas F. and Serfaty A. (1974). Ammonia and urea in a freshwater teleost-carp. *J. Physiol.*, Paris 68, 591-614.
- Verburg-Van Kemenade, B. L., Stolte, E. H., Metz, J. R., & Chadzinska, M. (2009). Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish. *Fish physiology*, 28, 313-364.
- Walton, M. J. (1985). Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. *Nutrition and feeding in fish*, 47-67.
- Walton, M. J., Cowey, C. B., Coloso, R. M., & Adron, J. W. (1986). Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2(1-4), 161-169.
- Wilson, R. P., & Poe, W. E. (1987). Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono-and disaccharides as energy sources. *The Journal of nutrition*, 117(2), 280-285.
- Wilson, R. P., Cowey, C. B., & Adron, J. W. (1985). Effect of dietary electrolyte balance on growth and acid-base balance in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 82(2), 257-260.
- Wu, G., Bazer, F. W., Davis, T. A., Kim, S. W., Li, P., Rhoads, J. M. & Yin, Y. (2009). Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids*, 37(1), 153-168.
- Wu, G., Jaeger, L. A., Bazer, F. W., & Rhoads, J. M. (2004). Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(8), 442-451.
- Wu, G., Knabe, D. A., Yan, W., & Flynn, N. E. (1995). Glutamine and glucose metabolism in enterocytes of the neonatal pig. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 268(2), R334-R342.
- Wu, G., Wu, G. (2010). Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 1(1), 31-37.

- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., Shiraishi, M., Sánchez-Vázquez, F. J., & Tabata, M. (2000). Self-selection of diets with different amino acid profiles by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 187(3), 375-386.
- Yao, K., Yin, Y. L., Chu, W., Liu, Z., Deng, D., Li, T., & Wu, G. (2008). Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *The Journal of nutrition*, 138(5), 867-872.
- Yue, Y., Zou, Z., Zhu, J., Li, D., Xiao, W., Han, J., & Yang, H. (2013). Effects of dietary arginine on growth performance, feed utilization, haematological parameters and non-specific immune responses of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research*.
- Zarate, D. D., & Lovell, R. T. (1997). Free lysine (L-lysine·HCl) is utilized for growth less efficiently than protein-bound lysine (soybean meal) in practical diets by young channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 159(1), 87-100.
- Zehra, S., & Khan, M. A. (2013). Dietary arginine requirement of fingerling Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton). *Journal of the World Aquaculture Society*, 44(3), 363-373.
- Zhou, F., Shao, Q. J., Xiao, J. X., Peng, X., Ngandzali, B. O., Sun, Z., & Ng, W. K. (2011). Effects of dietary arginine and lysine levels on growth performance, nutrient utilization and tissue biochemical profile of black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, fingerlings. *Aquaculture*, 319(1), 72-80.
- Zhou, F., Xiong, W., Xiao, J. X., Shao, Q. J., Bergo, O. N., Hua, Y., & Chai, X. (2010). Optimum arginine requirement of juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. *Aquaculture Research*, 41(10), e418-e430.
- Zhou, H., Chen, N., Qiu, X., Zhao, M., & Jin, L. (2012a). Arginine requirement and effect of arginine intake on immunity in largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Nutrition*, 18(1), 107-116.
- Zhou, Q. C., Zeng, W. P., Wang, H. L., Xie, F. J., & Zheng, C. Q. (2012b). Dietary arginine requirement of juvenile yellow grouper *Epinephelus awoara*. *Aquaculture*, 350, 175-182.

Capítulo 2

Suplementação de arginina na dieta de tilápias cultivadas em tanque-rede

(artigo nas normas da revista Pesquisa Agripecuaria Brasileira)

Suplementação de arginina na dieta de tilápias cultivadas em tanque-rede

Rudã Fernandes Brandão Santos⁽¹⁾, Fabiana Pilarski⁽²⁾, Gabriela Pala⁽²⁾, Sílvia Umeda Gallani⁽²⁾, Gustavo Moraes Ramos Valladão⁽²⁾, Gisele Cavalcante Morais⁽³⁾, James Tomy Lee⁽⁴⁾, Natalino da Costa Sousa⁽⁵⁾, Rodrigo Yudi Fujimoto⁽⁶⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-420 Recife, PE, Brasil. E-mail: ruda_fernandes@hotmail.com

⁽²⁾Universidade Estadual Paulista, Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Bairro Rural, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: fapilarski@hotmail.com; sigallani@hotmail.com; gabi.caunesp@gmail.com; gmrvalladao@gmail.com

⁽³⁾Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Bentos, Centro de Estudos do Mar, Avenida Beira-Mar, s/n, Pontal do Sul, CEP 83255-976 Pontal do Paraná, PR, Brasil. E-mail: gisellymoraes@gmail.com

⁽⁴⁾Universidade Federal do Pará, Faculdade de Oceanografia, Instituto de Geociências, Rua Augusto Correa nº 01, Campus Universitário do Guamá CEP 66075-110 Belém, PA, Brasil. E-mail: james@ufpa.br

⁽⁵⁾Universidade Federal do Pará, Alameda Leandro Ribeiro, s/n, Aldeia, CEP 68600-000 Bragança, PA, Brasil. E-mail: natal159@yahoo.com.br

⁽⁶⁾EMBRAPA-Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3250, Jardins, CEP 49025-040 Aracaju, SE, Brasil. E-mail: ryfujim@hotmail.com

Resumo

A arginina é um aminoácido considerado essencial para os peixes, participando de diversas atividades metabólicas. O objetivo desse trabalho foi determinar a suplementação de arginina na dieta de tilápias criadas em tanques-rede através não somente do desempenho produtivo como também de variáveis bioquímicas, hemato-imunológicas e morfológicas. O experimento foi realizado em uma piscicultura comercial de produção de tilápias, localizada às margens do rio Tietê, na cidade de Arealva, São Paulo, Brasil. Foram utilizados 12 tanques-rede de 8m³, contendo quatro mil tilápias-do-Nilo por tanque-rede (500 peixes /m³), revertidas sexualmente e com peso médio de 63g ± 20. Os parâmetros bioquímicos analisados e os hematológicos da série branca demonstraram que a suplementação da arginina na concentração de 3,5% da matéria seca promove melhora no sistema hemato-imunológico dos peixes associado ao aumento da eficiência na metabolização e disponibilidade dos nutrientes para as tilápias cultivadas em tanque rede. A arginina na concentração de 4,1% na dieta provocou elevação da degeneração lipídica, da enzima alanina aminotransferase e da creatinina associado a diminuição da albumina, ureia, lactato e glicose.

