

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR DURANTE A RESTRIÇÃO
ALIMENTAR E REALIMENTAÇÃO EM JUVENIS DE
TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus*, LINHAGEM
CHITRALADA**

CAROLINE NEBO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular e Estrutural.

Orientadora: Maeli Dal Pai Silva

Botucatu – SP
2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
CRESCIMENTO MUSCULAR DURANTE A RESTRIÇÃO
ALIMENTAR E REALIMENTAÇÃO EM JUVENIS DE
TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus*, LINHAGEM
CHITRALADA**

CAROLINE NEBO

Orientadora: Profa. Dra. MAELI DAL PAI SILVA

Co-orientadora: Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular e Estrutural.

Maeli Dal Pai Silva

Botucatu – SP
2011

Nebo, Caroline.

Expressão de genes relacionados ao crescimento muscular durante a restrição alimentar e realimentação em juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, linhagem chitralada. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Maeli Dal Pai Silva

Capes: 50405004

1. Peixe - Criação. 2. Morfologia. 3. Tilápia (Peixe).

Palavras-chave: Crescimento compensatório; Fatores regulatórios miogênicos; Músculo esquelético; *Oreochromis niloticus*; Restrição alimentar.

À minha Família,
À minha mãe, Olga Nebo que nos momentos de aflição me conforta
Ao meu pai (*in memoriam*) que sempre me faz buscar o caminho da sabedoria
Aos meus irmãos: Meire, Edna, Duda e Lia tão especiais e admirados e mesmo distantes torcem por
mim em todos os momentos de minha vida
Aos meus cunhados: Shio, Shiro e Rô que admiro
Meus Sobrinhos, que são meu orgulho, amor e alegria de voltar para casa: Heidi, Lili, Bibi, Dani,
Douglas, Júnior e Augusto
Dedico

Após anos de estudos e aprendizagem, hoje e sempre serei grata pelos esforços realizados por todos
vocês e nos quais pude me espelhar e fazer minha pequena parte perante todos os estímulos e apoio
que sempre me foram dados.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, ao Departamento de Morfologia e ao Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético (LBME), pela oportunidade de realização do trabalho.

À minha orientadora profa. Maeli Dal Pai Silva, pelos ensinamentos e sua intensa dedicação ao nosso projeto, principalmente durante o longo período de coleta em Jaboticabal.

À profa. Dra. Maria Célia Portella, pela co-orientação, ensinamentos e colaboração.

Ao prof. Dr. Dalton José Carneiro, pelo fornecimento de suas instalações para a execução deste trabalho.

À minha querida profa. Valquíria Cação da Cruz que me orientou durante o estágio da graduação.

Aos meus colegas de pós-graduação do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (Fernanda Carani, Fernanda Losi, Juliana Giusti, Ivan Vechetti, Raquel Bertaglia, Paula Souza, Ludmila Canuto, Rodrigo Souza, Andreo Aguiar e Edson Mareco), aos alunos de iniciação, em especial o Bruninho e Warlen, por serem minha companhia nos finais de semana no laboratório. Ao Robson, pelas caronas para o laboratório. A todos, obrigada por terem me proporcionado muita alegria, risadas e festas em Botucatu.

A minha "mãe científica", Fernanda Carani que sempre esteve disposta a me ajudar em todos os momentos desta longa jornada.

Aos pós-doutorandos, Fernanda Alves e Vander Santos pelas valiosas considerações na qualificação.

Ao técnico do LBME, Ricardo Teixeira por ter me auxiliado durante as análises histológicas.

Aos meus amigos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, Natália Leitão, Thiago Mendes, Olívia Menossi, Juliana Kojima, Hellen Buzollo, Gisele Favero, Gustavo Squassoni, Ellen Nordi e a técnica Silvia Ligeiro que me ajudaram durante os vários experimentos em Jaboticabal. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Em especial, à Natália e Amanda Leitão que fizeram de suas casas, o meu lar de Jabuka. Obrigada pelo carinho, compreensão e amizade.

À minha amiga Fabrízia (Moeda), Belinha (Fichinha) e Léo (Dá roça), por terem me acolhido quando cheguei em Botucatu.

Aos funcionários do CAUNESP que me ajudaram durante o experimento, sempre dedicados, dispostos e prestativos.

Ao departamento de patologia do CAUNESP, à Fabiana Pilarski, Róberon Sakabe e Claudinei da Cruz por terem me auxiliado com os peixes.

À minha colega e companheira de lar Clarianna Martins Baicere Silva ou "Clari coração" por me fazer rir em vários momentos. Obrigada pela amizade e sinceridade, às vezes exagerada.

À minha amiga mineira Raquel (Geninha Marmota) que foi uma grande companheira de Botucatu.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

Ao prof. Carlos Padovani, pelo auxílio na realização das análises estatísticas;

A todos que fizeram parte desta etapa da minha vida, e me trouxeram muita alegria, obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Tilápia do Nilo	13
1.2 Músculo estriado esquelético.....	14
1.3 Miogênese.....	16
1.4 Crescimento do músculo esquelético	17
1.5 Fatores de crescimento.....	18
1.6 Fatores externos que afetam o crescimento muscular	22
1.7 Respostas compensatórias em peixes.....	24
2. OBJETIVOS	26
3.1 Instalações e condições experimentais.....	27
3.2 Manejo alimentar	28
3.3 Avaliação do crescimento e da taxa de sobrevivência dos peixes.....	29
3.4 Preparação das amostras para análise morfológica.....	30
3.5 Análise da expressão gênica da MyoD, Miogenina e da Miostatina	31
3.5.1 Extração do RNA total.....	31
3.5.2 Tratamento do RNA com DNase	32
3.5.3 Transcrição reversa.....	32
3.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).....	33
3.5.5 Construção das curvas padrão e cálculo da eficiência de amplificação	34
3.6 Análise Estatística	35
Referências Bibliográficas	35
CAPÍTULO 1 - MORPHOLOGY AND EXPRESSION OF GROWTH-RELATED GENES IN SKELETAL MUSCLE IN JUVENILE NILE TILAPIA, <i>Oreochromis niloticus</i>, STRAIN CHITRALADA DURING FASTING AND REFEEDING	44
Abstract.....	45
1. Introduction	47
2. Material and Methods.....	49
2.1 Fish rearing conditions and experimental design.....	49
2.2 Morphological and morphometric analysis	50
2.3 MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression	50

2.3.1 RNA isolation and cDNA synthesis.....	50
2.3.2 Quantitative real-time polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).....	51
2.4. Statistical Analysis	53
3. Results	53
3.1 Starvation and refeeding experiment	53
3.2 Morphological and morphometric analysis	54
3.3 MyoD, Myogenin and myostatin mRNA expression	58
4. Discussion.....	61
4.1 Compensatory growth, muscle morphology and morphometry	61
4.2 MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression	64
5. Conclusion.....	66
References	66
CAPÍTULO 2 - CRESCIMENTO COMPENSATÓRIO EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>), APÓS RESTRIÇÃO ALIMENTAR E REALIMENTAÇÃO	76
Resumo	77
1. Introdução.....	78
2.1 Instalações e condições experimentais.....	80
2.2 Manejo nutricional e avaliação do crescimento.....	80
2.3 Análise estatística	82
3. Resultados e Discussão.....	82
3.1 Desempenho e sobrevivência dos juvenis	82
3.2 Análise morfológica das fibras musculares.....	88
4. Conclusão	90
Referências Bibliográficas	91

RESUMO

O crescimento muscular em peixes é controlado por vias moleculares que podem ser afetadas pela restrição alimentar e realimentação. Neste estudo, foi analisado se curtos períodos de jejum seguidos de realimentação podem influenciar o desempenho, a morfologia e a expressão de genes relacionados com o crescimento muscular, em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada. Juvenis com peso médio de $0,6 \pm 0,19$ g foram estocados em caixas de polietileno com sistema de fluxo contínuo de água e aeração constante. Os peixes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com três repetições: (AL), controle com alimentação contínua do início ao final do experimento; (J5), jejum por cinco dias e realimentação por 37 dias; (J10), jejum por dez dias e realimentação por 32 dias e (J20), jejum por 20 dias e realimentação por 22 dias; (JJ), jejum durante todo o período experimental. As análises foram realizadas no início do experimento (dia 0), aos 5, 10, 20, e 42 dias. Nestes períodos, foram realizadas biometrias, para a avaliação do desempenho e coleta das amostras musculares para a análise morfológica. A análise morfométrica (cálculo do diâmetro das fibras) e a expressão do mRNA da MyoD, miogenina e miostatina (por RT-qPCR) foi realizada nos grupos AL, J5 e J10, nos períodos 0, 5, 10, 20 e 42 dias. Os juvenis de tilápia submetidos a cinco, dez e 20 dias de jejum mostraram um ganho de peso compensatório, entretanto somente o grupo J5 apresentou crescimento compensatório total. Os grupos AL, J5 e J10 apresentaram maior comprimento dorso lateral do que nos grupos J20 e JJ, indicando um espessamento da massa muscular dorsal. A taxa de crescimento específico foi maior após 10 dias de realimentação, em todos os grupos jejum (J5, J10 e J20). Nos períodos analisados, os grupos AL, J5 e J10 mostraram características morfológicas normais na musculatura, sendo a branca predominante em todos os grupos estudados. A partir de 20 dias de restrição alimentar, os animais dos grupos J20 e JJ apresentaram alterações morfológicas na musculatura, representadas por fibras com formato irregular, fibras hipertróficas e atroficas, e fibras com aspecto hialino, com desorganização e perda de proteínas sarcoplasmáticas. No início do experimento, os grupos analisados apresentaram maior frequência de fibras com diâmetro ≤ 30 μm . Aos cinco e dez dias, fibras com diâmetro ≤ 20 μm foram mais frequentes em J5 e J10 que em AL. Na classe de frequência entre $>30 - \leq 50$ μm , AL foi maior do que J5 e J10. Aos dez dias, na classe $>40 - \leq 50$ μm , os grupos AL e J5 foram similares e maiores que J10. Aos 20 dias, a frequência de fibras ≤ 20 μm foi similar em AL e J5 e maior que J10; na classe $>20 - \leq 30$ μm , J10 foi maior que AL e J5. Na classe $>30 - \leq 40$ μm , AL, J5 e J10 foram similares e na classe $>40 - \leq 50$ μm ,

AL e J5 foram similares e maiores que J10; fibras com diâmetro >50 μm foram mais freqüentes no grupo AL. Ao final do experimento, somente a frequência das fibras com diâmetro ≤ 20 μm foi diferente entre os grupos, sendo maior em J5. Aos 5 dias, os níveis de MyoD foram maiores em AL que em J5 e J10. Aos 20 dias, a expressão foi maior nos grupos J5 e J10 comparado ao AL. Nos dias 0, 10 e 42, os níveis da MyoD foram semelhante em AL, J5 e J10. No grupo AL, os níveis de MyoD foram menores no dia 0 do que em 5 dias, que foi maior do que aos 42 dias. Nos dias 5, 10 e 20, o nível de mRNA para a MyoD foi semelhante e maior do que aos 42 dias. Em J5, os níveis de MyoD foram semelhantes nos dias 0 e 5, aumentaram aos 10 e 20 dias, tendo expressão similar; aos 42 dias, a expressão foi semelhante à observada nos dias 0 e 5. O grupo J10 apresentou expressão similar nos dias 0, 5 e 10 dias, aumentando aos 20 e aos 42 dias, a expressão de mRNA foi menor do que aquela observada em 20 dias, sendo semelhante aos demais períodos experimentais. No grupo AL, a maior expressão do mRNA da miogenina foi observada no dia 0, diminuiu aos 5 e 10 dias que foi semelhante aos 20 e 42 dias. Em J5 e J10 a expressão da miogenina foi similar. Os níveis de mRNA da miostatina foram maiores no grupo AL no dia 0, em comparação aos dias 10, 20 e 42, sendo semelhante nos dias 5, 10, 20 e 42. Em J5, a expressão foi maior no dia 0 e 5 dias, diminuindo aos 10, 20 e 42 dias quando os níveis foram semelhantes. Em J10, a expressão foi maior no dia 0 e 5 dias, diminuiu aos 20 e 42 dias; aos 10 dias, a expressão do gene foi semelhante à observada nos dias 0, 5, 20 e 42 dias. Este estudo mostrou que a restrição alimentar seguida de realimentação em juvenis de tilápia do Nilo é capaz de alterar o peso corporal, a expressão de genes relacionados com o crescimento muscular e a hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares. Cinco e 10 dias de restrição alimentar não afetam o desempenho, a morfologia e o crescimento muscular em juvenis de tilápia. Esses resultados demonstram a importância da compreensão dos efeitos de estratégias alternativas de alimentação no crescimento muscular em peixes, para minimizar os custos de produção.

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*, restrição alimentar, crescimento compensatório, músculo esquelético, Fatores reguladores miogênicos, miostatina.

ABSTRACT

Muscle growth mechanisms are controlled by molecular pathways which can be affected by food restriction and refeeding. In this study, we analyze if short periods of starvation and refeeding can influence the expression of muscle growth-related genes and muscle growth characteristics, in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), strain chitralada. We used juvenile fish with average body weight of 0.6 ± 0.19 g randomly divided into three groups with three replicates: (AL) feeding continuously from beginning to end of the experiment; (J5) five days fasting and refeeding for 37 days and (J10) ten days fasting and refeeding for 32 days. The experiment lasted 42 days. After 5 and 10 days of food restriction, fish from J5 and J10 were fed to apparent satiation with a commercial diet. At the beginning of the experiment (day 0) and at 5, 10, 20 and 42 days, fish from all treatment (n= 14) were anesthetized and sacrificed. Muscle samples (n= 7 at each group) were collected, fixed in Karnovsky solution and transverse sections were stained by hematoxylin-eosin to evaluate muscle morphology and muscle fiber hypertrophy and hyperplasia. The muscle fibers were grouped into classes, ≤ 20 μm , $>20 - \leq 30$ μm , $>30 - \leq 40$ μm , $>40 - \leq 50$ μm and >50 μm . MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression was performed by RT-qPCR. At the end of the experiment, fasting for five and ten days resulted in small reduction on body weight compared with AL group. Following refeeding, fasted fish gained weight continuously; at 42 day, J5 showed an increase in body weight, which was similar to that observed in AL group. In J10, body weight increased after refeeding, but it was lower than that observed in AL group. HE stain showed white skeletal muscle making up most of the muscle mass in all groups studied; morphological characteristic were similar among the groups in all periods analyzed. At day 0, muscle fiber frequency distribution in all groups was similar. The majority of muscle fibers showed diameters ≤ 30 μm . In 5 days, the frequency of ≤ 20 μm fibers in J5 and J10 was significantly higher than in AL group; the frequency of $>30 - \leq 40$ μm and $>40 - \leq 50$ μm fibers in AL was higher than J5 and J10. In 10 days, the frequency of ≤ 20 μm fibers in J5 and J10 was higher than in AL group; the frequency of $>20 - \leq 30$ μm and $>30 - \leq 40$ μm fibers in AL was higher than J5 and J10. In the frequency of $>40 - \leq 50$ μm fibers, AL and J5 were similar, being higher than J10. In 20 days, the frequency of ≤ 20 μm fibers in AL and J5 was similar and higher than in J10 groups; the frequency of $>20 - \leq 30$ μm fibers in J10 was higher than AL and J5. In the frequency of $>30 - \leq 40$ μm fibers, AL, J5 and J10 were similar. In the frequency of $>40 - \leq 50$ μm fibers, AL and J5 were similar and higher than J10. The frequency of >50 μm fibers was higher in AL group. At the end of the

experimental period, only muscle fiber frequency of ≤ 20 μm diameter was different between groups; it was higher in J5. Gene expression was analyzed at day 0, and after 5, 10, 20 and 42 days. RT-qPCR results showed that in 5 day, the MyoD mRNA levels were higher in AL than that observed in J5 and J10 groups. In 20 days, MyoD expression was higher in J5 and J10 groups compared to the AL control group. In 0, 10 and 42 days, MyoD expression was similar in AL, J5 and J10 groups. In AL group, the MyoD mRNA levels were lower in the day 0 than in 5 day; which was higher than that observed in 42 day. In 5, 10 and 20 days, the MyoD mRNA expression was similar and higher than that in 42 day. In J5, the MyoD mRNA levels were similar in the day 0 and in 5 day, increasing in 10 and 20 days, which have showed a similar expression; in 42 day, MyoD mRNA expression was similar to those observed in the day 0 and in 5 day. J10 group presented similar MyoD mRNA expression in the day 0 and in 5 and 10 days; increasing in 20 days and in 42 day, MyoD mRNA expression was lower than those observed in 20 days, being similar to the other experimental periods. In AL group, the highest myogenin gene expression was observed in the day 0, and then declined through the 5 and 10 day, which was similar to those seen in the 20 and 42 days; J5 and J10 have shown a similar myogenin gene expression pattern; the highest myogenin gene expression was observed in the day 0 and then declined through the 5 day which was similar to those seen in the 10, 20 and 42 days. Myostatin mRNA levels were higher in AL group at day 0 in comparison to the 10, 20 and 42 days, although has been similar in 5, 10, 20 and 42 days. In J5, myostatin mRNA expression was higher in the day 0 and in 5 day, decreasing in 10, 20 and 42 days when the expression levels were similar. In J10, myostatin mRNA expression was higher in the day 0 and in 5 day, decreasing in 20 and 42 days; in 10 day myostatin gene expression was similar to those seen in the 0, 5, 20 and 42 days. In conclusion, in this study we showed that fasting followed by refeeding in juvenile Nile tilapia was able to change body weight, the expression of muscle growth-related genes and the muscle fiber hypertrophy and hyperplasia. Five and 10 days of fasting did not affect the compensatory weight gain and muscle growth. These results demonstrate the importance of understanding the effects of alternative feeding strategies on muscle growth to minimize production costs in aquaculture programs.