Termos para indexação: nutrição, hematologia, bioquímica, índices morfológicos, histologia

Abstract

Arginine is an amino acid that is essential for fish, participating in various metabolic activities. The aim of this study was to determine the arginine supplementation in the diet of tilapia raised in cages through not only the production performance as well as biochemical, immunological and blood-morphological variables. The experiment was conducted in a commercial fish farming of tilapia production, located on the banks of

the Tiete River in the city of Arealva, São Paulo, Brazil. A total of 12 cages of 8m³, containing four thousand tilapia from the Nile by tank-net (500 fish / m³), sexually reverted with an average weight of 63g ± 20. Quantitative biochemical parameters and hematological white series demonstrated that supplementation of arginine at a concentration of 3.5% dry matter promotes improved blood-immune system of fish associated with increased efficiency in metabolism and nutrient availability for tilapia grown in network tank. Arginine at a concentration of 4.1% in the diet led to elevated lipid degeneration, the enzyme alanine aminotransferase and creatinine are associated with decrease of albumin, urea, lactate and glucose.

Index terms: nutrition, hematology, biochemical, morphological indices, histology

Introdução

A arginina é um aminoácido considerado essencial para os peixes, participando de diversas atividades metabólicas (NRC, 1993) como: a síntese de proteína muscular; síntese de ureia; creatina; hormônio de crescimento (GH); IGF1 (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1); e precursor de poliaminas, substâncias biologicamente importantes para o organismo (Ahmed & Khan, 2004; Kuçukbay *et al.*, 2008; Khan e Abidi, 2011).

Para tilápias, baseando-se em dados de desempenho produtivo a exigência nutricional está entre 1,18% a 1,53% da matéria seca (Santiago & Lovel, 1988; Yue *et al.*, 2013). Contudo, ainda não foi determinada a exigência de arginina para tilápias cultivadas em tanque-rede na fase de recria. A determinação da exigência desse aminoácido em tanque-rede é importante pois a exigência nutricional de uma espécie somente pode ser preconizada como correta, quando os resultados obtidos em campo forem semelhantes aos obtidos em condição laboratorial (Tacon, 1995).

No cultivo em tanque rede, os animais estão em constante estresse provocado pela alta densidade de estocagem, variações na qualidade de água e temperatura, correnteza que pode ocasionar fadigas musculares e nutrição inadequada (Fujimoto, 2010) que provoca aumento da exigência nutricional (Anderson, 1994, Papoutsoglou *et al.*, 1998). Essa situação estressante aumenta a demanda de energia consumida pelos peixes, aumentando a excreção de metabólitos e diminuindo o aproveitamento de nutrientes, ocasionando assim um aumento das exigências nutricionais (Anderson, 1994; Papoutsoglou *et al.*, 1998).

Além disso, esses agentes estressores comuns na criação em tanques rede podem causar um desequilíbrio na relação hospedeiro patógeno ambiente possibilitando a ocorrência de surtos de doenças oportunistas (Zanolo & Yamamura, 2006). Nesse sentido a suplementação da dieta de tilápias com arginina pode ser uma ferramenta viável na mitigação do estresse inerente a esse sistema de cultivo, pois esse aminoácido é o substrato para a produção de óxido nítrico, substância que desempenha um papel importante na modulação da resposta imune (Jobgen *et al.*, 2006) dos peixes. Aliado a isso, a suplementação oral de arginina em outros animais, como em ratos expostos a baixas temperaturas (5°C), hipóxia e a recuperação de hipotermia induzida, sugerem que a L-arginina possui forte atividade anti-estresse (Gupta *et al.*, 2005).

Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a concentração ideal de arginina na suplementação de tilápias criadas em condição de tanques-rede através da avaliação não somente do desempenho produtivo como também de variáveis bioquímicas, hemato-imunológicas e morfológicas.

Materiais e métodos

O experimento foi realizado em uma piscicultura comercial de produção de tilápias, localizada às margens do rio Tietê, na cidade de Arealva, São Paulo, Brasil. Foram utilizados 12 tanques-rede de 8m³, contendo quatro mil tilápias-do-Nilo por tanque-rede (500 peixes /m³), revertidas sexualmente e com peso médio de 63g ± 20.

Delineamento experimental e manejo

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos, correspondendo as concentrações de arginina na dieta (2,3; 2,9; 3,5; e 4,1% da matéria seca) com 3 repetições. O experimento teve duração de 45 dias e correspondeu a primeira fase de engorda das tilápias em tanque-rede (recria). Durante o período experimental os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (*ad libitum*), às 9:00 e às 15:00 h com as rações experimentais.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Jaboticabal, sob o protocolo de número (028056/13), estando de acordo com os Princípios Éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Dietas experimentais

A dieta base utilizada foi fornecida pela Trouw Nutrition® Brasil. As dietas possuíam granulometria entre 4-6mm. As composições nutricionais das dietas usadas no presente experimento estão expostas na tabela 1. A dieta base era constituída de: farinha de peixe, farelo de soja e glúten de milho como fontes de proteína e óleo de soja como fonte de lipídeos e continha 2,3% de arginina em sua composição. A partir dessa dieta

base foi adicionada L arginina nas concentrações de 0,6%; 1,2%; e 1,8%, resultando nas dietas com 2,3% de arginina/matéria seca (controle), 2,9%, 3,5% e 4,1% (Tabela 1).

A suplementação da arginina nas dietas foi realizada antes da extrusão das mesmas. Para tanto, foi realizada uma pré-mistura com as concentrações crescentes do aminoácido. As dietas foram então extrusadas, secas e armazenadas em local fresco e arejado. A confecção das dietas experimentais foi realizada na fábrica de ração da Trouw Nutrition® em Pitangueiras, SP (Brasil).

Análise de água

Os parâmetros de água foram monitorados diariamente. Foram determinadas a temperatura, o pH, o oxigênio dissolvido na água e amônia em quatro pontos da fazenda próximos aos tanque-rede.

Desempenho produtivo

Duas biometrias foram realizadas, uma no início e outra no fim do experimento para aferir o peso (g) e o comprimento (cm) dos peixes. Todos os peixes de cada parcela foram pesados e uma subamostra de 75 peixes foi coletada para determinação do peso e comprimento médio dos peixes. Assim, foram determinados a biomassa total, o número de indivíduos em cada parcela, o peso e comprimento médio de cada lote. Para tanto os peixes foram capturados em lotes e pesados. A subamostra foi capturada com o auxílio de um púça, e anestesiados em solução de óleo de cravo (60 mg.L^{-1}), e então pesados e medidos.

O consumo de ração foi aferido diariamente para cada tanque rede. Após a obtenção dos dados da biometria e de consumo de ração foram determinados os índices de desempenho produtivo através das equações:

Ganho em porcentagem de biomassa do lote (GP %): $GP\% = (\text{peso final do lote} \times 100 / \text{peso inicial do lote})$;

Conversão alimentar aparente (CAA): $CAA = \text{Consumo de ração} / \text{ganho de biomassa do lote}$;

Taxa de crescimento específico (TCE): $TCE = (100 \times (\text{In peso final} - \text{In peso inicial} / \text{dias de experimento}))$.

Análises bioquímicas

Para avaliar o metabolismo proteico e da arginina foram realizadas análises bioquímicas. Para tanto realizou-se a coleta do sangue de oito peixes de cada parcela ao final do experimento. Os peixes foram capturados e anestesiados com solução de óleo de cravo e então por punção dos vasos caudais uma amostra de sangue foi retirada para análises.

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras séricas utilizando um espectrofotometro. O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos a 3500 rpm por 5 minutos. Kits de diagnóstico padronizados (Labtest®) foram utilizados para as avaliações espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: glicose (GOD-Trinder), aspartato transaminase (AST) (método cinético UV-IFCC), alanina transaminase (ALT) (método cinético UV-IFCC), proteínas totais (método biureto), uréia (método urease C.E. Labtest), albumina (método de bromacresol), creatinina (método Lustosa Basques) e lactato desidrogenase (LDH) (enzimático -Trinder). Os valores séricos da globulina foram obtidos através da diferença entre proteínas totais e albumina e pela divisão dos valores da albumina pelos valores da globulina obteve-se a relação albumina/globulina.

Análises Hematológicas e imunológicas

Para a avaliação sanitária dos animais os ensaios hematoimunológicos foram realizados, para tanto, amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante (heparina sódica) diluído em 2,0 mL de formol citrato para a contagem de eritrócitos, determinação da quantidade de hemoglobina, taxa de hematócrito, número de leucócitos e trombócitos totais e contagem diferencial de leucócitos.

Para a contagem de eritrócitos foram utilizados 10 µL de sangue para posterior contagem em câmara de Neubauer. A determinação da quantidade de hemoglobina presente no sangue foi realizada através do método da cianometahemoglobina (Collier, 1944). A taxa de hematócrito foi determinada em tubo capilar através da centrifugação do sangue em centrífuga de microhematócrito a 1500 G por cinco minutos (Goldenfarb *et al.*, 1971). Após a obtenção destes dados foram calculados os índices hematimétricos segundo Wintrobe (1934): Volume Corpuscular Médio (VCM) ($VCM = Ht \times 10 / Er$ em fentolitros); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) ($HCM = Hb \times 100 / Er$ em picograma/ célula); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) ($CHCM = Hb \times 100 / Ht$ em g/dl).

A contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos foi realizada através de extensões sanguíneas, secas ao ar e coradas com corante May-Grünwald-Giemsa-Wriht (Tavares-Dias & Moraes, 2006) por 10 minutos. Posteriormente, sobre microscopia de luz, foi realizada a contagem indireta de leucócitos e trombócitos, segundo Ishikawa *et al.*, (2008).

Além desses parâmetros foram avaliadas as respostas imunológicas inespecíficas do busrt respiratório e sistema complemento. Para a avaliação da atividade respiratória dos leucócitos (“burst” oxidativo), 100 µL de sangue contendo anticoagulante foram adicionados em 100 µL de tampão fosfato (pH 8.4) contendo nitroazul de tetrazolium

(NBT), na proporção de uma pastilha para cada 5 mL de tampão. Após incubação por 30 minutos, 50 µL desta solução foi adicionada a 1 mL de N,N-dimetilformamida, agitado, centrifugado a 450 rpm por 5 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro à 540 nm. Este foi realizado de acordo com Anderson & Siwichi (1995), modificado por Biller-Takahashi *et al.*, (2013).

A determinação da atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento também foi avaliada. Essa análise foi realizada de acordo com Polhill *et al.*, (1978), adaptado por Biller-Takahashi (2012). Foi realizado um ensaio cinético para determinar o tempo necessário para cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Para o preparo da suspensão, 5 mL de sangue foi adicionado com o mesmo volume de solução Alséver (anticoagulante pH 6,1) e colocado em tubo de 50 mL com o mesmo volume de trietanolamina (TEA), ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10 nM pH 7,4 e gelatina a 0,1%. A suspensão foi então incubada por 15 minutos, a 37°C, e centrifugada a 480g, por 10 minutos, a 4 °C. O mesmo procedimento foi repetido três vezes. Nas duas primeiras, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão TEA – Mg²⁺ 2 nM, pH 7,4. Na última, depois de descartado o sobrenadante, a solução de Alséver foi utilizada para ressuspensão das células, que foram armazenadas a 4 °C. As amostras de soro, mantidas a - 80 °C, foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em tampão TEA-EGTA 8mM e Mg²⁺ 2 mM, com gelatina 0,1%, na proporção de 1:10, previamente padronizada para soro de peixe. Desta forma, 60 µL de amostra e 140 µL de tampão foram pipetados em cubeta de 1mL. Na sequência, foram pipetados 400 µL da suspensão de hemácias e realizada a leitura cinética em espectrofotômetro, durante 10 minutos, com leituras a cada 20 segundos, em comprimento de onda de 700 nm. A atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento é determinada pela

velocidade com que cada amostra é capaz de lisar 50% da suspensão de hemácias (Biller-Takahashi *et al.*, 2012).

Análises morfológicas e histológicas

Complementando as análises zootécnicas, bioquímicas e hematoimunológicas, foram avaliadas ainda aspectos morfológicos das brânquias e do fígado. Essa análise foi realizada ao final do período experimental em cinco animais de cada tanque-rede que foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico. Posteriormente a morte dos peixes, o fígado e o baço foram retirados e pesados para a determinação dos índices hepatossomático (IHS), esplenossomático (IES), obtidos através do quociente entre o peso do órgão e o peso corporal ($IHS, IES = \text{Peso do órgão} / \text{peso corporal}$).

Para a avaliação histológica foram coletados 3 animais de cada tratamento ao final do período experimental. Após a coleta dos peixes, estes foram eutanasiados (banho com óleo de cravo) e então extraídos fragmentos das brânquias (primeiro arco branquial) e do fígado. Estas amostras foram etiquetadas e armazenadas em frascos plásticos e fixados em formaldeído tamponado (10%) por 24 horas e então, lavadas e conservadas em álcool 70%.

Posteriormente as referidas amostras foram transferidas para concentrações de álcoois crescentes de 70% a 100%, ficando imersas por 30 minutos em cada concentração. Em seguida, as mesmas foram imersas em xilol por 1 hora, então se realizou-se a inclusão em parafina.

A seguir foi realizada a inclusão do material em Paraplast® (Sigma). Após a inclusão os fragmentos foram cortados em micrótomo automático (LEICA, RM-2245) em espessura 5 µm.

Os cortes histológicos foram então submetidos às colorações de hematoxilina/eosina (HE). Estes procedimentos estão de acordo com os preconizados por BEHMER et al. (1976).

Análise estatística

Após obtenção dos dados, estes foram submetidos a avaliação das premissas de normalidade e homocedasticidade. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p=0,01$), sendo F significativo foi realizado o teste de Tukey ($p=0,05$) para a comparação das médias.

Resultados

Durante o experimento, os valores médios de temperatura e oxigênio dissolvido da água oscilaram entre $25,3 \pm 1,13^{\circ}\text{C}$ e $3,75 \pm 0,87\text{mg/L}$, respectivamente. O pH variou entre $7,47 \pm 0,24$ e amônia entre $0,0055 \pm 0,004\text{mg/L}$, estando esses valores dentro da faixa ideal para o cultivo da espécie em questão (APHA, 1995).