Key-words: *Oreochromis niloticus*, starvation, compensatory growth, muscle growth, Myogenic Regulatory Factor, Myostatin

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tilápia do Nilo

Tilápia é o nome comum aplicado a três gêneros de peixes africanos da família dos Ciclídeos: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, e *Tilapia*. Dentre as mais de 70 espécies de tilápias, as mais importantes para a aquicultura pertencem ao gênero *Oreochromis*, incluindo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia Moçambique (*Oreochromis mossambicus*), a tilápia azul (*Oreochromis aureus*) e a tilápia Zanzibar (*Oreochromis uroleps hornorum*). São originárias da bacia do rio Nilo, nativas da África, Israel e Jordânia e espalharam-se pelo mundo, sendo atualmente catalogados mais de 100 países produtores e a *Oreochromis niloticus* corresponde a cerca de 80% de toda a produção mundial da espécie, devido a sua adaptabilidade a variados sistemas de produção e condições ambientais, facilidade de reprodução e alta prolificidade e rápido crescimento (POPMA e MASSER, 1999; WATANABE et al., 2002).

No Brasil, a criação de tilápias teve como marco inicial a introdução de um plantel de *Tilapia rendalli*, na década de 1950, seguida de uma nova linhagem de tilápia nilótica em 1972. Nas últimas décadas, a tilapicultura vem se intensificando de forma significativa sendo a segunda espécie de maior produção aquícola, perdendo somente para a carpa comum (*Cyprinus carpio*). Apresentam inúmeras qualidades zootécnicas, como rusticidade, crescimento rápido, grande adaptação e conversão alimentar e ganho de peso, além de apresentar uma carne branca, de excelente paladar e textura, com ausência de espinhos na musculatura lateral, facilitando assim a técnica de filetagem e sua industrialização (ZANONI; FILHO; LEONHARDT, 2000; BOSCOLO et al., 2001;).

Possuem grande habilidade em filtrar as partículas do plâncton, e quando cultivadas em viveiros de águas verdes, geralmente superam em crescimento e conversão alimentar as outras linhagens. É uma espécie versátil para a piscicultura, pois se adapta tanto em cultivos extensivos, sem tecnologia empregada, quanto em sistemas de criação em tanques-rede, com alta tecnologia de produção (KUBITZA, 2000). Em 2007, o Brasil produziu cerca de 95.691 toneladas de tilápia, representando 45% da produção da aqüicultura continental (SCORVO et al., 2010).

Com o objetivo de intensificar a tilapicultura no mundo, várias linhagens de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) têm surgido, dentre elas a tilápia tailandesa que foi desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio Real de Chitralada na Tailândia. Esta linhagem

foi introduzida no Brasil em 1996, a partir de alevinos doados pelo *Asian Institute of Technology* (AIT) (ZIMMERMANN, 2000). O desempenho das linhagens melhoradas, como a tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*) apresentou maior ganho de peso, sobrevivência e melhor conversão alimentar quando comparada com as demais linhagens existentes na época (BOSCOLO et al., 2001; LEONHARDT et al., 2006).

1.2 Músculo estriado esquelético

O músculo esquelético é importante para a formação corporal tanto nos humanos como nos animais, sendo formado por fibras musculares e matriz extracelular. As fibras são alongadas com formato cilíndrico, estriações transversais, multinucleadas com núcleos localizados na região periférica da fibra, abaixo da membrana plasmática (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A matriz extracelular é formada por tecido conjuntivo, vasos e nervos que formam uma rede estrutural organizada, responsável pela transmissão da força de contração do músculo. No músculo, a matriz extracelular recebe diferentes denominações: endomísio, perimísio e epimísio. O endomísio reveste cada fibra muscular, o perimísio os feixes das fibras e o epimísio o músculo inteiro.

O músculo estriado esquelético nos peixes pode representar cerca de 45 a 75% do peso corporal e essa massa muscular não representa somente um mecanismo específico de adaptação no meio aquático, mas também uma fonte protéica na alimentação humana. Na maioria das espécies, a musculatura está organizada em miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal e são separados por bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos (ALEXANDER, 1969). Na região onde se encontra o nervo da linha lateral, um septo de tecido conjuntivo, o septo transversal, separa a massa muscular em regiões epiaxial dorsal e hipoaxial ventral (Figura 1D).

Nos peixes, os tipos de fibras musculares estão distribuídos em regiões ou compartimentos distintos: superficial, intermediário e profundo, diferentemente da apresentação em mosaico característico da musculatura dos mamíferos.

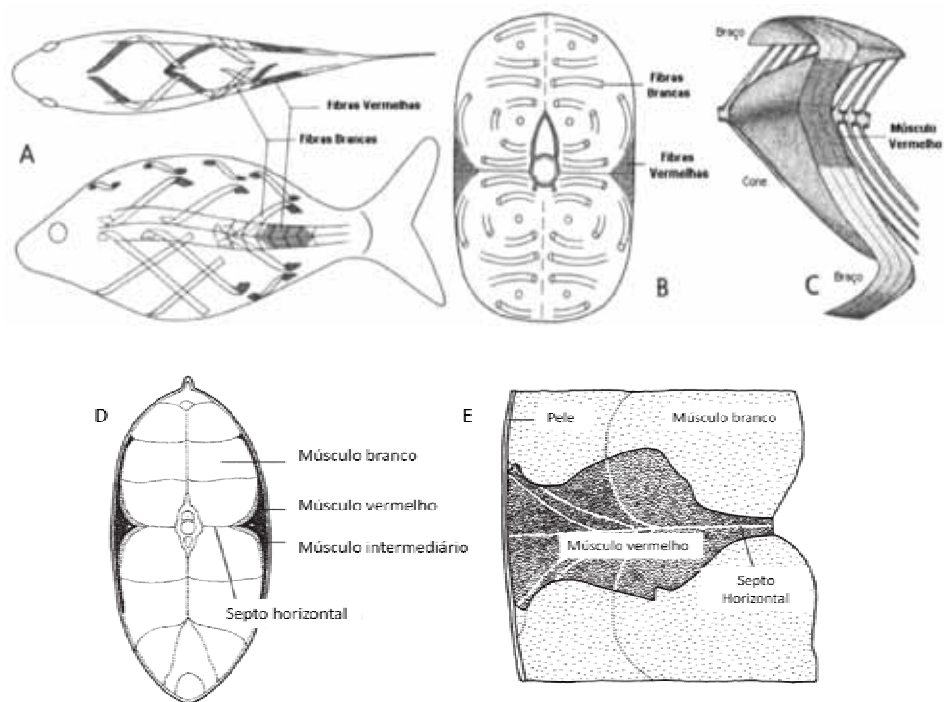


FIGURA 1. Diagrama esquemático do arranjo das fibras musculares dos teleósteos: (A) Vista lateral e dorsal, (B) secção transversal, (C) vista lateral dos miótomos do meio do corpo do salmão-rei (*Oncorhynchus tshawytscha*). (D) Distribuição das fibras nos compartimentos de músculo branco, intermediário e vermelho. Nervo da linha lateral ou septo horizontal, separando as regiões epiaxial e hipoaxial. (E) Distribuição do músculo em compartimentos superficial, intermediário e profundo. (Adaptado: Sängner e Stoiber, 2001).

O compartimento vermelho superficial, localizado abaixo da pele são relativamente menores (25 a 45 μ m), com muitas mitocôndrias, mioglobina e lipídios. Possuem metabolismo oxidativo e cadeia pesada de miosina (MHC) *slow*, contraindo as fibras lentamente. As fibras vermelhas superficiais correspondem a 30% da musculatura total dos peixes e são responsáveis pelos movimentos lentos e de sustentação como a migração, são numerosas na região do septo horizontal e aumentam em direção à nadadeira caudal (CLOSE, 1972; BAHLER et al., 1968; FAUCONNEAU et al., 1995).

No compartimento profundo ou branco, concentra-se a maior quantidade da massa muscular, representando cerca de 60 a 70% do total da massa muscular e é formado por fibras de maior com diâmetro (50 a 100 μ m), pouca mioglobina, mitocôndrias e lipídios. Possuem metabolismo glicolítico e cadeia pesada de miosina (MHC) *fast* para a contração rápida,

sendo utilizadas em movimentos rápidos de locomoção, como na fuga de predadores e captura de alimentos (JOHNSTON, 1999).

As fibras do compartimento intermediário representam menos de 10% da massa corporal e está localizada entre o compartimento superficial e profundo, apresentando características intermediárias entre as fibras brancas e vermelhas. Possuem força de contração rápida das fibras e metabolismo glicolítico/oxidativo, podendo ser recrutadas para atividades de sustentação e movimentos rápidos (DRIEDZIC e HOCHACHKA, 1976; JOHNSTON, 1999; SÄNGER e STOIBER, 2001).

1.3 Miogênese

Nos peixes, a embriogênese ocorre em fases ou etapas. Na primeira fase ocorre a formação do miótomo originado do mesoderma paraxial do embrião. Nos teleósteos, esta fase é tradicionalmente subdividida em duas partes: inicialmente, antes da formação do somito, células adaxiais formam uma única camada ao redor da notocorda e migram para a região lateral, dando origem aos miotubos que se diferenciam e formam a musculatura superficial vermelha; subsequentemente, outra população de células adaxiais ou células pioneiras, que não migraram para a superfície alongam-se em direção à superfície do miótomo formando uma região medial, o septo horizontal, que divide o miótomo nas regiões ventral (hipoaxial) e dorsal (epiaxial). As demais células do miótomo fundem-se para formar miotubos, dando origem ao compartimento profundo com fibras brancas no embrião. Cada somito é formado por uma porção ventral ou esclerótomo, que dará origem ao esqueleto e a cartilagem do embrião. A região dorsal ou dermomiótomo formará a derme e as musculaturas do tronco e da cauda.

Na segunda fase da miogênese ocorre o recrutamento e adição de novas células musculares, através da zona de proliferação de mioblastos na superfície do miótomo, aumentando o músculo em espessura, processo denominado de crescimento estratificado. A terceira e última fase envolve o recrutamento e formação de fibras musculares entre as fibras já existentes em posições dispersas no miótomo, dando assim uma aparência de mosaico à musculatura quanto ao tamanho das fibras musculares. Esta etapa de crescimento ocorre nas fases juvenis e adultas dos peixes (CURRIE e INGHAN, 2001; JOHNSTON e HALL, 2004; OCHI e WESTERFIELD, 2007; STEINBACHER et al., 2007).

1.4 Crescimento do músculo esquelético

O crescimento pós-embriônico do músculo estriado em peixes inicia antes da absorção do saco vitelínico e continua durante grande parte da vida dos animais. Esse crescimento depende da proliferação e da diferenciação de uma população de mioblastos adultos ou células satélites, que ficam quiescentes no músculo esquelético. O núcleo é condensado com pouco citoplasma e estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular (Figura 2). Possuem a capacidade de proliferar e diferenciar, servindo como fonte de novos mionúcleos ou novos miotubos que irão se unir às miofibrilas já existentes (KADI, 2008 apud STOTZER, 2009, p.14). Esse processo ocorre durante o crescimento pós-natal, aumentando assim do diâmetro e área das fibras, processo denominado hipertrofia e ou podem se agregar às fibras musculares pré-existentes, para formar novos miotubos e nova fibra muscular, processo conhecido como hiperplasia (VEGGETTI et al., 1990; ALFEI et al., 1994, JOHNSTON, 1999; REHFELDT et al., 2004).

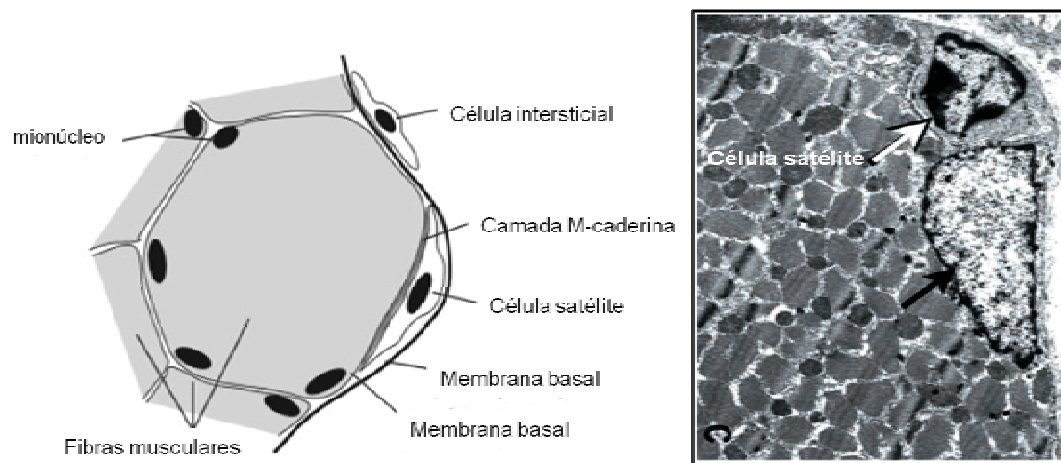


FIGURA 2. Esquema da localização das células satélites no músculo esquelético. (A) Músculo multinucleado com célula satélite entre a lâmina basal e membrana plasmática da fibra. (B) Fotomicrografia das células satélites em microscopia eletrônica de transmissão, notar o núcleo condensado com pouco citoplasma. (Adaptado: Legerlotz e Smith, 2008)

A hiperplasia nos peixes pode ocorrer de duas formas: estratificada e em mosaico. A hiperplasia estratificada ocorre em todas as espécies de peixes a partir de zonas de proliferação de mioblastos, localizadas nas regiões dorsal e ventral do miótomo e entre os compartimentos vermelho e branco. É a responsável pelo espessamento das camadas

musculares nas fases iniciais do desenvolvimento. Já a hiperplasia em mosaico resulta em um grande aumento no número de fibras musculares, principalmente na fase juvenil e adulta (Figura 3). Quando a hiperplasia em mosaico ocorre, observam-se fibras pequenas entre as fibras maiores, formando um mosaico de fibras de diferentes diâmetros (JOHNSTON, 1999, ROWLERSON e VEGGETTI, 2001).

Nas espécies que atingem tamanho de poucos centímetros, o crescimento muscular envolve principalmente a hipertrofia de fibras formadas nas fases iniciais da embriogênese e o período de crescimento hiperplásico é mais curto. Nas espécies que atingem maior tamanho corporal, novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento. Em todas as espécies, o crescimento hipertrófico das fibras musculares ocorre em todos os estágios de desenvolvimento do animal, porém é predominante durante as fases de juvenil e adulto (VEGGETTI et al. 1993; PATRUNO et al., 1998). A hiperplasia diminui com o avançar da idade dos peixes e sua contribuição nunca excede 50% do crescimento muscular (ALFEI et al., 1994; MOMMSEN, 2001).

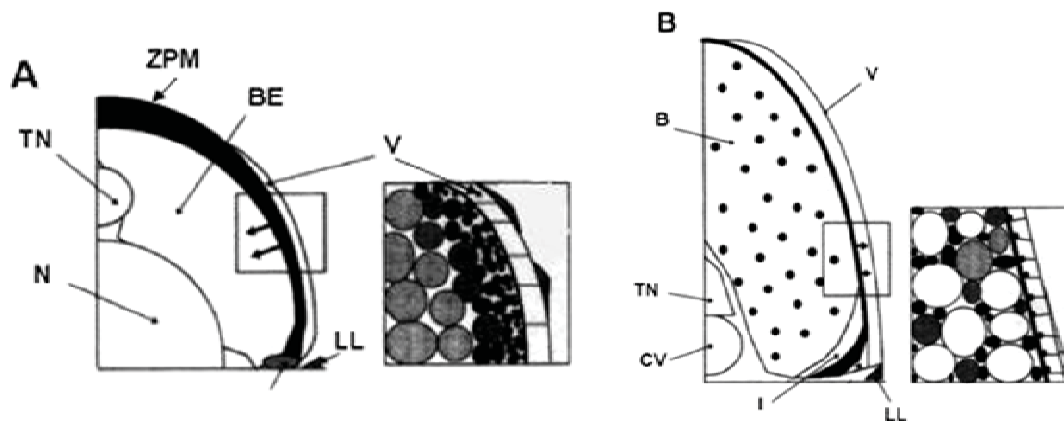


FIGURA 3. Esquema representativo dos tipos de crescimento muscular em peixes. A) Hiperplasia estratificada e (B) hiperplasia em mosaico. Abreviações: TN = tubo neural, N = notocorda, BE = fibras musculares brancas embrionárias, ZPM = zona de proliferação de mioblastos, V = fibras musculares vermelhas, LL = linha lateral, CV = coluna vertebral, B = fibras brancas, I = fibras intermediárias (Adaptado: Rowleron e Veggetti, 2001).

1.5 Fatores de crescimento

O crescimento muscular ou a miogênese pós-natal envolve a proliferação e a diferenciação das células satélites. Esse processo é regulado por várias proteínas, como a miostatina e os fatores transcricionais, pertencentes à família MyoD, conhecidos como

Fatores de Regulação Miogênica (MRFs). Destes fazem parte a MyoD, Myf5, Miogenina e Mrf4. Os MRFs contêm um domínio conservado conhecido como "basic helix-loop-helix" (bHLH) que se liga à sequências de DNA conhecidas como Ebox (5'-CANNTG-3') na região promotora de vários genes músculo específicos.