As variáveis de desempenho produtivo das tilápias cultivadas em tanque-rede durante o período experimental estão expostos na tabela 2 e não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) para o ganho em porcentagem de biomassa, taxa de crescimento específico e conversão alimentar aparente.

Ao contrário do observado nos parâmetros zootécnicos, os resultados bioquímicos apresentaram diferenças significativas com a adição da arginina na dieta. A ureia, albumina, lactato e glicose aumentaram com a inclusão de arginina até a suplementação de 3,5%. A creatinina e o ALT foram menores nas concentrações de 2,9 e 3,5% (tabela 3). Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas.

Para os parâmetros hematológicos da série vermelha, como os eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, estes não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de suplementação com arginina (tabela 4). Porém observou-se diferença significativa nos índices hematimétricos para os parâmetros hematológicos da série branca. Os leucócitos totais aumentaram com o aumento da suplementação com arginina. Os neutrófilos, monócitos e trombócitos apresentaram o maior valor nos peixes suplementados com arginina (tabela 4). Os linfócitos aumentaram até a concentração de 4,1% de arginina na dieta. Contrariamente, observou-se redução do burst respiratório nas maiores concentrações de arginina. E apesar do aumento dos leucócitos, a atividade das proteínas do sistema complemento não foram alteradas com a suplementação com arginina (tabela 4).

Avaliando a morfologia dos órgãos metabólicos e hematopoiéticos observou-se que o índice hepatossomático e o esplenossomático apresentaram comportamento semelhante, com aumento do tamanho na concentração de 2,9% e redução nas maiores concentrações da suplementação com arginina (tabela 5).

Pela análise histológica foi possível identificar que os peixes cultivados no tratamento controle foram os que apresentaram as maiores alterações morfológicas nas brânquias (figura 1A, 1B). As brânquias dos peixes alimentadas com a dieta controle (2,3%) apresentaram edema com destacamento epitelial, intensa hiperplasia com fusão lamelar, congestão causando aneurismas nas lamelas secundárias e aparente maior concentração de parasitas. Apesar da aparente maior concentração de parasitas sua contagem total não foi possível. Com a inclusão de arginina na dieta até a concentração de 4,1% de arginina foi observada redução desses danos na morfologia branquial das tilápias cultivadas em tanque-rede (figura 1C, 1D, 1E). Mesmo ocorrendo a redução da hiperplasia ela se manteve em todos os tratamentos, porém com diferente intensidade.

Discussão

Considerando somente os resultados dos dados de desempenho zootécnico, a concentração de 2,3% de arginina atenderia os valores preconizados em ensaios laboratoriais por Furuya *et al.*, (2004), contudo, avaliando os dados complementares observa-se que a exigência em arginina pelas tilápias aumentou quando cultivadas em tanque-rede. Esse experimento corrobora com a premissa de Tacon (1995) que aponta que a realização de experimentos simulando a condição real de cultivo é essencial para determinar o valor exigido por uma dada espécie reiterando que o desempenho dos peixes em condição real de cultivo deve ser pelo menos igual ao achado em experimentos controlados. Porém, segundo o autor isso não é prática em ensaios de nutrição, citando como exemplo as cinco espécies mais criadas no mundo: *Hypophthalmichthys molitrix*, *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon ideli*, *Hypophthalmichthys nobilis* e *Chanos chanos* (representam 57% da produção mundial), onde poucos trabalhos foram realizados com aplicação prática nos sistemas de produção empregados.

No presente trabalho a não diferença significativa no desempenho produtivo das tilápias alimentadas com as dietas contendo diferentes concentrações de arginina, provavelmente ocorreu devido ao curto tempo do experimento, 45 dias. Outros autores também não encontraram respostas positivas no desempenho produtivo com a suplementação de arginina na dieta do *Salmo salar* (Berge *et al.*, 1997), *Salmo gairdneri* (Kaushik *et al.*, 1988), *Oncorhynchus kisutch* (Luzana *et al.*, 1998) e *Catla catla* (Zehra e Khan, 2013).

Como a determinação da exigência nutricionais de peixes, baseado somente em dados de desempenho produtivo possui limitações, a investigação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos se apresentam como ferramentas que complementam os

resultados de desempenho produtivo podendo então auxiliar na determinação da exigência nutricional (Alam *et al.*, 2002; Ahmed, 2012; Yue *et al.*, 2013).

Observou-se que houve um aumento no metabolismo proteico nos peixes alimentados com dietas suplementadas com 2,9 e 3,5% de arginina, reflexo esse do aumento da albumina e da uréia. A albumina representa o reservatório móvel de aminoácidos do fígado para os tecidos periféricos e advém do catabolismo de proteínas. O catabolismo de proteínas é mediado pela arginina que é um doador de aminas no metabolismo do nitrogênio, promovendo o aumento do catabolismo de proteínas (Haralambie & Berge, 1976; Alam *et al.*, 2002a; Alam *et al.*, 2002b) e consequentemente aumentando a liberação de ureia.

O maior metabolismo apontado no presente trabalho também pode estar atrelado a maior produção de óxido nítrico. O óxido nítrico é uma substância que tem a arginina como precursora, sendo um potente vasodilatador, propiciando um maior fluxo sanguíneo e consequentemente de nutrientes para os tecidos o que aumentaria também sua metabolização (Bello, 2000; Sales *et al.*, 2005) e explica a elevação de glicose e lactato observados nas concentrações de 2,9 e 3,5% de arginina em relação ao controle. Paolisso *et al.*, (1997) apontaram que de alguma forma o oxido nítrico é capaz de modular captação de glicose mediada pela insulina. E a vasodilatação provocada pelo oxido nítrico permite uma maior remoção do lactato das células para o sangue, aumentando sua concentração plasmática. Essa relação arginina-oxido nítrico e seus efeitos no lactato e glicose é denominada de paradoxo da arginina (Bello, 2000; Sales *et al.*, 2005).

E como o oxido nítrico impede a aderência de leucócitos ao endotélio vascular e a migração de leucócitos à parede vascular, aumentando a concentração dessas células no plasma sanguíneo (Cerqueira & Yoshida *et al.*, 2002) essa pode ter sido a causa da

elevação dos parâmetros hematológicos da série branca com o acréscimo de arginina na dieta. Mas o aumento dos leucócitos também pode estar relacionado a produção de poliaminas a partir da arginina. As poliaminas são importantes substratos para a proliferação celular (Li *et al.*, 2009).

O aumento do baço que é um órgão hematopoético também ocorreu com o aumento da suplementação com arginina, o que corrobora a maior produção de células hematopoéticas. A diferença significativa no índice esplenossomático entre os tratamentos (4,1% e controle) evidencia que a suplementação de arginina favoreceu o aumento de células de defesa, influenciado pela ação do aminoácido sobre as células jovens presentes nesse órgão, eritro e leucopoético (Quentel & Obach, 1992) e a esplenomegalia sugere um aumento de respostas leucocitárias como resposta a infecções principalmente (Lowe-Jinde, 1980).

Apesar dessa relação ser independente da origem celular, as células vermelhas não foram alteradas pela suplementação com arginina, porém os leucócitos, especificamente os monocitos, trombócitos e neutrófilos tiveram seus valores alterados pela arginina. Essas células produzem espécies reativas de nitrogênio, que são úteis para a eliminação de agentes patogênicos, demonstrando uma melhora do sistema imunológico.

O aumento dos neutrófilos (2,9% de arginina) pode ter aumentado a produção de reativos intermediários de nitrogênio (RNS) (Kirk *et al.*, 1990) ao invés de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido a algum mecanismo celular dos organismos para realizar uma compensação entre a formação de ROS/RNS (Cerqueira *et al.*, 2007). Nos tratamentos com 3,5 e 4,1% de arginina o aumento global dos leucócitos, principalmente linfócitos, podem ter elevado as espécies reativas de oxigênio (Biller-Takahashi *et al.*, 2013) provocando a elevação do burst respiratório. Resumidamente

pode se inferir que a partir do tratamento com 3,1% de arginina, a menor produção de neutrófilos diminuiu sua contribuição na formação de RNS, o que favoreceu o aumento dos ROS e consequentemente aumentou o burst respiratório nos tratamentos com 3,5 e 4,1% de arginina.

Como relatado, as situações estressantes observadas nos sistemas de tanque rede podem alterar a exigência nutricional. Essa situação estressante pode ser verificada pela morfologia das brânquias e do fígado observados nos peixes do controle. As condições morfológicas das brânquias dos peixes do grupo controle apresentaram um elevado grau de hiperplasia e fusão lamelar, elevada presença de parasitos, elevação epitelial das lamelas secundárias e aneurismas. Todos esses sinais clínicos podem ser associados a agentes estressores ambientais desconhecidos no sistema de produção, mas que de toda forma podem indicar influência de componentes tóxicos na água (Lins *et al.*, 2010). Essas alterações induziram os peixes a aumentarem o HCM e o CHCM no tratamento controle para compensar a falta de oxigênio captado pelas brânquias.

Reflexos dessa condição também foram observados no fígado do tratamento controle que apresentou degeneração lipídica, que pode ter sido provocada pela presença de produtos tóxicos na água ou pela ingestão excessiva de carboidratos que podem resultar na síntese aumentada de ácidos graxos, com formação excessiva de triglicerídeos nos hepatócitos (Silva & Gonçalves, 2008). Além disso, em condições de estresse, um aumento da peroxidação lipídica com formação de radicais livres podem causar danos nesse órgão (Del Maestro *et al.*, 1980; Janero, 1990).

Nessas condições foi observado que a inclusão da arginina nos níveis de suplementação de 2,9 e 3,5% reduziram os efeitos deletérios encontrados nas brânquias e fígado. A L-arginina melhora a resistência das células hepáticas, associado a isso a

produção de óxido nítrico melhora a microcirculação entre os hepatócitos reduzindo os efeitos deletérios provocados por substâncias tóxicas (Saad, 2012).

Apesar dos benefícios observados nas concentrações de 2,9 e 3,5% de arginina, um possível efeito tóxico foi observado na concentração de 4,1%. No tratamento com 4,1% de arginina ocorreu a elevação da enzima alanina aminotransferase (ALT). Essa enzima é utilizada como indicadora de dano celular, tanto em mamíferos como em peixes (Das *et al.*, 2004; Raminejad *et al.*, 2014) indicando uma toxicidade da arginina ou de seus produtos no fígado dos peixes. Chen *et al.*, (2012), Zhou *et al.*, (2011) e Raminejad *et al.*, (2014) também estudaram o efeito da arginina sob o aspartato aminotransferase (AST) e a da ALT e identificaram uma elevação significativa do ALT com a inclusão de arginina na dieta evidenciando a elevação da desaminação e transaminação no catabolismo de aminoácidos, resultado da diminuição da eficiência de utilização proteica nas maiores concentrações de arginina na dieta (Zhou *et al.*, 2011).

O aumento do ALT (4,1%) e o dano celular que essa enzima indica aumento da degeneração lipídica em relação aos tratamentos com 2,9 e 3,5% de arginina. Assim, a diminuição do valor da albumina, juntamente com a elevação do ALT são apontados como sinais clínicos da degeneração lipídica (Silva & Gonçalves, 2008) e reiteram a justificativa de Zhou *et al.*, (2011) em relação a dietas com excesso de arginina.

A redução da ureia plasmática no tratamento com 4,1% de arginina corrobora com os achados acima e pode ter sido provocada pela toxicidade da arginina devido a um desbalanço de aminoácidos da dieta (Coloso *et al.*, 1999; Murilo-Gurrea *et al.*, 2001; e Chen *et al.*, 2012) que diminuiu a eficiência da excreção desse metabolito. Assim, os resultados sugerem que as tilápias nesse tratamento tiveram sua capacidade de metabolizar proteínas comprometidas, diminuindo a concentração plasmática de

albumina, principal proteína transportadora de lipídeos, favorecendo o aumento da degeneração lipídica e do aumento da ALT.

A toxicidade observada no tratamento com 4,1% de arginina pode ter sido potencializada pela elevação de leucócitos, que propiciou o aumento do óxido nítrico na sua isoforma induzível (iNOS), resultando na liberação de grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos, provocando respostas tóxicas no fígado (Moncada, 1997; Tibiriça, 2001) elevando a ALT. O aumento do óxido nítrico explicaria o valor de creatinina observado no tratamento com 4,1% de arginina, evidenciando que ocorreu a diminuição na taxa de filtração glomerular (Freire *et al.*, 2008) em relação aos tratamentos com 2,9 e 3,5% de arginina, comportamento fisiológico que significa a diminuição da excreção de compostos nitrogenados ou caracteriza algum problema nos rins (Kaneko *et al.*, 1997).

Assim, constatou-se a importância da inclusão da arginina acima do preconizado na literatura para tilápias (Lovel & Santiago, 1989; e Yue *et al.*, 2013) cultivadas em tanque rede. Até um limite 3,5 % de arginina na dieta ocorreu elevação da albumina, lactato, glicose e ureia. As alterações histológicas nas brânquias e no fígado foram menos intensas nos tratamentos que receberam a suplementação de arginina. A inclusão desse aminoácido favoreceu uma esplenomegalia associada a elevação de leucócitos e trombócitos. E os achados histológicos do fígado sugerem que o nível de arginina no tratamento controle pode não ter sido suficiente para manter a homeostasia dos peixes sob cultivo, prejudicando o funcionamento normal desse órgão. Além disso um efeito tóxico da arginina pode ser observado na concentração com 4,1% de arginina.

Conclusão

Os parâmetros bioquímicos e os hematológicos da série branca demonstraram que a suplementação da arginina na concentração de 3,5% da matéria seca promove melhora no sistema hemato-imunológico dos peixes associado ao aumento da eficiência na metabolização e disponibilidade dos nutrientes para as tilápias cultivadas em tanque rede.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento do projeto. A Ajinomoto pela doação da arginina. A Trow Nutrition, pela extrusão das rações experimentais e disponibilização das formulas para a realização da suplementação. A Piscicultura Toca de Tilápia pelo fornecimento da infra estrutura básica necessária para a realização das atividades, fornecimento dos insumos (ração e peixes) e dos colaboradores para a execução das atividades a campo. E a Prevet por disponibilizar os dados hídricos da propriedade durante o período experimental.