A região "helix-loop-helix" dos MRFs constitui o domínio de ligação com proteínas E, como E12 e E47. A ligação do MRF-proteína E forma um heterodímero que se liga à sequência Ebox do DNA, ativando a transcrição dos genes músculo específicos e levando a sua expressão. Esses fatores de transcrição desempenham um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e crescimento do músculo esquelético (RESCAN et al., 2001; JOHANSEN e OVERTURF, 2005; JOHNSTON et al., 2008; CAMPOS et al., 2010) (Figura 4).

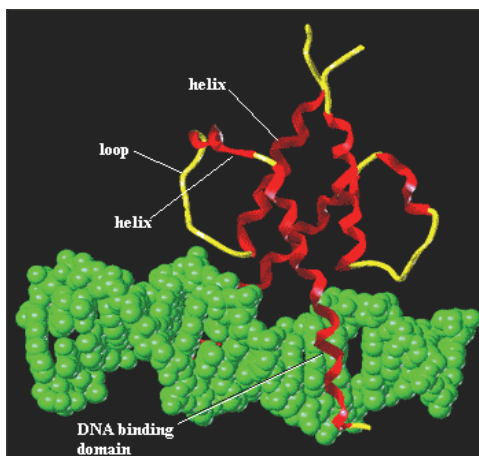


FIGURA 4. Estrutura do dímero basic helix-loop-helix (bHLH) se ligando a sequência de DNA.

A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a diferenciação, enquanto que a Miogenina e o MRF4 são expressos em células fase de fusão e diferenciação (REHFELDT et al., 2004; JOHNSTON, 2006; SCHIERHOLT et al., 2008) (Figura 5).

Nos teleósteos o gene da MyoD é conservado em cópias duplicadas em mais de uma espécie. Em salmonídeos três parálogos para o gene da MyoD foram caracterizados, como em truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) denominado TMyoD e TMyoD2. Outras espécies como nos Acantopterígios (*Sparus aurata*, *Hippoglossus hippoglossus* e *Tetraodon suvatii*) possuem dois parálogos para o gene da MyoD (JOHNSTON; MACQUEEN e WATABE, 2008).

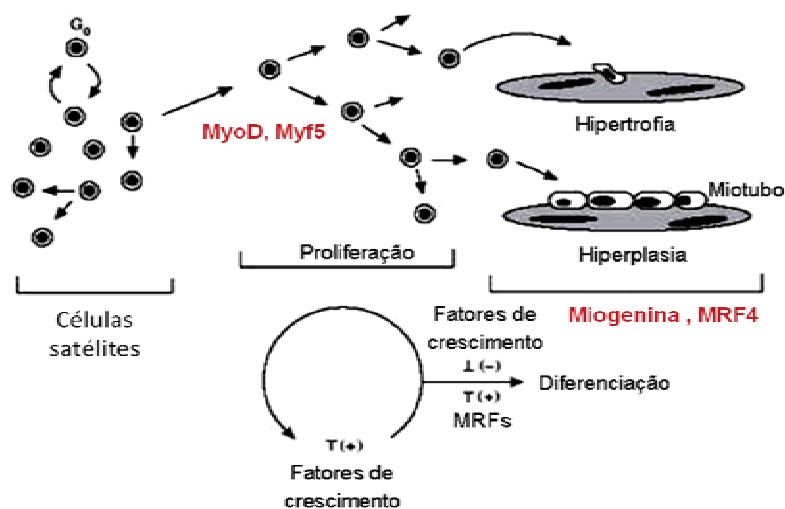


FIGURA 5. População de células satélites demonstrando os principais mecanismos de crescimento muscular nos peixes. As células satélites se proliferam através da ativação da MyoD e do Myf5 e com a expressão da miogenina e do MRF4, os mioblastos se diferenciam formando novos miotubos, contribuindo para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético. (Adaptado: Johnston, 1999)

Em juvenis de truta arco-íris submetidos a 30 dias de jejum seguidos por quatro e quatorze dias de realimentação, alterações no metabolismo induzidos pelo jejum e realimentação resultaram em mudanças na taxa de crescimento corporal e no músculo esquelético. Na musculatura de peixes, o glicogênio foi uma reserva de curto prazo e no jejum prolongado, estoques de lipídios e proteínas foram quebrados para o fornecimento de energia, resultando em uma diminuição do crescimento muscular. Na realimentação a síntese protéica foi acelerada em relação à degradação protéica para restaurar o crescimento muscular. A expressão gênica de MyoD, após 30 dias de jejum estava mais elevada que no início da restrição alimentar e mesmo após 14 dias de realimentação a expressão não se alterou, mostrando que não houve aumento da hiperplasia nas fibras musculares brancas. A expressão de miogenina caiu drasticamente no 30º dia de jejum, porém com o retorno da alimentação a expressão miogênica aumentou, indicando hipertrofia das fibras musculares (JOHANSEN e OVERTURF, 2006).

Em adultos de salmão do atlântico (*Salmo salar* L.), durante a privação alimentar de 32 dias os animais apresentaram perda de peso, porém com sete dias de realimentação, as condições normais foram restabelecidas e os animais voltaram a crescer, aumentando assim o peso corporal. Nos primeiros dias de realimentação (três a sete dias), as expressões de alguns

MRFs como a MyoD e Miogenina diminuíram depois tornaram-se constantes, mostrando que o período de restrição alimentar de 32 dias seguido de realimentação (BOWER et al., 2009).

A MyoD também regula positivamente a transcrição gênica da miostatina durante a maturação do miócito (BRADLEY; YAWORSKY; WALSH, 2008). A miostatina ou GDF-8 (Fator de crescimento e diferenciação-8) é outro fator regulatório do crescimento, é um membro da superfamília TGF- β (Fator de transformação de crescimento beta), proteína que controla a proliferação e a diferenciação, atuando negativamente na regulação do crescimento muscular, tanto pela atenuação da hipertrofia quanto da hiperplasia (McPHERRON e LEE, 1997) (Figura 6).

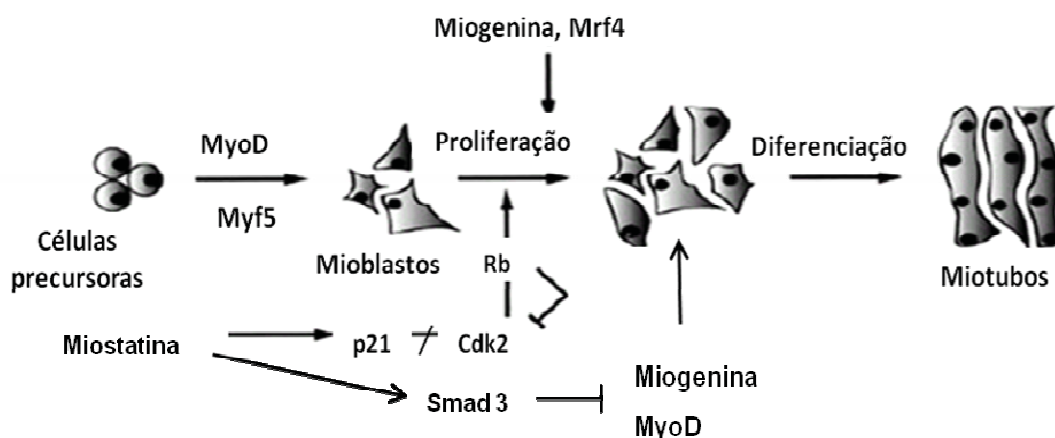


FIGURA 6. Função da miostatina durante o crescimento e diferenciação muscular. A proliferação dos mioblastos é regulada pela miostatina, através do aumento da expressão do p21 que inativa a atividade do Cdk2, resultando na interrupção do ciclo celular. A miostatina também regula a expressão da MyoD via Smad3, após a sinalização da diferenciação conduzindo a diminuição da expressão miogênica. (Adaptado: Langley et al., 2002)

A miostatina é conservada como dois genes em muitos teleósteos, denominados de *mstn1* e *mstn2*. Naturalmente podem ocorrer mutações para o gene da miostatina, contribuindo para o fenótipo musculoso observado em bovinos, ovinos, cães e em humanos (LEE, 2007).

O gene da miostatina é encontrado em muitos animais, inclusive nos peixes. Nos mamíferos, a miostatina é expressa exclusivamente no músculo esquelético, durante as fases de desenvolvimento e adulto. Nos peixes, é encontrada no tecido muscular, olhos, brânquias, ovários, testículo, intestino e cérebro, desempenhando um papel importante na manutenção da

homeostase do crescimento do tecido, regulação da osmolaridade e na função dos tecidos reprodutivos (MACCATROZZO et al., 2001; RIOS et al., 2002; RODGERS et al., 2001; ACOSTA et al., 2005).

Em trabalhos realizados com tilápias (*Oreochromis mossambicus*) na fase larval e adulta submetidas à restrição alimentar de 28 dias e a realimentação de 28 dias. As tilápias adultas do grupo jejum apresentaram peso corporal inferior e significativo em relação ao grupo alimentado. A expressão do mRNA da miostatina demonstrou que nas tilápias adultas, após 28 dias de experimento o grupo jejum apresentou menor expressão em relação ao grupo alimentado, porém não apresentando diferença significativa. Nas larvas, a expressão da miostatina em três dias de jejum foi maior em relação ao grupo alimentado e em nove dias de jejum a expressão da miostatina foi inferior ao grupo controle alimentado, indicando que a em três dias de restrição a inibição da proliferação de mioblastos é maior que em nove dias de jejum (RODGERS et al., 2003).

Diferentemente de outros trabalhos com restrição alimentar em trutas arco-íris, o jejum durante 30 dias não foi capaz de modificar os níveis de expressão gênica da miostatina, porém na realimentação os níveis de expressão se elevaram, indicando que a baixa expressão da miogenina durante o jejum não foi inibida pela expressão da miostatina (JOHANSEN e OVERTURF, 2006).

1.6 Fatores externos que afetam o crescimento muscular

Mudanças na alimentação, oxigênio, salinidade, pH e temperatura da água alteram o número de fibras musculares recrutadas e a expressão miogênica, porém podem ocorrer diferenças entre as espécies e linhagens de peixes (Figura 7). A presença de parasitas pode alterar o sistema imunológico dos peixes, provocando injúria e diminuição do consumo de ração, desacelerando o crescimento muscular.

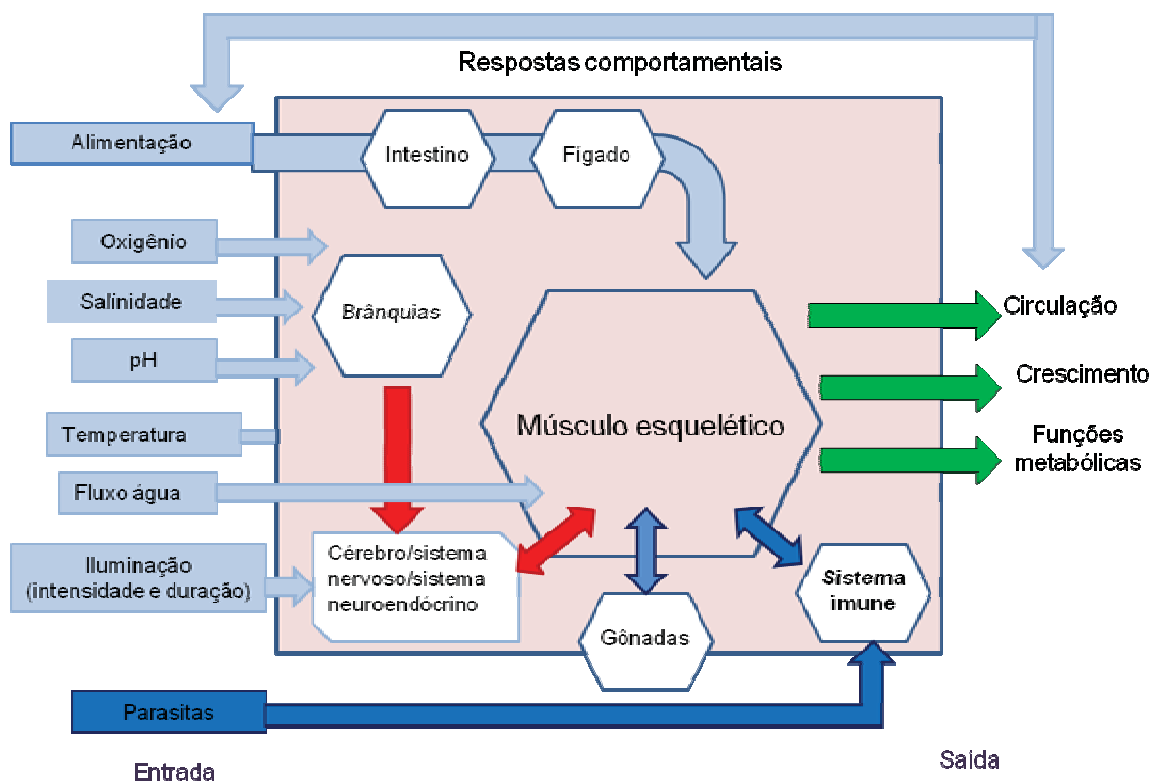


FIGURA 7. Esquema mostrando que alterações nas condições ambientais (oxigênio, salinidade, pH, temperatura, fluxo de água, iluminação) e no sistema fisiológico podem afetar diretamente o desenvolvimento do músculo esquelético em peixes. (Adaptado: Johnston et al., 2006)

Em zebrafish (*Danio rerio*) criados em diferentes temperaturas de incubação (22°, 26° e 31°C), apresentaram diferenças quanto ao desenvolvimento e número final de fibras musculares brancas. Em peixes pequenos com aproximadamente 7-8 mm de comprimento, mantidos em temperatura de 22°C, a hiperplasia estratificada foi o único mecanismo de expansão das fibras musculares. Entretanto, os animais que foram criados em temperaturas mais elevadas de 31°C, o desenvolvimento das fibras ocorreu por hiperplasia em mosaico, mostrando que a temperatura de incubação influencia no o desenvolvimento muscular, acelerando o crescimento das fibras (JOHNSTON et al., 2009). Em pacus criados com diferentes temperaturas de incubação (25°, 27° e 29° C), o crescimento dos peixes apresentou diferença entre as temperaturas testadas após 60 dias de pós-incubação. Os animais que foram criados na temperatura mais elevada (29°C) apresentaram maior comprimento total, maiores número de núcleos e fibras brancas em relação aos demais tratamentos de 25° e 27°C, evidenciando assim maior hiperplasia no músculo branco. Já o início da hipertrofia ocorreu em todos os tratamentos e entre o 25° e o 60° dia pós-incubação (ASSIS et al., 2004).

Em peixes de clima temperado, como o salmão do Atlântico, as temperaturas de incubação (2°, 5° e 8°C) influenciaram no desenvolvimento dos somitos. Os animais criados na temperatura mais elevada de 8°C desenvolveram os somitos mais rapidamente que os animais incubados nas temperaturas inferiores de 2° e 5°C. A expressão dos fatores regulatórios miogênicos também foi diferenciada durante o desenvolvimento das fibras (McQUEEN et al., 2007).

Em juvenis de trutas arco-íris, alimentados com diferentes fontes de aminoácidos na dieta durante doze semanas, apresentaram diferenças quanto à expressão de alguns genes músculos específicos. A expressão de MyoD no músculo branco do grupo que foi alimentado com dieta (farinha de peixe + farelo de soja + aminoácidos essenciais + ácido glutâmico) foi menor que o grupo que recebeu a dieta controle (farinha de peixe + mistura de proteínas vegetais + aminoácidos essenciais). Entretanto, a expressão de MyoD no músculo vermelho não apresentou diferença entre ambas as dietas. A expressão de miogenina tanto no músculo branco como vermelho não teve diferença, mostrando que as diferentes fontes de aminoácidos fornecidas na dieta podem interferir na expressão de genes músculo específicos (ALAMI-DURANTE et al., 2010).

Em alguns teleósteos, dietas ricas em lipídeos ou com baixos níveis de proteína também podem alterar a expressão dos MRFs. A composição das dietas, principalmente com alto nível de ácidos graxos, pode modificar o sistema endócrino e os níveis de expressão gênica. Em linguados (*Solea senegalensis Kaup*), alimentados com diferentes níveis de lipídios na dieta (4%, 12% e 20%) após o período experimental, foram observados que os animais que receberam maior nível de ácidos graxos nas dietas apresentaram menor expressão gênica dos MRFs como a MyoD, MRF4 e a Miogenina, com exceção da myf5, quando comparados aos animais que receberam menor porcentagem de lipídeo (CAMPOS et al., 2010).

1.7 Respostas compensatórias em peixes

Na natureza, períodos de jejum são comuns entre os peixes, especialmente quando há escassez de alimento durante algum período do ano. Entretanto, a taxa de sobrevivência durante esses períodos é uma habilidade bem desenvolvida em muitas espécies (DAVE et al., 1975). As respostas metabólicas durante a restrição alimentar variam significativamente entre os teleósteos (SHERIDAN e MOMMSEN, 1991) e alguns fatores como a idade,

estações do ano, condições ambientais e experimentais, temperatura da água e estado nutricional também podem influenciar o metabolismo aumentando ou diminuindo o efeito do jejum no ajuste biológico dos animais (LOVELL, 1989; BASTROP et al., 1991).