Referencias

AHMED, I. Dietary amino acid l-tryptophan requirement of fingerling Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), estimated by growth and haemato-biochemical parameters. **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1195-1209, 2012.

AHMED, I.; KHAN, M. A. Dietary arginine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 217-225, 2004.

AKIYAMA, T.; OOHARA, I.; YAMAMOTO, T. Comparison of Essential Amino Acid Requirements with A/E Ratio among Fish Species (Review Paper). **Fisheries science**, v. 63, n. 6, p. 963-970, 1997.

ALAM, M. S.; TESHIMA, S. I.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M. Arginine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters. **Aquaculture**, 205(1), 127-140. 2002.

ALAM, M. S.; ICHI, T., S.; YANIHARTO, D.; SUMULE, O.; ISHIKAWA, M.; KOSHIO, S. Assessment of reference dietary amino acid pattern for juvenile red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture International**, v. 13, n. 4, p. 369-379, 2005.

- ALAM, S.; TESHIMA, S. I.; YANIHARTO, D. KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M. Influence of different dietary amino acid patterns on growth and body composition of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 210, n. 1, p. 359-369, 2002.
- ANDERSON, D. P.; SIWICKI, A. K. Basic hematology and serology for fish health programs. 1995.
- APHA, AWWA. WEF: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington, DC. 1995.
- BELLO, E.; CAMELO, C. Increase of tubular secretion of creatinine by L-arginine: mechanism of practical significance in the assessment of renal function based on creatinine clearance. **Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia**, v. 20, n. 6, p. 517-522, 1999.
- BERGE, G.; LIED, E.; SVEIER, HARALD. Nutrition of Atlantic salmon (*Salmo salar*): the requirement and metabolism of arginine. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 117, n. 4, p. 501-509, 1997.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; SAITA, M. V.; GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 2, p. 425-429, 2013.
- BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; URBINATI, E. C. Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p. 237-241, 2012.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, p. 417-423, 2002.
- CHEN, G.; FENG, L.; KUANG, S.; LIU, Y.; JIANG, J.; HU, K.; ZHOU, X. Effect of dietary arginine on growth, intestinal enzyme activities and gene expression in muscle, hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 02, p. 195-207, 2012.
- COLLIER, H. B. Standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, n. 6, p. 550, 1944.
- COLOSO, R. M.; MURILLO-GURREA, D. P.; BORLONGAN, I. G.; CATAUTAN, M. R. Sulphur amino acid requirement of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 15, n. 2, p. 54-58, 1999.
- DAS, P. C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J. K.; DAS, B. K. Acute toxicity of ammonia and its sub-lethal effects on selected haematological and enzymatic parameters of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 2, p. 134-143, 2004.
- FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P. D.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. D.; VARELLA, J. E. D. A.; DINIZ, D. G. Effects of chromium supplementation on the infrapopulations of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenoidea) and *Piscinoodinium pillulare* (Dinoflagellida) parasites of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 827-833, 2010.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PEZZATO, A. C.; FURUYA, V. R.; MIRANDA, E. C. Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 12, p. 1110-1116, 2004.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

GUPTA, V.; GUPTA, A.; SAGGU, S.; DIVEKAR, H. M.; GROVER, K., & KUMAR, R. Anti-stress and adaptogenic activity of L-arginine supplementation. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 93-97, 2005.

HARALAMBIE, G.; BERG, A. Serum urea and amino nitrogen changes with exercise duration. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 36, n. 1, p. 39-48, 1976.

ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe *Oreochromis Niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, p. 54-63, 2008.

JOBGEN, W. S.; FRIED, S. K.; FU, W. J.; MEININGER, C. J.; WU, G. Regulatory role for the arginine–nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 9, p. 571-588, 2006.

KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. **Clinical biochemistry of domestic animals**, v. 5, p. 117-138, 1997.

KAUSHIK, S. J.; FAUCONNEAU, B.; TERRIER, L.; GRAS, J. Arginine requirement and status assessed by different biochemical indices in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Aquaculture**, v. 70, n. 1, p. 75-95, 1988.

KHAN, M. A.; ABIDI, S. F. Dietary arginine requirement of *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch) based on growth, nutrient retention and haematological parameters. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 418-428, 2011.

KIRK, S. J.; REGAN, M. C.; BARBUL, A. Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 173, n. 2, p. 660-665, 1990.

KÜÇÜKBAY, F. Z.; YAZLAK, H.; SAHIN, N.; AKDEMIR, F.; ORHAN, C.; JUTURU, V.; SAHIN, K. Effects of dietary arginine silicate inositol complex on mineral status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 3, p. 257-262, 2008.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino acids**, v. 37, n. 1, p. 43-53, 2009.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 469-484, 2010.

- LOWE-JINDE, L. Observations of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, infected with *Cryptobia salmostica*. **Journal of Fish Biology**, v. 17, n. 1, p. 23-30, 1980.
- LUZZANA, U.; HARDY, R. W.; HALVER, J. E. Dietary arginine requirement of fingerling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 163, n. 1, p. 137-150, 1998.
- MILLAMENA, O. M.; BAUTISTA-TERUEL, M. N.; REYES, O. S.; KANAZAWA, A. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. **Aquaculture**, v. 164, n. 1, p. 95-104, 1998.
- MURILLO-GURREA, D. P.; COLOSO, R. M.; BORLONGAN, I. G.; SERRANO, A. E. Lysine and arginine requirements of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, n. 2, p. 49-53, 2001.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. COMMITTEE ON THE NUTRIENT REQUIREMENTS OF FISH AND SHRIMP. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. National academies press, 2011.
- PAOLISSO, G.; TAGLIAMONTE, M. R.; MARFELLA, R.; VERRAZZO, G., D'ONOFRIO, F.; GIUGLIANO, D. L-arginine but not D-arginine stimulates insulin-mediated glucose uptake. **Metabolism**, v. 46, n. 9, p. 1068-1073, 1997.
- PAPOUTSOGLOU, S. E.; TZIHA, G.; VRETTOS, X.; ATHANASIOU, A. Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. **Aquacultural Engineering**, v. 18, n. 2, p. 135-144, 1998.
- POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON JR. R. B. Kinetic assessment of alternative complement pathway in a hemolytic system. Experimental and mathematical analysis. **Journal of Immunology**, v.121, p.363-370, 1978.
- QUENTEL, C.; OBACH, A. The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. **Journal of fish biology**, v. 41, n. 5, p. 709-716, 1992.
- RAHIMNEJAD, S.; LEE, K. Dietary arginine requirement of juvenile red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 434, p. 418-424, 2014.
- SAAD, E. A. Curative and protective effects of L-arginine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 423, n. 1, p. 147-151, 2012.
- SALES, R. P.; MINÉ, C. E. C.; FRANCO, A. D.; RODRIGUES, E. L.; PELÓGIA, N. C. C., SILVA, R. D. S.; RIBEIRO, W. Efeitos da suplementação aguda de aspartato de arginina na fadiga muscular em voluntários treinados. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 6, p. 347-51, 2005.
- SANTIAGO, C. B.; LOVELL, R. T. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. **The journal of nutrition**, v. 118, n. 12, p. 1540-1546, 1988.
- SHIAU, S.; HUANG, S. Optimal dietary protein level for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) reared in seawater. **Aquaculture**, v. 81, n. 2, p. 119-127, 1989.

SILVA, L. B.; GONÇALVES, P. Degeneração gordurosa (lipidose hepática). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, 2008.

TACON, A. G. J. Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming systems. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 11, n. 3-4, p. 205-214, 1995.

TAVARES-DIAS, M.; DE MORAES, F. R. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, 2006.

TIBIRIÇÁ, E. **Fisiopatologia em medicina cardiovascular**. Revinter, 2001.

WINTROBE, M. M. Anemia: classification and treatment on the basis of differences in the average volume and hemoglobin content of the red corpuscles. **Archives of Internal Medicine**, v. 54, n. 2, p. 256-280, 1934.

YUE, Y.; ZOU, Z.; ZHU, J.; LI, D.; XIAO, W.; HAN, J.; YANG, H. Effects of dietary arginine on growth performance, feed utilization, haematological parameters and non-specific immune responses of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture Research**, 2013.

ZANOLO, R.; YAMAMURA, M. H. Parasitas em tilápias-do-nilo criadas em sistema de tanques-rede. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 281-288, 2006.

ZEHRRA, S.; KHAN, M. A. Dietary arginine requirement of fingerling Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, n. 3, p. 363-373, 2013.

ZHOU, F.; SHAO, Q. J.; XIAO, J. X.; PENG, X.; NGANDZALI, B. O.; SUN, Z.; NG, W. K. Effects of dietary arginine and lysine levels on growth performance, nutrient utilization and tissue biochemical profile of black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, fingerlings. **Aquaculture**, v. 319, n. 1, p. 72-80, 2011.

Tabelas

Tabela 1- Composição bromatológica e níveis de suplementação de arginina nas dietas experimentais.

	Nível de suplementação de aminoácidos nas dietas			
	2,3%	2,9%	3,5%	4,1 %
Suplementação de aminoácidos				
L-Arginina	0	0,6	1,2	1,8
Composição com base na matéria seca (%)				
Proteína bruta	35	35	35	35
Proteína digestível	29	29	29	29
Extrato etéreo	4,39	4,39	4,39	4,39
Fibra bruta	7,35	7,35	7,35	7,35
Material mineral	9,81	9,81	9,81	9,81
Cálcio	1,82	1,82	1,82	1,82
Fósforo	1,31	1,31	1,31	1,31
Ac. Glutâmico	4,99	4,99	4,99	4,99
Arginina	2,3	2,9	3,5	4,1
Arg/lis	1,13	1,42	1,72	2,01
Lisina	2,03	2,03	2,03	2,03

Tabela 2. Desempenho produtivo de tilápias alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de Arginina baseadas em porcentagem da matéria seca na dieta.

Desempenho produtivo	2,3%MS Controle	2,9%MS arginina	3,5%MS arginina	4,1%MS arginina	F	P
Ganho de biomassa (%)	161,11±10	168,54±13	190,55±10	177,84±34	2,76	0,049
T. C. E. (%)	2,04±0,08	2,09±0,11	2,26±0,07	2,16±0,27	5,99	0,1
Conversão alimentar	1,34±0,13	1,22±0,14	1,15±0,09	1,15±0,10	2,87	0,043

T.C.E., Taxa de Crescimento Específico

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de tilápias alimentadas com dietas suplementadas com diferentes concentrações de arginina.

	2,3%MS Controle	2,9%MS arginina	3,5%MS arginina	4,1%MS arginina	F	P
Proteínas totais ml.dL ⁻¹	3,67±0,3	3,16±0,4	3,00±0,4	3,59±0,5	0,98	0,59
Albumina mg.dL-1	0,95±0,15 ab	0,92±0,17 ab	1,01±0,13 a	0,87±0,12 b	4,26	0,0076
Globulina mg.dL-1	2,71±0,35	2,57±0,36	2,55±0,42	2,72±0,5	0,93	0,57
Relação Alb:Glo	0,36±0,09	0,36±0,09	0,40±0,08	0,33±0,07	2,9	0,39
Creatinina mg.dL-1	0,4±0,13ab	0,23±0,1a	0,3±0,1ab	0,41±0,15b	4,57	0,0062
Uréia mg.dL-1	3,06±1,25 ^a	4,29±1,17ab	4,4±1,71b	3,59±1,38b	2,8	0,047
Lactato mg.dL-1	46,41±18 ^a	78,65±19c	66,54±17bc	59,26±23ab	6,74	0,009
Glicose mg.dL-1	63,93±15ab	66,14±12ab	73,68±23a	49,12±22b	3,16	0,03
Ast mg.dL-1	77,78±50	69,3±38	48,11±15	57,75±38	1,77	0,1615
Alt mg.dL-1	4,91±1,69 ^a	3,99±1,89a	4,51±1,53a	7,13±3,67b	8,9	0,0002

Tabela 4. Parâmetros hematológicos de tilápias alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de arginina.

	2,3%MS Controle	2,9%MS arginina	3,5%MS arginina	4,1%MS arginina	F	P
Eritrócitos (10^6)	1,99±0,49	1,90±0,37	1,84±0,23	1,64±0,29	2,73	0,05
Hemoglobina g.dL ¹	7,32±0,9	7,11±1,7	7,11±0,9	7,57±0,9	0,45	0,721
Hematócrito %	35,70±5,2	38±3,2	38±2,2	34,80±3,2	3,02	0,35
VCMfL	196±50	212±63	210±27	221±45	0,51	0,68
HCM pg	40,26±10 ab	37,24±12 a	38,03±7,5 ab	46,56±9,2 b	2,92	0,04
CHCM g.dL ⁻¹	21,20±2,4 a	17,11±3,2 b	17,83±2,4 b	20,93±2,5 a	8,79	0,0002
Leucócitos totais n°/μL	24429±871 ^a	28732±842b	29753±1919bc	31069±989c	40	0,0001
Linfócitos n°/μL	18987±787 ^a	22297±721b	22994±1224b	24543±761c	50,63	0,0001
Monócitos n°/μL	2655±273 ^a	2751±478a	3421±269b	3494±166b	14,71	0,0001
Neutrófilos n°/μL	2477±398 ^a	3163±394b	2990±499ab	2720±202ab	3,90	0,02
Basófilos n°/μL	310±168	401±153	297±19	310±9	1,002	0,41
Trombócitos n°/μL	4152±292ab	3667±264a	4338±381b	4143±291ab	4,57	0,01
Complemento	1,00±0,34	0,52±0,23	1,83±0,9	1,12±0,45	1,19	0,324
Burst respiratório (D.O)	0,57±0,1 ^a	0,46±0,03b	0,51±0,04ab	0,53±0,08ab	7	0,0005

Tabela 5. Índices morfológicos do fígado e baço de tilápias alimentadas com dieta suplementada com diferentes concentrações de arginina.