Os mecanismos que contribuem para o aumento da taxa de crescimento ainda não estão totalmente compreendidos, porém sabe-se que alguns fatores como a ingestão e qualidade do alimento, secreção hormonal, idade e expressão gênica dos animais são fundamentais no desenvolvimento dos tecidos corporais (SOUZA et al., 2002).

O jejum prolongado pode levar à diminuição na síntese de proteínas e um crescimento mais lento e o restabelecimento de condições favoráveis, após um período de restrição alimentar promove um crescimento compensatório, fase de crescimento acelerado onde as condições normais são restabelecidas, após uma fase de baixo crescimento. A taxa de crescimento compensatório varia com o estágio de desenvolvimento, o período de jejum e realimentação e a espécie considerada. Após um período de jejum, a realimentação promove uma reversão nos processos de mobilização de reservas corporais para suprir o catabolismo. Somente quando esta condição estiver satisfeita, o destino da dieta será o crescimento (DOBSON e HOLMES, 1984; KIM e LOVELL, 1995; MONTSERRAT et al., 2007; HAGEN, et al., 2009).

O crescimento compensatório pode ser dividido em diferentes categorias: crescimento compensatório parcial, completa ou sobre compensação (Figura 8). No caso da compensação parcial, animais da mesma idade submetidos à privação de alimento não conseguem alcançar o mesmo porte dos animais não submetidos à restrição alimentar, porém apresentam rápido crescimento e melhor conversão alimentar durante o período de realimentação. A compensação total ocorre quando os animais que sofreram restrição alimentar durante algum período, alcançam o peso dos animais que foram continuamente alimentados e a sobre compensação ocorre quando animais de mesma idade, submetidos à restrição alimentar, apresentam taxa de crescimento superior ao dos animais que não sofreram privação de alimento (ALI et al., 2003).

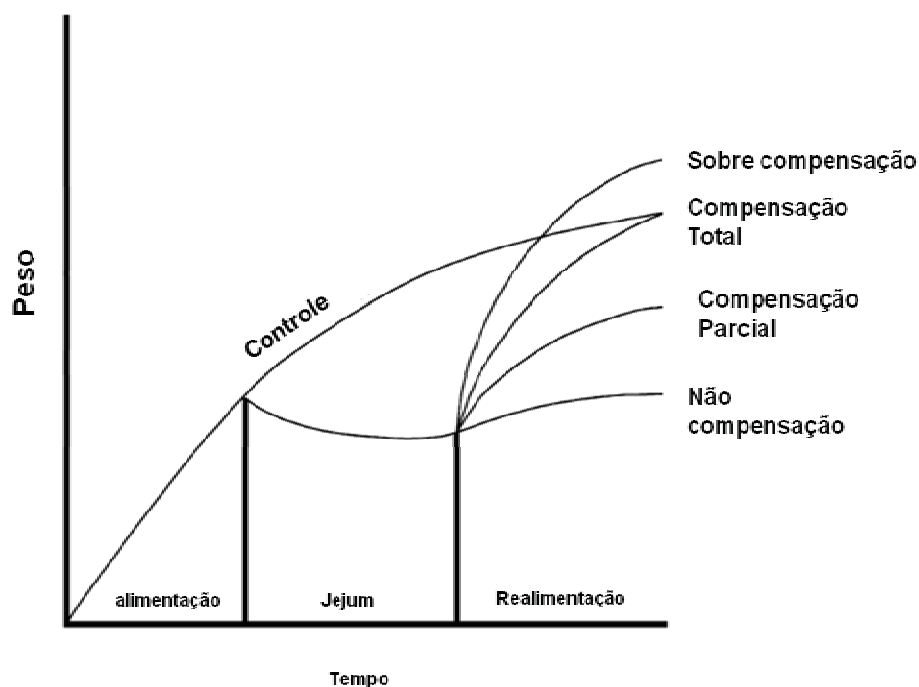


FIGURA 8. Esquema da curva de desempenho dos peixes após o período de restrição alimentar seguido de realimentação. (Adaptado: Ali et al., 2003)

Um dos principais mecanismos envolvidos no ganho compensatório observado em peixes é a elevação da taxa de ingestão de alimento durante a realimentação, fenômeno conhecido como hiperfagia. É observada nos primeiros dias de realimentação, considerada em muitas espécies de peixes como o responsável pelo crescimento compensatório (JOBBLING e JOHANSEN, 1999; GURNEY et al., 2003).

2. OBJETIVOS

1 – Analisar o desempenho e a morfologia do músculo estriado em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem tailandesa durante a restrição alimentar e realimentação;

2 – Verificar a expressão dos MRFs MyoD e Miogenina e da Miostatina, hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares durante curtos períodos de restrição alimentar e realimentação em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações e condições experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP. Foram utilizados 1.500 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem tailandesa provenientes da Piscicultura XV de novembro, São João da Boa Vista, SP. Os peixes com média de peso corporal de $0,6 \pm 0,19$ g e comprimento total $35,6 \pm 29,4$ mm foram estocados em 15 tanques de polietileno com 150 litros de água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo com aeração artificial constante. Os parâmetros físico-químicos da água como a temperatura foram aferidos diariamente, o pH e oxigênio dissolvido, mensurados semanalmente. Os tanques foram sifonados em dias alternados pra manter uma boa qualidade de água.

Os peixes foram divididos em cinco grupos experimentais e três repetições: (AL) alimentado até a saciedade aparente durante o período experimental; (J5) jejum de cinco dias e realimentação de 37 dias; (J10) jejum de dez dias e realimentação de 32 dias; (J20) jejum de 20 dias e realimentação 22 dias; (JJ) jejum durante o período experimental; (Figura 9).

Em cada período analisado, os exemplares foram anestesiados com benzocaína ($0,1\text{g.L}^{-1}$ água), pesados individualmente em balança digital e medidos com paquímetro digital. Foram aferidos o peso individual (g), comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e comprimento dorso lateral (mm). A biometria inicial dos peixes foi realizada com cerca de 10% do total de animais utilizados para a montagem do experimento e aos 5, 10, 20 e 42 dias biometrias em todos os tratamentos e suas repetições. Nas biometrias também foram realizadas coletas das amostras de tecidos musculares.

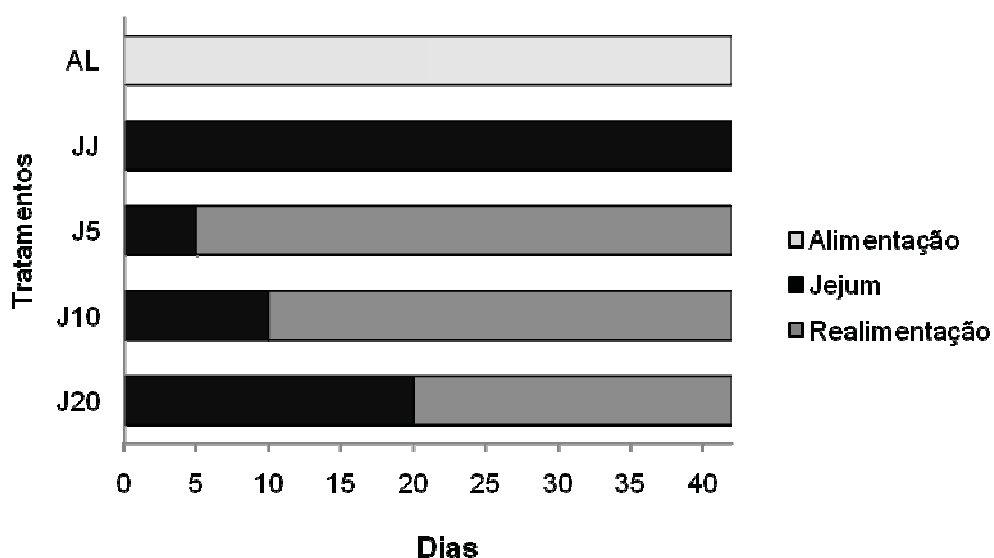


FIGURA 9. Representação dos tratamentos experimentais: (AL) alimentado até a saciedade aparente durante o período experimental; (J5) jejum de cinco dias e realimentação de 37 dias; (J10) jejum de dez dias e realimentação de 32 dias; (J20) jejum de 20 dias e realimentação 22 dias; (JJ) jejum durante o período experimental.

3.2 Manejo alimentar

O tratamento AL foi alimentado durante todo o período experimental com ração comercial farelada com 55% proteína bruta até o 30º dia e ração extrusada do 31º ao 42º dia. O grupo J5, J10 e J20 sofreram restrição alimentar até o 5º, 10º e 20º dia com posterior realimentação com ração comercial com 55% PB até o 30º dia e ração extrusada do 31º ao 42º dia e o grupo jejum sofreu restrição alimentar desde o início ao término do experimento (Figura 10). Os peixes foram alimentados três vezes ao dia às 9:00, 14:00 e 17:00hs até a saciedade aparente.

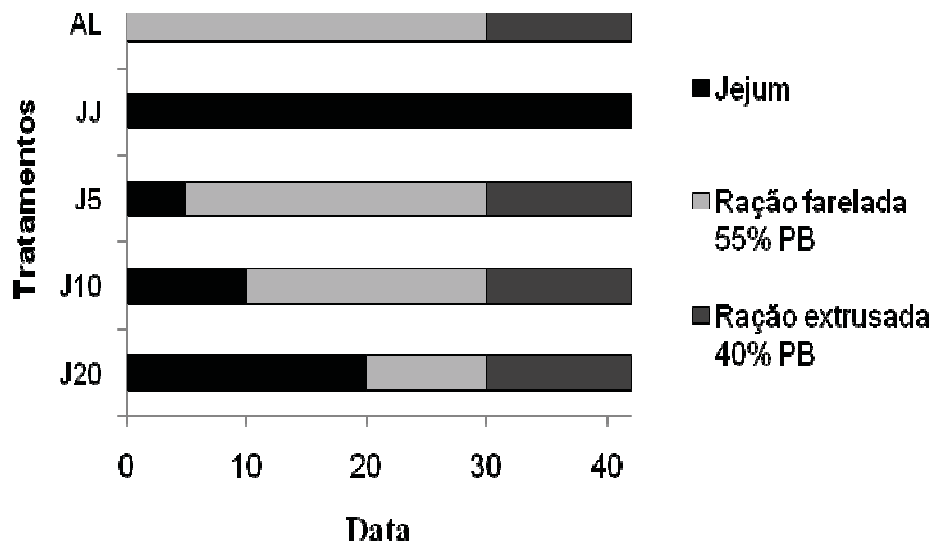


FIGURA 10. Representação dos tratamentos e o tipo de dieta fornecida aos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.3 Avaliação do crescimento e da taxa de sobrevivência dos peixes

Para a avaliação do desempenho dos peixes, o acompanhamento do crescimento foi realizado aos 5, 10, 20 e 42 dias até o final do experimento, coletando-se cerca de 14 peixes por tratamento. Utilizando-se um paquímetro e balança digital, foram aferidos o peso individual (g), comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e comprimento dorso lateral (mm) de todos os tratamentos nos diferentes períodos de restrição alimentar e realimentação. Com os resultados de peso inicial, intermediários e final de todos os tratamentos, calculou-se a taxa de crescimento específico (TCE) dos indivíduos (Kestmont e Stalmans, 1992), calculado pela seguinte fórmula:

$$TCE = \frac{(\ln Pf - \ln Ci)}{\Delta t} \times 100$$

Onde:

LnPf = logaritmo do comprimento final

LnCi = logaritmo do comprimento inicial

Δt = duração em dias entre as biometrias

Ao final do experimento, foi determinada a taxa de sobrevivência de todos os grupos experimentais que foi transformada em $y = \arcsin \sqrt{x/100}$, onde x indica o valor da porcentagem da sobrevivência de cada grupo experimental.

$$TS\% = \frac{Nf}{Ni - Nc} \times 100$$

Onde:

TS = taxa de sobrevivência

Nf = número de juvenis no final do experimento

Ni = número de juvenis do início do experimento

Nc = número de juvenis coletados para biometrias

Os resultados de peso, comprimento total, comprimento padrão, comprimento dorso lateral, taxa de sobrevivência e taxa de crescimento específico foram analisados através da análise de variância não paramétrica para o modelo com dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de Dunn, considerando um nível de 5% de probabilidade (ZAR, 2009).

3.4 Preparação das amostras para análise morfológica

Em cada fase de restrição e ao final o experimento foram coletadas amostras de tecido muscular. Para as análises morfológicas, amostras de tecido muscular foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 8% e glutaraldeído 2,5% em PBS). Após 24 horas, o material foi lavado em PBS, desidratado em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100%) e finalmente submetidas à pré-infiltração com solução de glicol-metacrilato e ativador (embedding kit – Leica) e etanol 95% (1:1, v/v), durante 4 horas. Para a inclusão final, os materiais foram incluídos em resina (glicol-metacrilato e endurecedor) e assim, permaneceram em estufa 37°C durante 24 horas. Foram então obtidos cortes histológicos com espessura de 4µm e assim corados com Hematoxilina-eosina para a avaliação do padrão morfológico das fibras musculares.

Utilizando um sistema de análise de imagens (Leica Qwin, Germany), foram calculados o menor diâmetro de 200 fibras musculares brancas por animal, para avaliar o grau

de hipertrofia e/ou hiperplasia no crescimento muscular na tilápia tailandesa submetida à restrição alimentar e realimentação. Posteriormente, as fibras musculares foram distribuídas em classes, na dependência do seu diâmetro ($\leq 20 \mu\text{m}$, $>20 - \leq 30 \mu\text{m}$, $>30 - \leq 40 \mu\text{m}$, $> 40 - \leq 50 \mu\text{m}$ and $> 50 \mu\text{m}$), baseando-se na metodologia utilizada por Valente et al. (1999). Para análise estatística da frequência das fibras musculares foi realizada pelo teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações, considerando um nível de 5% de significância.

3.5 Análise da expressão gênica da MyoD, Miogenina e da Miostatina

Para análise da expressão gênica, fragmentos musculares dos peixes de cada grupo foram retirados e congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C . A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs, MyoD, Miogenina e da Miostatina na musculatura esquelética da tilápia foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR). Para isso, foi realizada a extração do RNA total das amostras musculares e esse RNA foi submetido à reação de Transcrição reversa. Foi utilizada a seguinte metodologia:

3.5.1 Extração do RNA total

Os fragmentos musculares congelados foram homogeneizados com o homogeneizador de tecidos (IKA Ultra Turrax/T-25) em 1ml de TRIzol/100mg tecido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12000 giros por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Em seguida, 0,2 mL de clorofórmio foram acrescentados e a solução foi incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a $12000 \times g$ por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa formada foi separada. O RNA foi precipitado com 0,5 mL de álcool isopropílico por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 12000 giros por 10 minutos a 4°C . O pellet de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a $7500 \times g$ por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante removido cuidadosamente. O pellet de RNA foi seco em temperatura ambiente e dissolvido em água ultrapura.

A quantificação do RNA extraído do tecido muscular dos peixes foi realizada por espectrofotometria a 260 nm no equipamento NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e assim, determinada a razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm o que forneceu uma estimativa da qualidade da extração (razão ≥ 1.8). A integridade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 1 μg de RNA em gel de agarose 1.5% corado com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA).

3.5.2 Tratamento do RNA com DNase

O RNA extraído foi tratado com Kit DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para degradação de DNAs contaminantes nas amostras. Para cada 2 μg de RNA diluídos em 15 μL de água ultrapura, foram utilizados 2 μL de 10X DNase I Reaction Buffer, 2 μL de DNase I Amp Grade (1U/ μL), permanecendo à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescentado de 2 μL de EDTA (25 mM) e incubado a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima DNase I.

3.5.3 Transcrição reversa

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), onde 2 μg de RNA total obtido do músculo esquelético foram acrescidos de 10 μL de tampão de transcriptase reversa (10X RT buffer), 4 μL de dNTP (25X), 10 μL de Random Primers (10X), 5 μL de enzima transcriptase reversa (50 unidades/ μL), 5 μL de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT (40 unidades/ μL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o volume final da reação ajustado para 100 μL com água ultrapura. As amostras foram incubadas durante duas horas no termociclador: 10 minutos à 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos para denaturação à 95 °C e anelamento à 55 °C e extensão à 72°C por uma hora. Em seguida, os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C.

Os produtos da reação de RT foram submetidos à reação de PCR, com Platinun PCR Supermix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para amplificação dos genes MyoD, Miogenina e da Miostatina (Tabela 1). Os primers para os genes Miostatina, MyoD e Miogenina foram desenhados a partir de sequências parciais de cDNA do *Ictalurus furcatus* (Ostariophysi, Siluriformes, Teleostei), publicadas no GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/nucleotide>). A amplificação de todos os genes foi realizada no termociclador e os produtos da reação de PCR foram verificados por sequenciamento nucleotídico, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos e temperatura de anelamento (TA) dos primers para os genes Miostatina, MyoD, Miogenina e 18S rRNA, utilizados na RT-PCR.

Produtos	Sequência de Primers (5' → 3')	TA, °C	Tamanho (pb)
Miostatina	Forward: AGACGGGAACAGGCACATAC Reverse: GGGATCTTGCCGTAGATGAT	57	497
MyoD	Forward : CTAACCAGAGGCTGCCHAAG Reverse: CACGATGCTGGACAGACAGT	55	280
Miogenina	Forward: CTCCATGATGGGCTTGTGTG Reverse: ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT	57	448
18S rRNA	Forward: TACCACATCCAAAGAAGGCAG Reverse: TCGATCCCGAGATCCAACACTAC	57	209

TA: Temperatura de anelamento

3.5.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

A sequência nucleotídica parcial obtida com o sequenciamento foi analisada através do programa BLASTn, disponível no site do "National Center for Biotechnology Information – NCBI" (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), para confirmar a similaridade com outros peixes teleósteos publicados. A sequência parcial obtida para os genes da Miostatina, MyoD e Miogenina no músculo esquelético da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada foram utilizadas para desenhar os respectivos primers para a PCR em Tempo Real (Tabela 2), através do software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e sintetizados pela (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs MyoD, Miogenina e da Miostatina na musculatura esquelética da tilápia foi feita por PCR em Tempo Real com a utilização do *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para cada amostra muscular, utilizou-se 2 µL cDNA (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 µL de *Power SYBR® Green Mix (2,5X)*, 2,5 µL de primers “sense” e 2,5 µL de primer “anti-sense” e 6,5 µL de água ultrapura, suficiente para um volume final de 25 µL de solução. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time*

PCR 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. Os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para o gene constitutivo rRNA 18S e ao término de cada PCR foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos e temperatura de anelamento (TA) dos primers para os genes Miostatina, MyoD, Miogenina e 18S rRNA, utilizados na PCR em Tempo Real.

Produtos	Sequência de Primers (5' → 3')	TA, °C
Miostatina	Forward: TGTGGACTTCGAGGACTTTGG	59
	Reverse: TGGCCTTGTAGCGTTTTGGT	
MyoD	Forward : TCAGACAACCAGAAGAGGAAGCT	58
	Reverse: CCGTTTGGAGTCTCGGAGAA	
Miogenina	Forward: GCAGCCCACTGAGGGAGAA	60
	Reverse: AAGCATCGAAGGCCTCGTT	
18S rRNA	Forward: GCAGCCGCGTAATTCC	58
	Reverse: ACGAGCTTTTTAACTGCAGCAA	

TA: Temperatura de anelamento

3.5.5 Construção das curvas padrão e cálculo da eficiência de amplificação

A avaliação quantitativa da expressão dos genes MyoD, Miogenina e Miostatina foi realizada pelo método do Ct comparativo, que analisa a expressão gênica de uma determinada amostra alvo em relação a uma amostra de referência. A quantificação relativa do gene alvo é calculada baseando-se na eficiência de amplificação e no ciclo da PCR onde foi detectado o aumento da fluorescência. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{E_{\text{gene alvo}}^{(Ct_{\text{gene alvo T}} - Ct_{\text{gene alvo C}})}}{E_{\text{gene controle}}^{(Ct_{\text{gene controle T}} - Ct_{\text{gene controle C}})}}$$

Onde:

E = eficiência de amplificação do *primer*

Ct (*cycle threshold*) = ciclo de PCR onde foi detectada a fluorescência acima do sinal basal do equipamento

Para estimar a eficiência de amplificação das amostras, foram utilizadas curvas padrão de diluição de cDNA para os genes alvos da MyoD, Miogenina e da Miostatina e o gene de referência 18S. Para a construção das curvas, foi utilizado um *pool* de cDNA das amostras de músculo de todos os grupos experimentais. A partir deste, foram feitas sete diluições seriadas das amostras de cDNA, para a construção da curva padrão.

Com base nos valores de Ct das amostras foi gerado um gráfico de Ct x log₁₀ do número relativo de cópias da diluição seriada. A eficiência de amplificação (E) para cada primer foi calculada utilizando-se o valor referente ao coeficiente angular da reta (*Slope* <0.1), que foi entre -3,4 a -3,3.

$$E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})}$$

3.6 Análise Estatística

Os dados de desempenho e de expressão gênica foram submetidos à análise de variância não paramétrica para um modelo com dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn, considerando o nível de 5% de significância (ZAR, 2009).

Os resultados de frequência de fibras musculares foram analisados com o teste de Goodman, considerando um nível de 5 % de significância (GOODMAN, 1964, 1965).

Referências Bibliográficas

ACOSTA, J.; CARPIO, Y.; BORROTO, I.; GONZÁLEZ, O.; ESTRADA, M.P. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. **Journal of biotechnology**. v.119, p.324-331, 2005.

ALAMI-DURANTE, H.; WRUTNIAK-CABELLO, C.; KAUSHIK, S.J.; MÉDALE, F. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.156, p. 561-568, 2010.

ALEXANDER, R. The orientation of muscle in the myomers of fishes. **Journal of Marine Biology**, Assoc. U.K., v. 49, p. 263-290, 1969.

ALFEI, L.; ONALI, A.; SPANO, L.; COLUMBARI, P.T.; ALTAVISTA, P.L.; De VITA, R. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). **European Journal of Histochemistry**. v.38, p.151-162, 1994.

ALI, M.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R.J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. **Fish and Fisheries**, v.4, p.147-190, 2003.

ASSIS, J.M.F.; CARVALHO, R.F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C.A.; DAL PAI-SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**. v. 237, p. 251-267, 2004.

BAHLER, A.S., FALES, J.T., ZIELER, K.L., The dynamic properties of mammalian skeletal muscle. **Journal General Physiology**. v. 51. p. 369-389, 1968.

BASTROP, R.; SPANGENBERG, R.; JURSS, K. Biochemical adaptation of juvenile carpa (*Cyprinus carpio* L) to food deprivation. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.9, p.143-149, 1991.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, p.1391-1396, 2001.

BOWER, N.I.; TAYLOR, R.G.; JOHNSTON, I.A. Phasing of muscle gene expression with fasting-induced recovery growth in Atlantic salmon. **Frontiers in Zoology**, p.6-18, 2009.

BRADLEY, L.; YAWORSKY, P.J.; WALSH, F.S. Myostatin as a therapeutic target for musculoskeletal disease. *Cell Mol Life Sci*, v.65, p.2119-2124, 2008.

CAMPOS, C.; VALENTE, L.M.P.; BORGES, P.; BIZUAYEHU, T.; FERNANDES, J.M.O. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in

Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). **The Journal of Experimental Biology**. v.213, p.200-209, 2010.

CLOSE, R.I. Dynamic properties of mammalian skeletal muscle. **Physiological Review**. v. 52, p. 129-197, 1972.

CURRIE, P.D.; INGHAN, P.W. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: Johnston IA, Muscle Development and Growth, **Academic Press, London**, p.1-17, 2001.

DAVE, G.; JOHANDDON-SJÔBECK, M.L; LARSSON, A.; LEWANDER, K.; LIDMAN, U. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla* L. I – Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 52, p. 423-430, 1975.

DOBSON, S.H.; HOLMES, R.M.; 1984. Compensatory growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**. v. 25, p. 649-656, 1984.

DRIEDZIC, W.R.; HOCHACHKA, P.W. Control of energy metabolism in fish white muscle. **American Journal of Physiology**. v.230, p.579-582, 1976.

FAUCONNEAU, B., ALAMI-DURANTE, H., LAROCHE, M.; MARCEL, J., VALLOT, D. Growth and meat quality relations in carp. **Aquaculture**. v. 129, p.265-297, 1995.

GURNEY, W.S.C.; JONES, W.; VEITCH, A.R.; NISBET, R.M. Resource allocation, hyperphagia and compensatory growth in juveniles. **Ecology**, v.84, p.2777-2787. 2003.

HAGEN, O.; FERNANDES, J.M.O.; SOLBERG, C.; JOHNSTON, I.A. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.152, p. 47-53, 2009.

JOBLING, M.; JOHANSEN, J.S. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. **Aquaculture Research**, v.30, p. 473-478, 1999.

JOHANSEN, K.A.; OVERTURF, K. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeedin and refeeding in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.144, p.119-127, 2006.

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

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. **Aquaculture**, v. 77, p. 99-115, 1999.

JOHNSTON, I.A.; HALL, T.E. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. **American Fisheries Society Symposium**, v.40, p. 85-116, 2004.

JOHNSTON, I.A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.209, p.2249-2264, 2006.

JOHNSTON, I.A.; MACQUEEN, D.J.; WATABE, S. Molecular biotechnology of development and growth in fish muscle. **Fisheries for Global Welfare and Environment, World Fisheries Congress**, p. 241-262, 2008.

JOHNSTON, I.A.; LEE, H.T.; MACQUEEN, D.J.; PARANTHAMAN, K.; KAWASHIMA, C.; ANWAR, A.; KINGHORN, J.R.; DALMAY, T. Embryonic temperature affects muscle fiber recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. **The Journal of Experimental Biology**. v. 212, p. 1781-1793, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KADI, F. Cellular and molecular mechanisms responsible for the action of testosterone on human skeletal muscle. A basis for illegal performance enhancement. **Br J Pharmacol**, v. 154, p.522-528, 2008.

KESTMONT, P.; STALMANS, J. M. Initial feeding of European minnow larvae, *Phonixus phonixus* L. influence of diet and feeding level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 104, p. 327-340, 1992.

KIM, M.K; LOVELL, R.T. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. **Aquaculture**. v.125, p. 285-293, 1995.

KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí, 285p.: il, 2000.

LANGLEY, B.; THOMAS, M.; SHARMA, M.; GILMOUR, S.; KAMBADUR, R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **The Journal of Biological Chemistry**. v.277, p.49831-49840, 2002.

LEE, S.J. Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess. **Trends in Genetics**. v. 23, p. 475–477, 2007.

LEGERLOTZ, K.; SMITH, H.K. Role of MyoD in denervated, disused, and exercised muscle. Review. **Muscle and Nerve**. v. 38, p.1087-1100, 2008.

LEONHARDT, J. H.; FILHO, C. M.; FROSSARD, H.; MORENO, A. M. Características morfológicas, rendimento e composição do filé de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, p.125-132, 2006.

LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. New York: Van Nostrand Reinhold, p.260, 1989.

MACCATROZZO, L.; BARGELLONI, L.; RODAELLI, G.; MASCARELLO, F.; PATARNELO, T. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure and expression pattern. **Marine Biotechnology**. v. 3, p. 224-230, 2001.

McPHERRON, A. C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **The National Academic of Sciences**, v.94, p. 12457-12461, 1997.

McQUEEN, D.J.; ROBB, D.; JOHNSTON, I.A. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.). **The journal of Experimental Biology**. v.210, p. 2781-2794, 2007.

MOMMSEN, T.P. Paradigms of growth in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 129, p.207-219, 2001.

MONTSERRAT, N.; GABILLARD, J.C.; CAPILLA, E.; NAVARRO, M.I.; GUTIÉRREZ, J. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**. v 150, p. 462-472, 2007.

OCHI, H.; WESTERFIELD, M. Signaling networks that regulate muscle development: Lessons from zebrafish. **Development Growth & Differentiation**. v. 49, p. 1-11, 2007.

PATRUNO, M.; RADAELLI, G.; MASCARELLO, F.; CANDIA CARNEVALI, M.D. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. **Anatomy and Embryology**. v. 198, p. 487-504, 1998.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia: life history and biology. Local: SRAC – Southern **Regional Aquaculture Center**, n.283, 1999.

REHFELDT, C.; FIEDLER, I.; STICKLAND, N.C. Number and Size of muscle fibres in relation to meat production. "In": PAS, M.F.W; EVERTS, M.E.; HAAGSMAN, H.P. Muscle

development of livestock animals: physiology, genetics, and meat quality. **Trowbridge: CAB International**; p.1-62, 2004.

RESCAN, P.Y. Regulation and functions of myogenic regulatory in lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 1-12, 2001.

RIOS, R.; CARNEIRO, I.; Arce, V.M.; Devesa, J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* v.282, 993-999, 2002.

RODGERS, B.D.; WEBER, G.M.; KELLEY, K.M.; LEVINE, M.A. Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v.284, p.1277-1286, 2003.

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

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. *Muscle Development and Growth*, **Academic Press**, p.103-140, 2001.

SÄNGER, A.M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. *In: Johnston, I.A. (Ed) Muscle development and growth*. San Diego: **Academic Press**, p.187-250, 2001.

SCHIERHOLT, A.S.; FONSECA, I.; SILVA, P.V.; PAIVA, S.R.; CHAVES, L.C.S.; LOPES, P.S.; FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F. Análise filogenética do gene da miogenina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.156-162, 2008.

SCORVO-FILHO, J.D.; SCORVO-FRASCÁ, C.M.D.; ALVES, J.M.C.; SOUZA, F.R.A. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 39, p. 112-118, 2010.

SHERIDAN, M.A.; MOMMSEN, T.P. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **General Comparative Endocrinology**. v.81, p.473-483, 1991.

SOUZA, V.L.; URBINATI, E.C.; GONÇALVES, D.C.; SILVA, P.C. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, p.533-540, 2002.

STAINBACHER, P.; HASLETT, J.R.; OBERMAYER, A.; MARSCHALLINGER, J.; BAUER, H.C.; SANGER, A.M.; STOIBER, W. MyoD and miogenina expression during myogenic phases in brown trout: a precocious onset of mosaic hyperplasia is a prerequisite for fast somatic growth. **Developmental dynamics**, v.236, p.1106-1114, 2007.

STOTZER, U.S. Efeitos do treinamento resistido associado com decanoato de nandrolona sobre a expressão gênica de moduladores de vias de hipertrofia e atrofia do músculo esquelético. 2009. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VALENTE, L.M.P.; ROCHA, E.; GOMES, E.F.S.; SILVA, M.W.; OLIVEIRA, M.H.; MONTEIRO, R.A.F.; FAUCONNEAU, B. Growth dynamics of White and red muscle fibres in fast and slow growing strains of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**. v.55, p.675-691, 1999.

VEGGETTI, A.; MASCARELLO, F.; SCAPOLO, P.A. Hiperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*. An ultrastructural and morphometric study. **Anatomy and Embryology**. v.182, p.1-10, 1990.

VEGGETTI, A.; MASCARELLO, F.; SCAPOLO, P.A.; ROWLERSON, M.D.; CARNEVALI, C.M.D. Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish (*Poecilia reticulata*) (Atheriniformes, Poeciliidae): a histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. **Anatomy and Embryology**. v.187, p.353-361, 1993.

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS,K.; HANLEY,F. Tilapia Production systems in the americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v.10, p.465-498, 2002.

ZANONI, M.A; FILHO, M.C.; LEONHARDT,J.H. Performance de crescimento de diferentes linhagens de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), em gaiolas. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.22, p.683-687, 2000.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Editora prentice – Hall: New Jersey, 5rd ed., 2009.

ZIMMERMANN, S. O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, p.15-19, 2000.

CAPÍTULO 1

MORPHOLOGY AND EXPRESSION OF GROWTH-RELATED GENES IN SKELETAL MUSCLE IN JUVENILE NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus*, STRAIN CHITRALADA DURING FASTING AND REFEEDING

Abstract

Muscle growth mechanisms are controlled by molecular pathways which can be affected by food restriction and refeeding. In this study, we analyze if short periods of starvation and refeeding can influence the expression of muscle growth-related genes and muscle growth characteristics, in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), strain chitralada. We used juvenile fish with average body weight of 0.6 ± 0.19 g randomly divided into three groups with three replicates: (AL) feeding continuously from beginning to end of the experiment; (J5) five days fasting and refeeding for 37 days and (J10) ten days fasting and refeeding for 32 days. The experiment lasted 42 days. After 5 and 10 days of food restriction, fish from J5 and J10 were fed to apparent satiation with a commercial diet. At the beginning of the experiment (day 0) and at 5, 10, 20 and 42 days, fish from all treatment (n=14) were anesthetized and sacrificed. Muscle samples (n= 7 at each group) were collected, fixed in Karnovsky solution and transverse sections were stained by hematoxylin-eosin to evaluate muscle morphology and muscle fiber hypertrophy and hyperplasia. The muscle fibers were grouped into classes, ≤ 20 μm , $>20 - \leq 30$ μm , $>30 - \leq 40$ μm , $> 40 - \leq 50$ μm and >50 μm . MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression was performed by RT-qPCR. After refeeding, fasted fish gained weight continuously and at the end of the experiment, J5 and J10 showed an increase in body weight, but just J5 group showed total compensatory growth. HE stain showed white skeletal muscle making up most of the muscle mass in all groups studied; morphological characteristic were similar among the groups in all periods analyzed. After 20 days of refeeding, the frequency of $>20 - \leq 30\mu\text{m}$ fibers in J10 was higher than AL and J5. The frequency of $>50\mu\text{m}$ fibers was higher in AL group and at the end of the experimental period, only muscle fiber frequency of $\leq 20\mu\text{m}$ diameter was different between groups; it was higher in J5 group. RT-qPCR results showed that in 5 day, the MyoD mRNA levels were higher in AL than that observed in J5 and J10 groups and in 20 days, after refeeding, MyoD expression was higher in J5 and J10 groups compared to the AL control group. Myogenin gene expression was lower in J5 and J10 groups in relation to AL group, at 5 days of starvation and at 42 days, the myogenin levels in AL group was higher than J5 and J10 groups. During starvation at 5 days, the myostatin mRNA levels were higher in J5 and J10 groups in comparison to the AL group and at 42 days, the myostatin gene expression was similar in all groups. In conclusion, in this study we showed that short periods of fasting followed by refeeding in juvenile Nile tilapia was able to change body weight, the expression of muscle growth-related genes and the muscle fiber hypertrophy and hyperplasia. Five and 10 days of

fasting did not affect the compensatory weight gain and muscle growth. These results demonstrate the importance of understanding the effects of alternative feeding strategies on muscle growth to minimize production costs in aquaculture programs.