	2,3%MS Controle	2,9%MS arginina	3,5%MS arginina	4,1%MS arginina	F	P
Hepatosomático (%)	1,66±0,2 a	1,93±0,2 b	1,62±0,21 ab	1,57±0,41 a	6,67	0,0006
Esplenosomático (%)	0,22±0,11 ^a	0,31±0,12 ^b	0,27±0,07 ^{ab}	0,30±0,07 ^b	3,78	0,01

Figuras

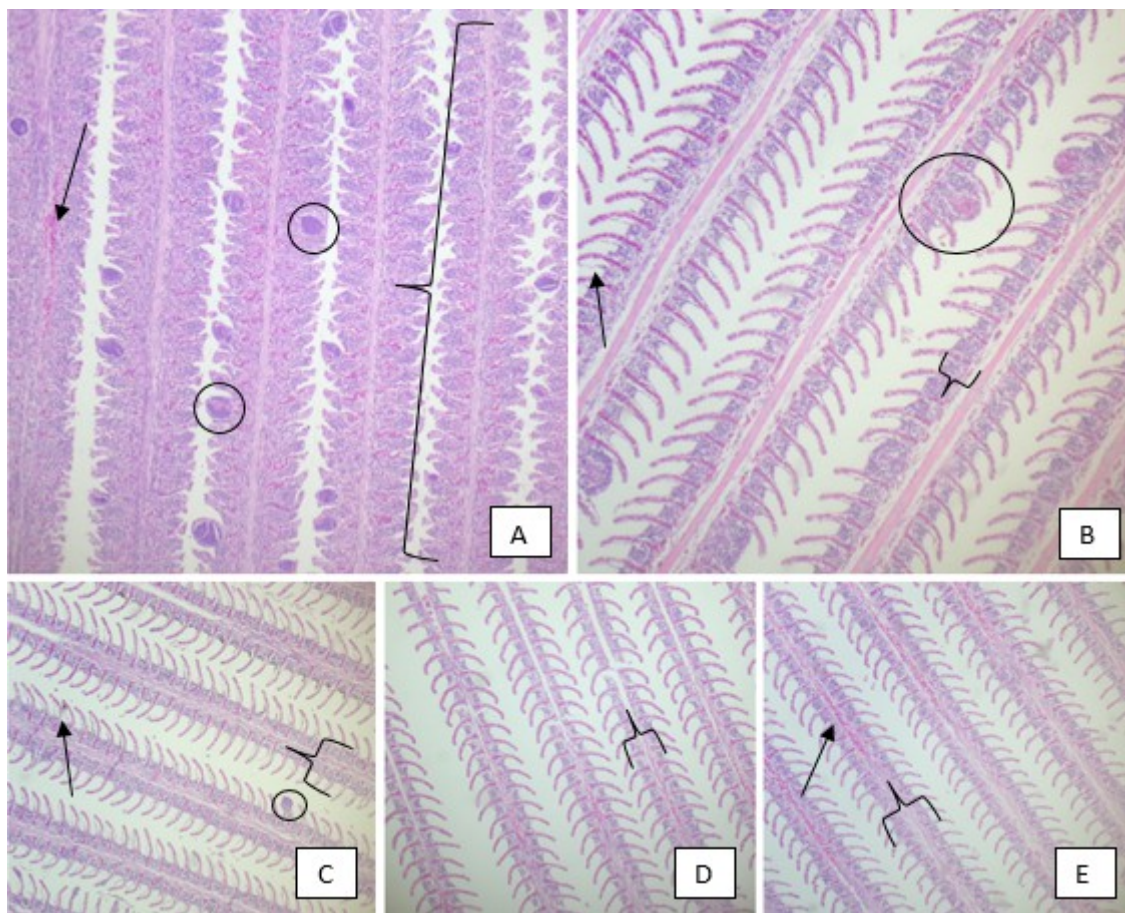


Figura 1. Fotomicrografia de brânquias de tilápias cultivadas em tanque rede. A: tratamento controle, 2,3% de arginina; brânquias apresentando congestão (seta), fusão lamelar (chave) e parasitas (circulo) 1000x- HE. B: 2,3% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave), destacamento epitelial (seta) e aneurisma (circulo) 1000x- HE. C: 2,9% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave), destacamento epitelial (seta) e parasita (circulo) 1000x- HE. D: 3,5% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave) 1000x- HE. E: 4,1% de arginina; brânquias apresentando hiperplasia moderada (chave) e congestão (seta) 1000x- HE.

Capítulo 3

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como pode ser observado através de revisão bibliográfica, a arginina é um aminoácido que melhora o desempenho dos peixes de criação em diversos aspectos, incluindo os sanitários, com a produção de óxido nítrico e outras substâncias. Também é possível identificar que os estudos buscando determinar a exigência desse aminoácido para os peixes vêm sendo realizado desde a década de 80. Entre os anos 90 e 2000 muitos trabalhos foram realizados objetivando entender melhor o efeito desse aminoácido no metabolismo dos peixes, sobretudo os peixes de clima temperado, como salmões e trutas. E nos últimos anos tem se intensificado a realização de ensaios buscando encontrar a exigência desse aminoácido para o maior número de espécies possíveis. Podendo-se afirmar que é uma área emergente para investigações científicas, principalmente no que se refere a imunonutrição, uma vez que há muitas vias ainda não bem conhecidas/estabelecidas.

Em relação a tilápia, este estudo é o quarto realizado com o objetivo de determinar a exigência desse aminoácido. Sendo o primeiro que utilizou uma dieta prática em condições reais de criação com peixes juvenis. Os demais trabalhos foram realizados com peixes menores.

Compilando os resultados obtidos nos trabalhos realizados com a tilápia, é possível identificar que a relação arginina:lisina não tem tanto efeito no desempenho dessa espécie. Em tanque-rede foi observado que a dieta suplementada com 3,5% de arginina apresentou o melhor resultado produtivo, sendo respaldado pelos dados de uréia. Os resultados obtidos nesse trabalho também indicam que há o deslocamento da exigência nutricional dos peixes cultivados em tanque-rede em relação aos mantidos em laboratório, apontando para a necessidade de desenvolver experimentos em laboratórios que simulem o que os peixes enfrentam em situação real de criação.

Os parâmetros bioquímicos e os hematológicos da série branca demonstraram que a suplementação da arginina na concentração de 3,5% da matéria seca promove melhora no sistema hemato-imunológico dos peixes associado ao aumento da eficiência na metabolização e disponibilidade dos nutrientes para as tilápias cultivadas em tanque rede.

Assim, a realização de mais estudos objetivando compreender o efeito da arginina no desempenho produtivo e sanitário da tilápia é um campo com grande potencial de pesquisa.