Key-words: *Oreochromis niloticus*, starvation, compensatory growth, muscle growth, Myogenic Regulatory Factor, Myostatin

1. Introduction

Methods for maximizing growth have been tested for many years in aquaculture. One of these methods, starvation and refeeding, results in varied levels of growth rate. After starvation, undernutrition or unfavorable environmental conditions, many organisms exhibit faster growth called compensatory growth (Hornick et al., 2000). This accelerated growth is identified by being significantly faster than the growth rate of control animals that have not experienced growth depression and were held under the same conditions. Compensatory growth rate is dependent on several factors like severity and duration of fasting and refeeding, the stage of development and the fish species (Ali et al., 2003). There are several hypotheses that attempt to explain the increased growth following a starvation period as an increasing in feed intake (hyperphagia) (Jobling, 1999; Johansen and Overturf, 2005; Hayward et al., 2000), protein synthesis (Bower et al., 2009) and hormonal responses (Gaylord and Gatlin III, 2001). Muscle is one of the most important tissues that is considerably affected by starvation and refeeding. Genetic alteration induced by starvation and refeeding also results in changes in growth rate and concomitant in skeletal muscle remodeling (Hornick et al., 2000).

In most fish, skeletal muscle makes up 40–60% of total body mass (Weatherley and Gill, 1985) and is predominantly composed of white muscle, the edible part of the fish (Zhang et al., 1996); this muscle mass not only represents a specific mechanism adaptation in the aquatic environment, but also is used as an important source of protein in human feeding. Red muscle forms a thin superficial layer, generally making up less than 30% of total musculature (Greer-Walker and Pull, 1975; Hoyle et al., 1986; Luther et al., 1995). There is an intermediate layer of muscle fibers between the red and white musculature with intermediate characteristics (Sänger and Stoiber, 2001). Researchers showed that mobilization of protein during starvation were not similar in white and red skeletal muscle. Starvation protocols lead to a substantial decrease in the average size of white muscle fibers, while red muscle fibers seems to be barely affected, implying that white muscle is the main target in experimental condition (Fauconneau et al., 1995; Martínez et al., 1999).

Fish muscle growth is a plastic mechanism involving populations of adult myoblast, also called satellite cells (Johnston, 1999). These cells provide the essential nuclei for new muscle fiber formation (hyperplasia) and (hypertrophy) (Koumans and Akster, 1995). During hypertrophic growth, as fibers expand they absorb myoblast nuclei in order to maintain a relatively constant ratio between the nucleus and the cytoplasm (Koumans et al., 1994). In

hyperplastic growth, new fibers form on the surface of existing fibers by myoblasts that fuse to form multinucleated myotubes (Johnston, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001).

Skeletal muscle growth is regulated by a several molecules, as myogenic regulatory factors (MRFs) and myostatin. The MRFs, which include MyoD, Myf5, myogenin, and the MRF4 (Weintraub, 1993; Watabe, 1999, 2001) are transcription factors that share a highly conserved central region termed the basic helix-loop-helix (bHLH) domain (Edmonson and Olson, 1993) which mediates sequence-specific DNA binding called E-box, found in the promoters regions of many skeletal muscle-specific genes (Blackwell and Weintraub, 1990; Lassar et al, 1989; Murre et al., 1989). During skeletal muscle growth, MyoD and Myf-5 regulate satellite cells activation and proliferation, whereas myogenin and MRF4 act in the cell differentiation (Watabe, 1999, 2001).

Myostatin, also known as “growth and differentiation factor-8” (GDF-8), is a member of the “transforming growth factor- β ” (TGF- β) superfamily proteins (McPherron et al., 1997). Myostatin functions as a negative regulator of skeletal muscle growth and in fish, the myostatin not only inhibits skeletal muscle growth, but also plays important roles in maintenance of homeostatic tissue growth and reproductive tissue function (Rodgers et al., 2001; Lee et al., 2009). *In vitro* studies have showed that myostatin inhibits satellite cell proliferation and differentiation (Thomas et al., 2000; Langley et al., 2002). In fish, myostatin is mainly expressed in skeletal muscle and at a lower level in several organs, such as brain, eyes, exocrine and endocrine pancreas, gills, gonads, heart, intestine, kidney, liver, oesophagus, pharynx, skin, spleen, and stomach (Maccatrozzo et al., 2001; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001; Roberts and Goetz, 2001; Kocabas et al., 2002; Ko et al., 2006). Then, in fish, the role of myostatin may not be restricted to muscle growth regulation, but may have other possible functions both in muscle and other tissues (Østbye et al., 2001; Acosta et al., 2005; Patruno et al., 2008).

Since muscle growth mechanisms are dependent of the several molecular pathways which can be influenced by extrinsic factors, in this study, we analyze if short periods of starvation and refeeding can influence the expression of muscle growth-related genes and muscle growth characteristics, in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The aim of this study was to evaluate de MRFs MyoD, Myogenin and Myostatin mRNA expression, muscle fiber hypertrophy and hyperplasia during short starvation periods and refeeding, in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

2. Material and Methods

2.1 Fish rearing conditions and experimental design

The experiment was conducted at the Nutrition Laboratory of Aquatic Organisms from Aquaculture Center, UNESP, SP. We used 900 juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), strain chitralada. The fish with average body weight of 0.6 ± 0.19 g and total length 35.6 ± 29.4 mm were stored in nine polyethylene tanks with 150 liters of water system and aeration constant. The experiment lasted 42 days. Fish were randomly divided into three groups with three replicates: (AL) feeding continuously from beginning to end of the experiment; (J5) five days fasting and refeeding for 37 days and (J10) ten days fasting and refeeding for 32 days (Figure 1). After 5 and 10 days of food restriction, fish from J5 and J10 were fed to apparent satiation with a commercial diet. The physico-chemical parameters of water (temperature, pH and dissolved oxygen) were weekly measured. At the beginning of the experiment (day 0) and at 5, 10, 20 and 42 days, fish from all treatment (n=14) were anesthetized using benzocaine (0.1g L⁻¹), individually weighed (g), measured (mm) and sacrificed. This experiment was approved by the Ethics Committee of the Biosciences Institute, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

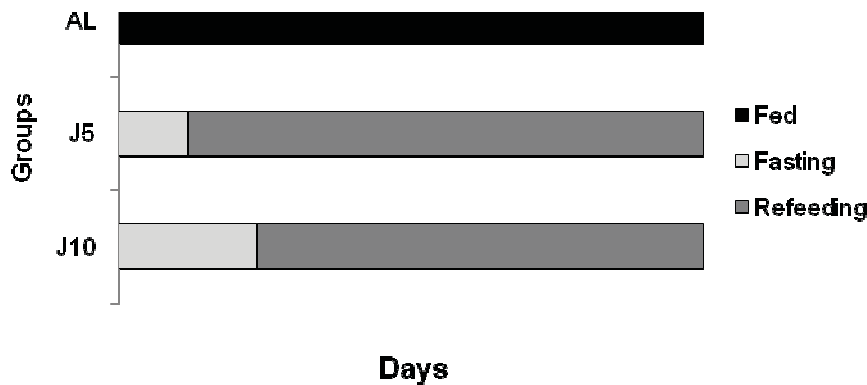


Fig. 1. Experimental design. Groups studied: AL (feeding continuously from the beginning to end of the experiment); J5 (five days fasting and refeeding for 37 days) and J10 (ten days fasting and refeeding for 32 days).

2.2 Morphological and morphometric analysis

Muscle samples (n= 7 at each group) were collected and fixed in Karnovsky solution (8% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in PBS). After 24 hours, the samples were washed in PBS, dehydrated in ethanol (increasing concentrations from 50 to 100%) and finally subjected to pre-infiltration with glycol methacrylate solution and activator (embedding kit – Leica) and 95% ethanol (1: 1, v/v) for four hours. For the final inclusion, the materials were embedded in resin (glycol methacrylate and hardener) and so remained at 37° for 24 hours. Histological transverse sections 4 µm thickness were obtained and stained with hematoxylin-eosin (Bancroft and Steven, 1990). This was used to evaluate muscle morphology and calculate fiber diameter (Dubowitz and Brooke, 1973). To estimate fiber cross-section diameter (µm), 200 white muscle fibers from each animal per group were measured using an image analysis system (Leica Qwin, Germany). The smallest fiber diameter was used to avoid any errors that might have been caused by cross-sections not being completely true (Dubowitz and Brooke, 1973); we calculated the smallest diameter of 200 white fibers per animal to assess the degree of hypertrophy or hyperplastic in muscle growth in Nile tilapia subjected to starvation and refeeding. Subsequently, the muscle fibers were grouped into classes, depending on their diameter (≤ 20 µm, $>20 - \leq 30$ µm, $>30 - \leq 40$ µm, $> 40 - \leq 50$ µm and > 50 µm), based on the methodology used by Valente et al. (1999). Muscle fiber frequency was expressed as the number of fibers from each diameter class relative to the total number of fibers measured.

2.3 MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression

2.3.1 RNA isolation and cDNA synthesis

Skeletal muscle samples (n= 7 at each group) were collected and total RNA were isolated at the periods 0, 5, 10, 20 and 42 days of the experiment. Total RNA was extracted from muscle samples using TRIzol[®] Reagent, according to the manufacture's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Extracted RNA integrity was confirmed by electrophoresis on 1% agarose gel stained with GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA), visualized under ultraviolet light (not shown). The amount of RNA extracted was determined using a NanoVue[™] Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). RNA purity was ensured by obtaining a 260/280nm OD ratio ≥ 1.8 .

Total RNA was treated with Dnase I Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove any potential genomic DNA contamination present in the samples.

Total RNA (2µg) was reverse transcribed using the High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), with 10µl of reverse transcriptase buffer (10X RT buffer), 4mL of dNTP (25X), 10µL of Randon Primers (10X), 2.5µL of MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl), 2.5µL of Recombinant Ribonuclease Inhibitor RNaseOUT (40U/µL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), and the final volume adjusted to 100mL with RNase-free water.

2.3.2 Quantitative real-time polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Samples were then PCR amplified with specific primers to myoD, myogenin and myostatin genes, designed from cDNA nucleotide sequences from other teleost fishes, available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/nucleotide>). A set of primers, designed from *Piaractus mesopotamicus* (Ostariophysi, Characiformes, Teleostei) 18S ribosomal RNA sequence (GenBank Acession Number GQ337002), was used to amplify a segment of the 18S rRNA gene, used as the reference gene in quantitative RT-PCR analysis.

All PCR products were sequenced using the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (GE Healthcare - Amersham Biosciences) procedures. The partial nucleic acid sequences obtained (unpublished data) were analyzed in BLASTN search at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and used to design primer pairs for the qRT-PCR analysis with Primer Express® software (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Table 1).

Tab.1. Oligonucleotide primers used for RT-qPCR amplification.

Genes	Primers (5' → 3')	AT, °C	Size (bp)
Myostatin	Forward: TGTGGACTTCGAGGACTTTGG Reverse: TGGCCTTGTAGCGTTTTGGT	59	59
MyoD	Forward : CAGACAACCAGAAGAGGAAGCT Reverse: CCGTTTGGAGTCTCGGAGAA	58	60
Myogenin	Forward: GCAGCCCACTGAGGGAGAA Reverse: AAGCATCGAAGGCCTCGTT	60	58
18S rRNA	Forward: GCAGCCGCGGTAATTCC Reverse: ACGAGCTTTTAACTGCAGCAA	58	62

AT: annealing temperature; bp: base pairs

MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression analysis were performed with an ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A sample without cDNA template was used to verify whether the master mix was free from contamination. Real-time conditions were: 10 min at 95°C, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Wells contained 25µL of PCR mixture including 2µL cDNA at a 1:10 dilution for muscle samples. Two replicates of each sample and reference gene were amplified. Data from Power SYBR[®] Green PCR amplicons were collected with ABI 7300 System SDS software v.1.4 (Applied Biosystems). Fluorescence signal baseline and threshold were set manually for each detector (MyoD, myogenin, myostatin and 18S rRNA), generating a threshold cycle (Ct) for each sample. Standard curves for all targets and the reference gene, created on the basis of a linear relationship between the Ct value and the log of the starting cDNA quantify, showed acceptable slope values, between -3.4 and -3.3 (Patrino et al., 2008). Standard curves were obtained by using 7 serial dilutions (1:10) of sample cDNAs.

Relative quantification was by the Comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$), which met the requirements of the method. All PCR efficiencies in this study were measured and found adequate (slope <0.1). The difference between Ct values were calculated for each mRNA by taking the mean Ct of duplicate reactions and subtracting the mean Ct of duplicate reactions for the reference gene mRNA ($\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{reference gene}}$). All samples were then normalized to the ΔCt value of a calibrator sample to obtain a $\Delta\Delta Ct$ value ($\Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\text{calibrator}}$).

The Comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) calculates relative quantifications in relation to calibrator sample concentrations ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), expressed in arbitrary units and normalized to the

endogenous reference gene (18S rRNA). Therefore, by using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, data were recorded as the fold-change in gene expression normalized with the reference gene and relative to the calibrator sample (Livak and Schmittgen, 2001). Dissociation melting curves confirmed the specific amplification of the cDNA target and the absence of nonspecific amplification products.

2.4. Statistical Analysis

Body weight and relative gene expression data were expressed as minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum values, using the non-parametric ANOVA for two-way followed by Dunn multiple comparison tests (Zar, 2009). Statistical significance level was set at $P < 0.05$ for all analyses.

Muscle fibers diameter data were expressed as frequency percentage, analysed by Goodman test between and within population multinomial (Goodman, 1964,1965).

3. Results

3.1 Starvation and refeeding experiment

During the experimental period, the following average values of tanks water quality were observed: temperature 26.7 ± 0.6 °C, pH 8.3 ± 0.55 and dissolved oxygen 6.5 ± 0.17 mg/L.

At the end of the experiment, fasting for five and ten days resulted in small reduction on body weight compared with AL group, fed continuously. Following refeeding, fasted fish gained weight continuously; at 42 day, J5 showed an increase in body weight, which was similar to that observed in AL group. In J10, body weight increased after refeeding, but it was lower than that observed in AL group ($P < 0.05$) (Figure 2).

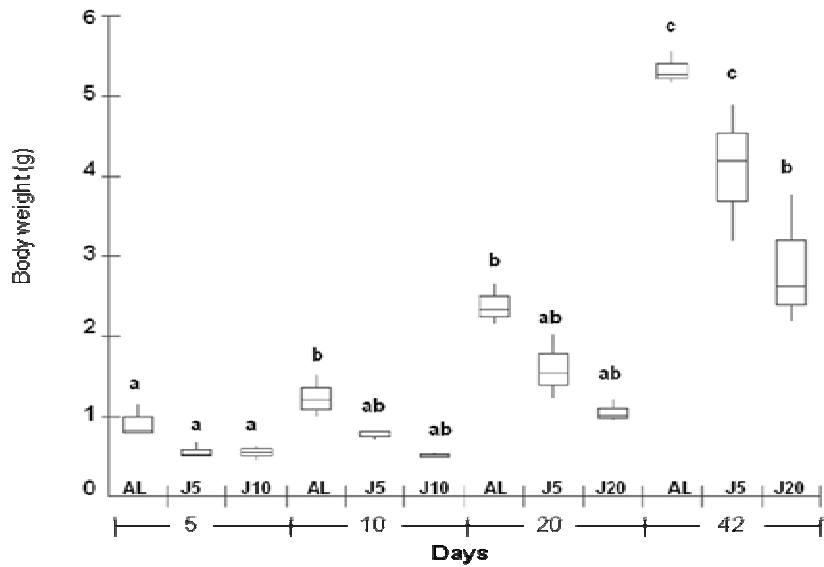


Fig. 2. Juvenile Nile tilapia body weight (g) of AL, J5 and J10 groups throughout the experiment. Data are reported median values (minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum). Values with the same letters are not statistically significant ($P < 0.05$, two-way ANOVA).

3.2 Morphological and morphometric analysis

HE stain showed white skeletal muscle making up most of the muscle mass in all groups studied; morphological characteristic were similar among the groups in all periods analyzed. The muscle consisted of round or polygonal muscle fibers separated by a fine septum of connective tissue, the endomysium. Thicker septa of connective tissue separated muscle fibers into fascicles and made up the perimysium. Muscle fibers were distributed in a mosaic pattern characterized by fibers of different diameters. Muscle mass increased throughout the experimental period (Figure 3).

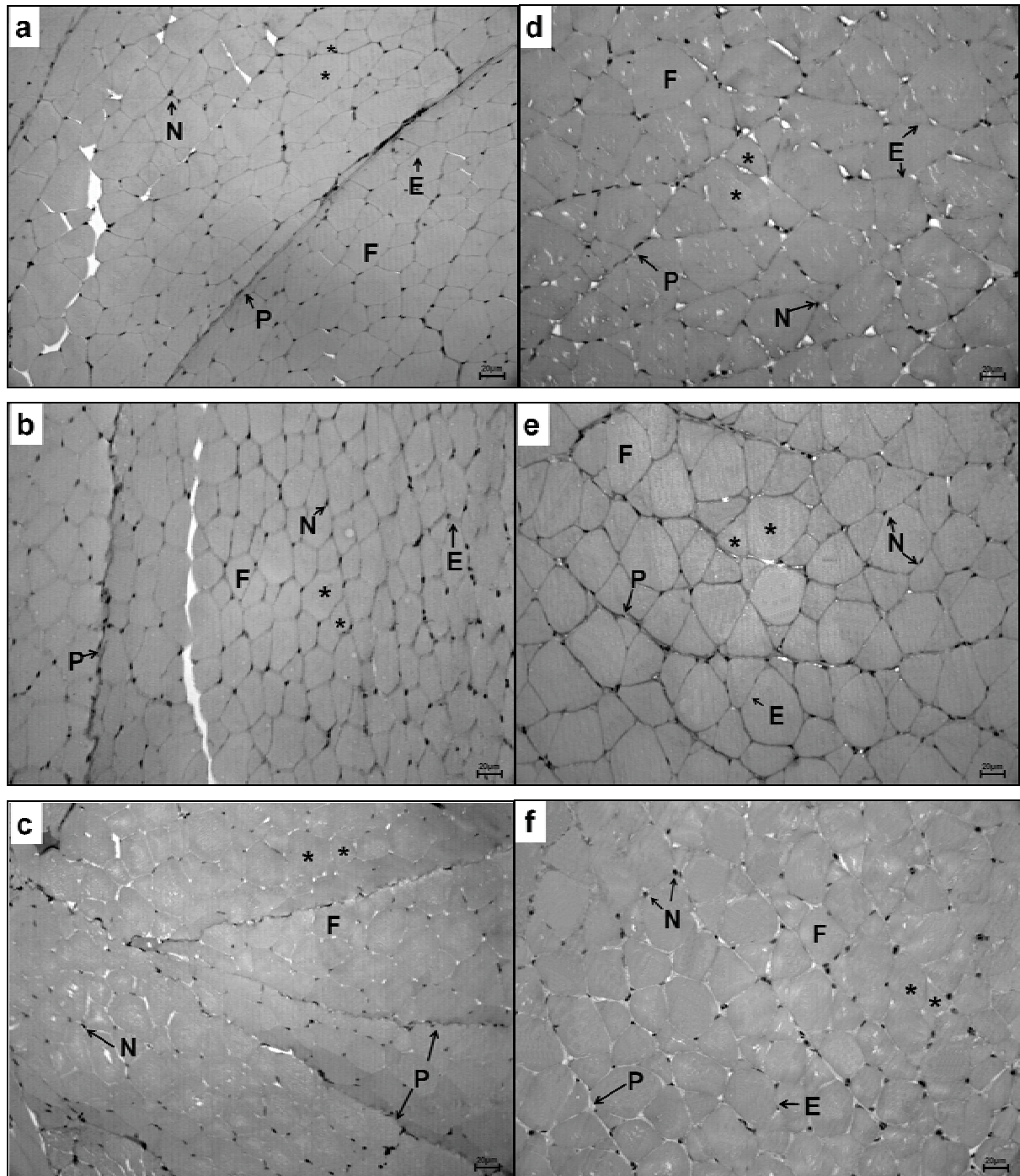


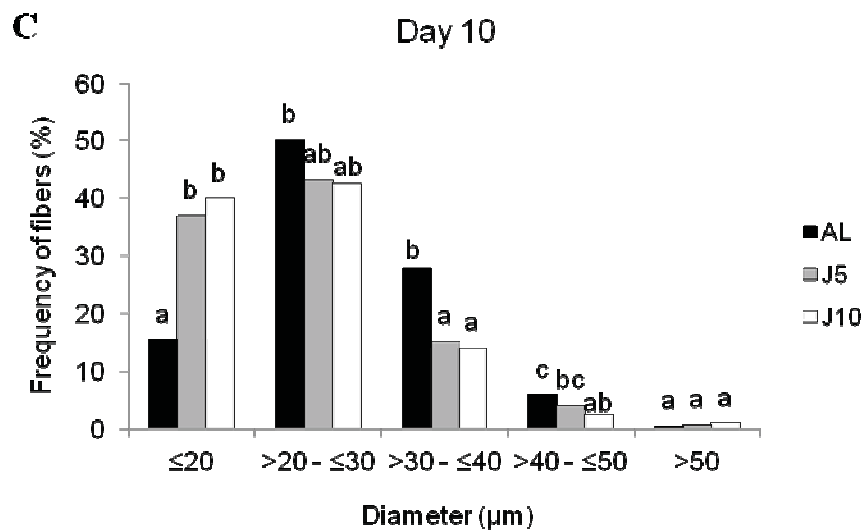
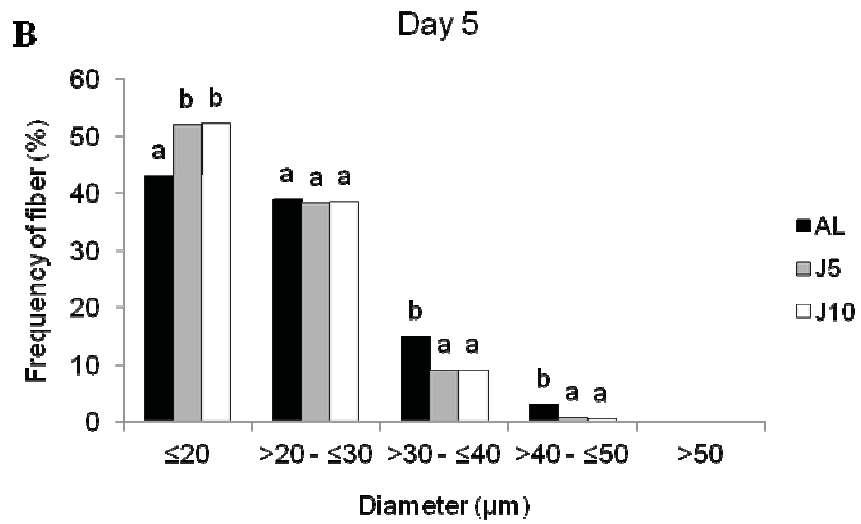
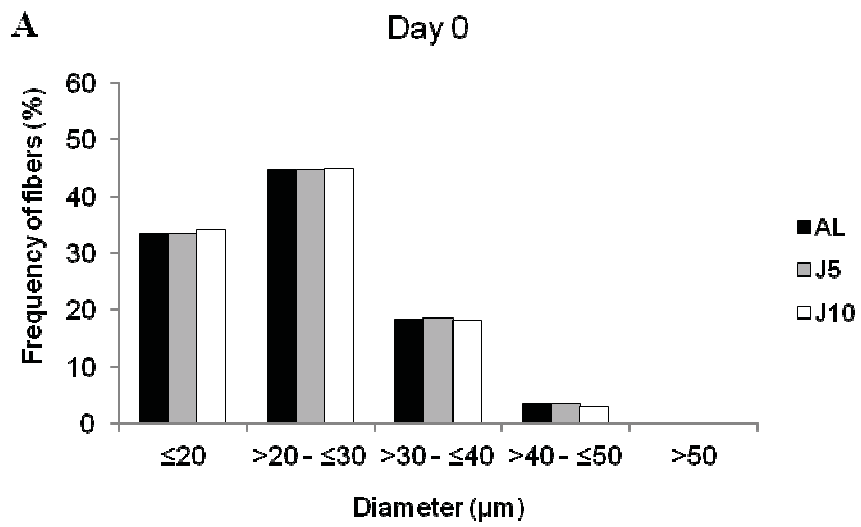
Fig. 3. Transverse sections of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) white skeletal muscle of AL, J5 and J10 groups. Muscle fibers (F), nucleus (N), endomysium (E), perimysium (P). Note a mosaic pattern of muscle fibers with different diameters (*). A: Day 0; B: J5 at 5 days; C: J10 at 10 days. D, E and F: AL, J5 and J10, respectively at the end of the experiment. Hematoxylin-eosin stain. Bars: 20 µm.

At day 0, muscle fiber frequency distribution in all groups was similar. The majority of muscle fibers (~70%) showed diameters $\leq 30\mu\text{m}$. In 5 days, the frequency of $\leq 20\mu\text{m}$ diameter fibers in J5 and J10 was significantly higher than in AL group; the frequency of $>30 - \leq 40\mu\text{m}$ and $> 40 - \leq 50\mu\text{m}$ diameter fibers in AL was statistically higher than J5 and J10 ($p<0.05$).

In 10 days, the frequency of $\leq 20\mu\text{m}$ diameter fibers in J5 and J10 was significantly higher than in AL group; the frequency of $>20 - \leq 30$ and $>30 - \leq 40\mu\text{m}$ diameter fibers in AL was statistically higher than J5 and J10. In the frequency of $> 40 - \leq 50\mu\text{m}$ diameter fibers, AL and J5 were similar, being higher than J10 ($p<0.05$).

In 20 days, the frequency of $\leq 20\mu\text{m}$ diameter fibers in AL and J5 was similar and significantly higher than in J10 groups; the frequency of $>20 - \leq 30\mu\text{m}$ diameter fibers in J10 was statistically higher than AL and J5. In the frequency of $>30 - \leq 40\mu\text{m}$ diameter fibers, AL, J5 and J10 were similar. In the frequency of $> 40 - \leq 50\mu\text{m}$ diameter fibers, AL and J5 were similar and higher than J10. The frequency of $>50\mu\text{m}$ diameter fibers was higher in AL group ($p<0.05$).

At the end of the experimental period, only muscle fiber frequency of $\leq 20\mu\text{m}$ diameter was different between groups; it was higher in J5 (Figure 4).



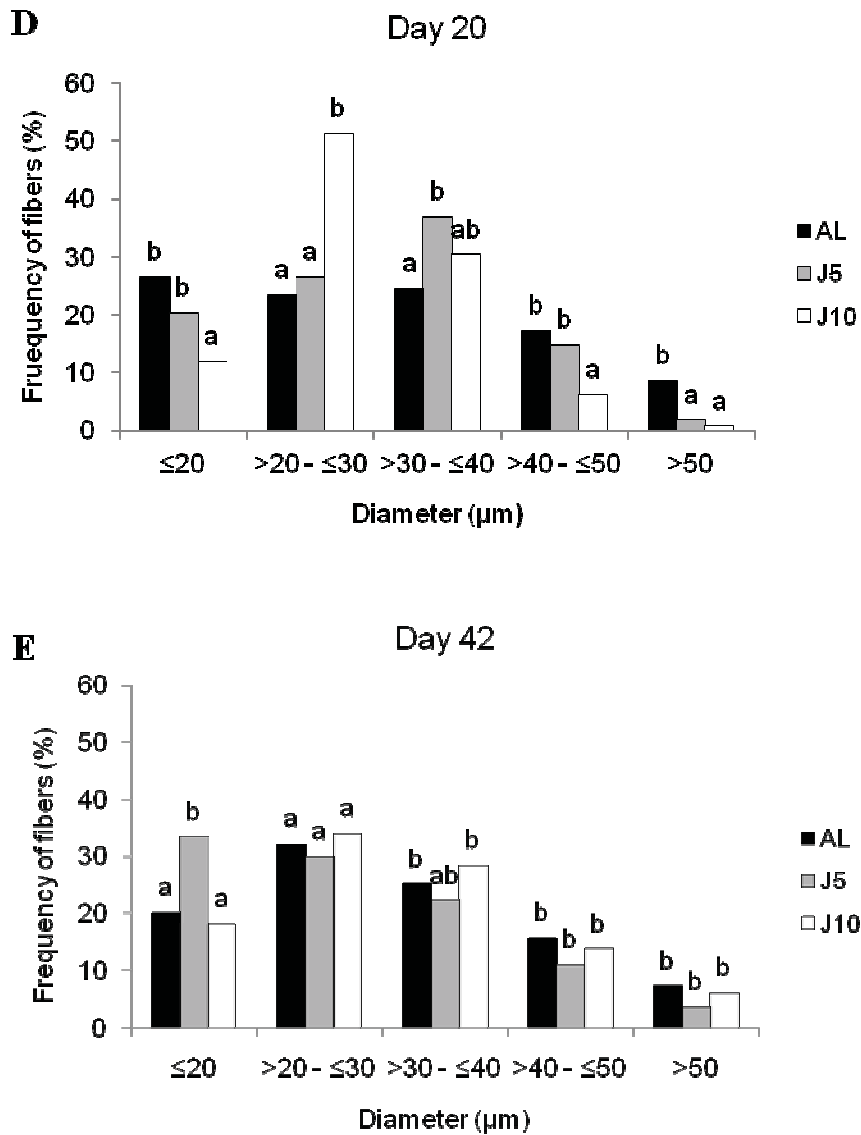


Fig. 4. Frequency distribution of white muscle fibers in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in ($\leq 20 \mu\text{m}$, $>20 - \leq 30 \mu\text{m}$, $>30 - \leq 40 \mu\text{m}$, $>40 - \leq 50 \mu\text{m}$, $>50 \mu\text{m}$) diameter classes at 0, 5, 10, 20 and 42 days of the experiment. Values with the same letters are not statistically significant, comparing the treatments in the same diameter class ($P < 0.05$, Goodman test).

3.3 MyoD, Myogenin and myostatin mRNA expression

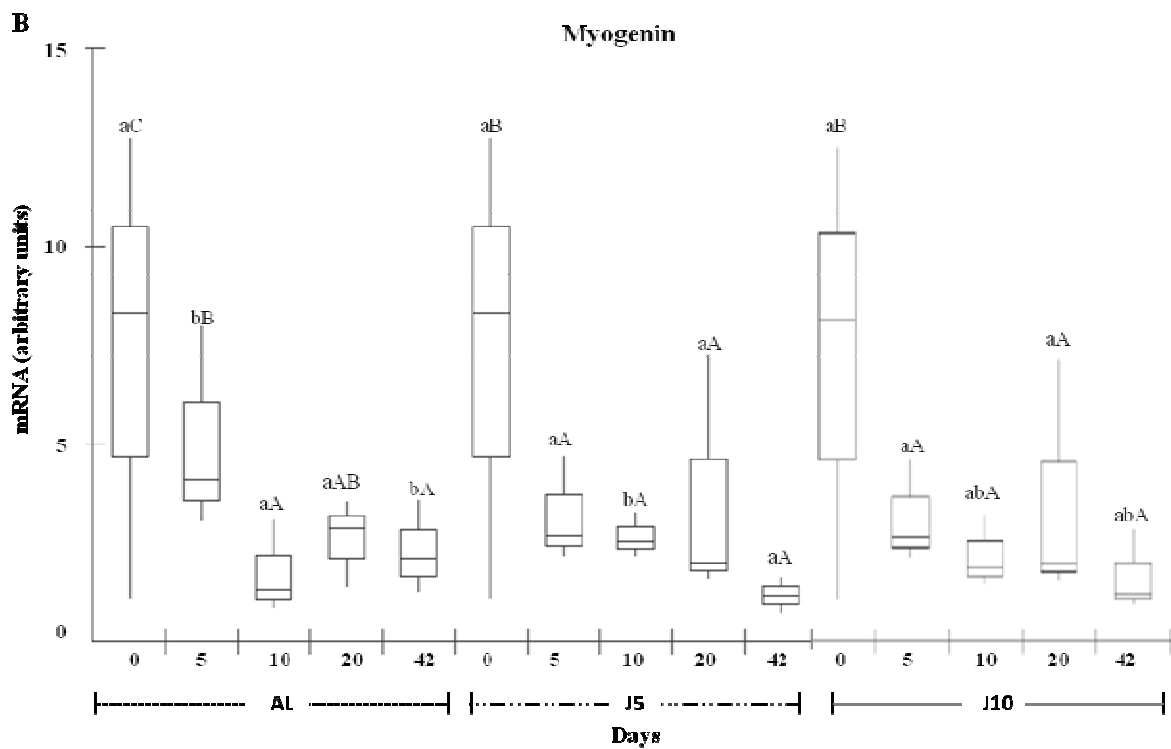
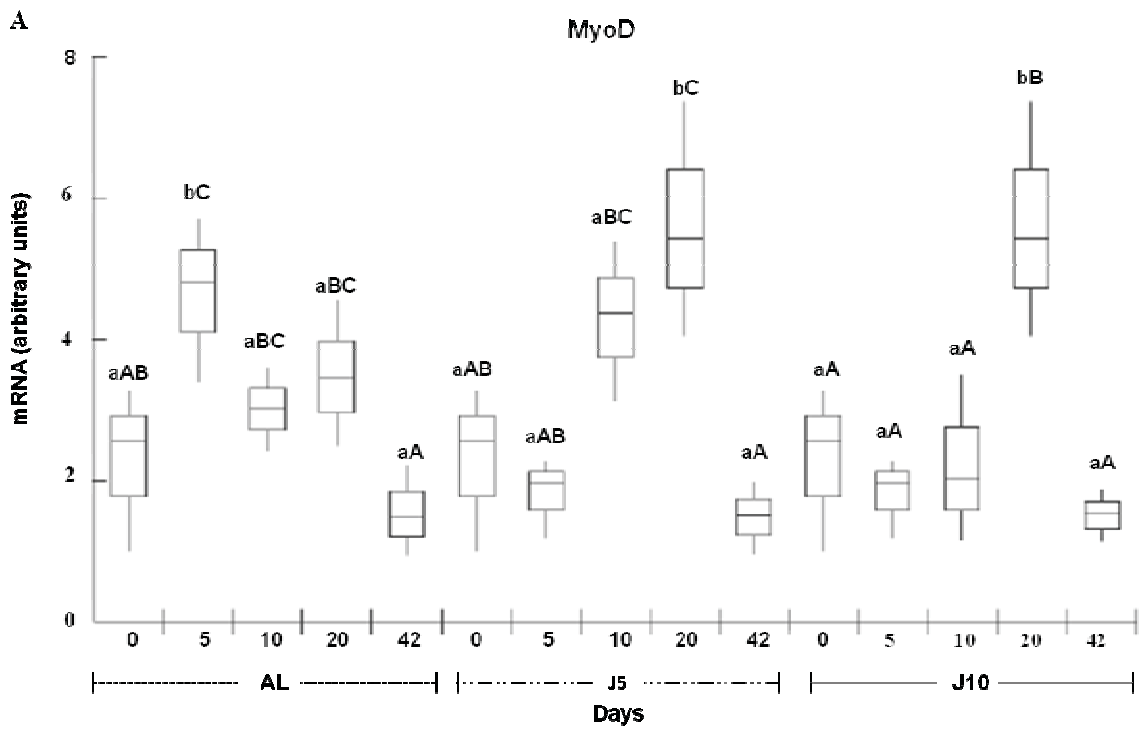
Gene expression was analyzed at the beginning of the experiment (day 0), and after 5, 10, 20 and 42 days. RT-qPCR results showed that in 5 day, the MyoD mRNA levels were higher in AL than that observed in J5 and J10 groups. In 20 days, MyoD expression was

higher in J5 and J10 groups compared to the AL control group. In 0, 10 and 42 days, MyoD expression was similar in AL, J5 and J10 groups.

In AL group, the MyoD mRNA levels were lower in the 0 day than in 5 day; which was higher than that observed in 42 day. In 5, 10 and 20 days, the MyoD mRNA expression was similar and higher than that in 42 day. In J5, the MyoD mRNA levels were similar in the 0 day and in 5 day, increasing in 10 and 20 days, which have showed a similar expression; in 42 day, MyoD mRNA expression was similar to those observed in the day 0 and in 5 day. J10 group presented similar MyoD mRNA expression in the 0 day and in 5 and 10 days; increasing in 20 days and in 42 day, MyoD mRNA expression was lower than those observed in 20 days, being similar to the other experimental periods (Figure 5a).

In AL group, the highest myogenin gene expression was observed in the 0 day, and then declined through the 5 and 10 day, which was similar to those seen in the 20 and 42 days; J5 and J10 have shown a similar myogenin gene expression pattern; the highest myogenin gene expression was observed in the 0 day and then declined through the 5 day which was similar to those seen in the 10, 20 and 42 days (Figure 5b).

Myostatin mRNA levels were higher in AL group at 0 day in comparison to the 10, 20 and 42 days, although has been similar in 5, 10, 20 and 42 days. In J5, myostatin mRNA expression was higher in the day 0 and in 5 day, decreasing in 10, 20 and 42 days when the expression levels were similar. In J10, myostatin mRNA expression was higher in the day 0 and in 5 day, decreasing in 20 and 42 days; in 10 day myostatin gene expression was similar to those seen in the 0, 5, 20 and 42 days (Figure 5c).



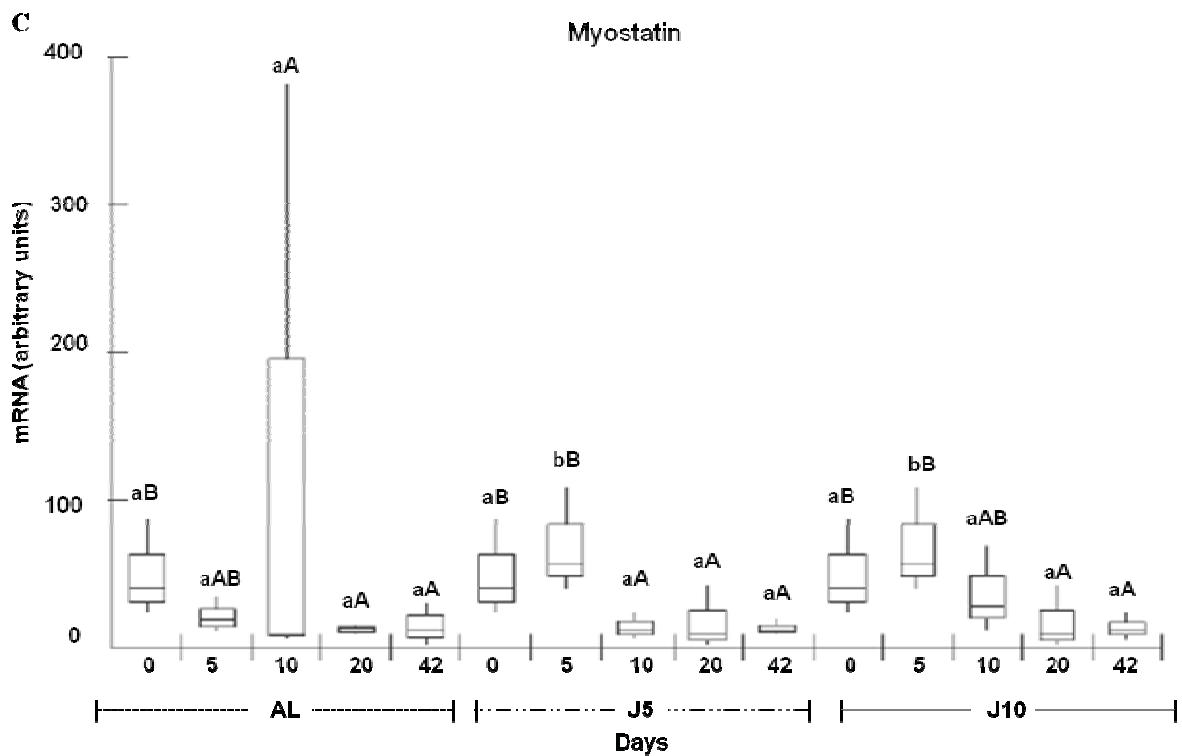


Fig. 5. Real-time RT-PCR quantification of MyoD (A), Myogenin (B) and myostatin (C) mRNA expression in the skeletal muscle of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in AL, J5 and J10 groups, at 0, 5, 10, 20 and 42 days of the experiment. Data were expressed as minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum values. Capital letters compare the gene expression in the same group. Small letters compare groups in the same analysis period ($P < 0.05$, two way ANOVA).

4. Discussion

In this study, we showed that short periods of fasting followed by refeeding in juveniles Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) changed the gene expression of MyoD, myogenin and myostatin and muscle growth characteristics. We have observed that the refeeding in J5 and J10 promoted compensatory growth weight and muscle fiber hypertrophy and hyperplasia changes.

4.1 Compensatory growth, muscle morphology and morphometry

Compensatory or catch-up growth is a phase of accelerated growth when favorable conditions are restored after a period of growth depression (Ali et al., 2003). As body weight of fasting group is usually smaller than that the control group at the start of the refeeding

period, higher growth rates are expected in the starvation treatments (Jobling, 1993). In the present study, the juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), strain chitralada, showed compensatory growth after starvation for five and ten days followed refeeding. However, only the group submitted to five days of fasting exhibited total compensatory growth; the group submitted to ten days of fasting showed partial catch-up growth. However, compensatory growth rate is dependent on several factors like severity and duration of fasting and refeeding, stage of development and the fish species (Ali et al., 2003). Hybrid tilapia (*O.niloticus* x *O. mossambicus*) reared in seawater, submitted to one week of starvation followed refeeding during four weeks showed total compensatory growth, while the groups submitted to two and four weeks of fasting followed by four weeks of refeeding were unable to achieve complete growth compensation (Wang et al., 2000). Cycles of food restriction and refeeding in juveniles Nile tilapia, strain GIFT, fish showed complete compensatory gain weight after cycles of two days fasting and five days of feeding during 63 days of experiment (Palma et al., 2010). However, Wang et al. (2009) have showed in juvenile Nile tilapia no total compensatory growth when fish were food deprived for one week and fed for two weeks cyclically.

Most works of compensatory growth in fish have been carried out on cold water species and in most studies has been observed a partial catch-up growth; studies with warm water species are scarce (Wang et al., 2000). Cold water species including Atlantic halibut, rainbow trout and sea bream undergo natural periods of several months fasting each year due to reductions in water temperature and feed intake; for this reason many studies involving starvation and refeeding in these species not revealed weight loss (Power et al., 2000; Hagen et al., 2009; Macqueen et al., 2010). In warm water species, like Nile tilapia, body weight gain is influenced by several factors, as temperature (Nicieza and Metcalfe, 1997), hypoxic conditions (Foss and Imsland, 2002), salinity of water (Damsgard and Arnesen, 1998) and stocking density (Basiao et al., 1996). This can explain the differences in results involving fasting and refeeding in these species.

Morphological examination of juvenile Nile tilapia skeletal muscle showed the majority of musculature to be composed of the white compartment, at all periods analyzed. This muscle mass has considerable economic significance (Zhang et al., 1996), similar to other fish species (Aguiar et al., 2005; Dal Pai-Silva et al., 2003a, 2003b; Fernandez et al., 2000) and is more affect during starvation (Martinez et al., 1999). In our study, all groups showed muscle fibers in a mosaic distribution pattern characterized by different fiber

diameters, as previously reported by Almeida et al. (2008; 2010) and Dal Pai et al. (2000); this characteristic has also reported in others fish species (Rowlerson and Veggetti, 2001).

In our experiment, morphometric analysis of juvenile Nile tilapia muscle showed significant changes in the white fiber diameter during the refeeding periods. In the 5 and 10 days of the experiment, AL group showed a low frequency of ≤ 20 μm diameter fibers and a high frequency in the >30 μm diameter fibers classes in comparison to J5 and J10 groups. These findings could be related to the muscle catabolism. Studies have shown that the system ubiquitin-proteasome may be involved in the muscle catabolism in fish. In fact, Seiliez et al., (2008), showed muscle proteolysis by activating proteins of the ubiquitin-proteasome pathway in juvenile trout subjected to 14 days of fasting; after 24 hours of refeeding, a significant decrease in the expression of these proteins occurred. It is possible that in our experiment, the ubiquitin-proteasome system contributed with the muscle proteins degradation during starvation.

In 20 day, J10 showed the lower frequency of ≤ 20 μm diameter fibers than observed in the AL e J5 groups. There were an increase in the frequency of $>20 - \leq 30$ μm and $>30 - \leq 40$ μm diameter fibers in J10 and J5 groups, respectively. In the $>40 - \leq 50$ μm class diameter, the frequencies in AL and J5 were similar. The presence of <30 μm diameter fibers indicates an active hyperplastic growth mechanism and fiber with diameters greater than 30 μm indicates the beginning of differentiation and hypertrophy (Rowlerson and Veggetti, 2001). Our results indicate that 10 days of fasting followed by 10 days of refeeding promoted an intense hyperplasia. Five days of fasting followed by 15 days of refeeding resulted in a significative hypertrophy in relation to the AL group. In J5, an intense hyperplasia occurred after 10 days of refeeding (15 Day, data not shown).

Muscle hyperplasia mainly occurs in two waves (Rowlerson and Veggetti, 2001). The first, known as stratified hyperplasia, is a continuation of embryonic myogenesis and takes place during part of larval life generating new fibers along a germinal or proliferative zone (Usher et al., 1994); it is responsible for thickening muscle mass in early developmental stages (Johnston et al., 2003; Rowlerson and Veggetti, 2001) and occurs in most fish species (Johnston, 1999). The second, mosaic hyperplasia, occurs in fish which grow to large sizes, such as tilapia, and new fiber production is found across the whole myotome. This results in a mosaic pattern of different fiber diameters, as seen in Nile tilapia skeletal muscle morphological analysis. Mosaic hyperplasia causes a large increase in fiber numbers during juvenile growth and is very important for commercial aquaculture species including Nile

tilapia; this characteristic is not seen in small species (Rowlerson and Veggetti, 2001). Hypertrophy is characterized by muscle fibers area expand by an increase in muscle protein synthesis (Rowlerson and Veggetti, 2001).

At the end of the experiment, muscle fiber hypertrophy was observed in all groups, as demonstrated by the high frequency of >30 μm diameter fibers. Meanwhile, the recruitment of new muscle fibers is also a hallmark in this period, since this species is in an active growth phase.

4.2 MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression

Fasting and refeeding protocols have become one of the main manipulative tools used to investigate the molecular and genetic mechanisms underlying the transition from a catabolic to an anabolic state in muscle fish (Blasco et al., 1992; Heide et al., 2006; Hagen et al., 2009; Bower et al., 2009).

In this study, juveniles Nile tilapia have showed a differential MyoD gene expression during short fasting periods and refeeding. During the starvation, MyoD mRNA levels were lower in J5 and J10 in relation to AL groups; the refeeding have promoted an increase in MyoD gene expression peaked at 10 and 20 days in J5 and at 20 days in J10 group. In rainbow trout, the MyoD mRNA expression did not change in response to 30 days of starvation and 14 days of refeeding (Johansen and Overturf, 2006). Similar results were observed in Atlantic salmon, when the fish were submitted to 32 days of starvation and 14 days of refeeding (Bower et al., 2009). To our knowledge this is the first work that shows an increasing in MyoD mRNA levels during short fasting periods followed by refeeding in warm water specie, the Nile tilapia.

Myogenin gene expression pattern was similar in J5 and J10 groups with highest expression in the 0 day, decreasing in 5 day which was similar to those seen in the 10, 20 and 42 days. During skeletal muscle growth, MyoD and myogenin control the satellite cells proliferation and differentiation, respectively (Megeney and Rudnicki, 1995; Rudnicki and Jaenisch, 1995; Watabe, 1999). These cells provide the essential nuclei for new muscle fiber formation hyperplasia and hypertrophy (Koumans and Akster, 1995). The high MyoD expression at 20 days could be related with an intense satellite cells proliferation which has contributed to the hypertrophy and hyperplasia in J5 and hyperplasia in J10, as observed in morphometric analysis. On the other hand, the myogenin mRNA levels detected at 20 days

may be related to the differentiation of satellite cells during hypertrophy and hyperplasia in J5 and the hyperplasia in J10 (Almeida et al., 2010).

In AL group, from the 0 day to 5 day, the MyoD mRNA levels detected could reflect the satellite cells proliferation, which have contributed to the muscle fiber hyperplasia and hypertrophy; these processes remain active at 10 and 20 days, decreasing in 42 day, where the MyoD expression was similar to that observed in 0 day. Myogenin mRNA levels observed in AL group could indicate a higher rate of satellite cells differentiation in the day 0. Although the myogenin expression has declined until 42 day, these mRNA levels detected could have been enough to promote satellite cells differentiation for the hyperplasia and hypertrophy, as demonstrated by the distribution of the muscle fiber diameter classes.

Myostatin mRNA levels in J5 were higher in the 0 and 5 days, decreasing in 10, 20 and 42 days when the expression levels were similar. In J10, myostatin expression was higher in the 0 and 5 days, decreasing in 20 and 42 days; in 10 day myostatin mRNA levels were similar to those seen in the other groups. Many studies have investigated the actions of myostatin in skeletal muscle development and growth. *In vitro* studies have shown that myostatin inhibits satellite cells proliferation activating cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which forces withdrawal from the cell cycle (Thomas et al. 2000). In our study, J5 and J10 have presented a similar myostatin gene expression pattern. In these groups, the high myostatin gene expression observed in 5 days could indicate a lower satellite cells proliferation activity; this is in according to the low MyoD mRNA level. Based on these results and the observation that satellite cells quiescent express myostatin (McCroskery et al., 2003), it has been suggested that one of the normal functions of myostatin in postnatal muscle is to maintain satellite cells in a quiescent and undifferentiated state (Manceau et al., 2008). In the present study, the fasting conditions used promoted an increase in myostatin gene expression which in turn could have influenced satellite cells activity and MyoD mRNA expression. The refeeding was able to promote a decreased in myostatin expression and an increasing on the MyoD mRNA expression, fact observed at 10 day in J5 and at 20 day in J10; this condition was maintained until the end of the experiment; this results could explain muscle fibers hyperplasia and hypertrophy phenomenon observed in this study.

In parallel, the activation of myostatin also has been associated with inhibition of myoblasts and satellite cells differentiation (Langley et al., 2002; Rios et al., 2002; Joulia et al., 2003; Fauconneau and Paboeuf, 2000), process controlled by the MRF myogenin expression (Megeny and Rudnicki, 1995; Grobet et al., 1997). The fact that myostatin

regulates the differentiation process by inhibiting myogenin action is supported by studies that show myogenin as a probable major target of endogenous myostatin (Joulia et al., 2003). However, this correlation between myogenin and myostatin expression was not observed in the present experiment, saving in 5 day, in both starvation groups. Johansen and Overturf (2006), showed that in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) the myogenin and myostatin mRNA levels were lower after 30 days of fasting and increased after 14 days of refeeding, indicating that myostatin may not have controlled the myogenin expression. In fact, the myostatin role in the regulation of muscle growth mechanisms is not well understood in fish. Studies have shown that the results related to myostatin regulates muscle growth mechanisms are dependent on fish species, growth phase, muscle type and nutritional conditions (Østbye et al., 2001; Roberts and Goetz, 2001; Patruno et al., 2008).

5. Conclusion

In conclusion, in this study we have showed that short periods of fasting followed by refeeding in juvenile Nile tilapia was able to change body weight, the expression of muscle growth-related genes and the muscle fiber hypertrophy and hyperplasia. Five and 10 days of fasting did not affect the compensatory weight gain and muscle growth. These results demonstrate the importance of understanding the effects of alternative feeding strategies on muscle growth to minimize production costs in aquaculture programs.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho National de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) for its financial support by means of student scholarship (132251/2009-0) and the Aquaculture Center, UNESP, Jaboticabal for the use of facilities.

References

Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., Estrada, M.P., 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechn.* 119, 324-331.

- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L.E., Dal Pai-Silva, M., 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *J. Fish Biol.*, 67(5), 1287-1298.
- Ali, M., Nicieza, A.; Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4, 147-190.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron*, 39, 1306-1311.
- Almeida, F.L.A., Pessoti, N.S., Pinhal, D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*, 41, 997-1004.
- Bancroft, J.D., Steven, A., 1990. *Theory and Practice of Histological Techniques*. third ed. Churchill Livingstone, New York.
- Basiao, Z.U., Doyle, R.W., Arago, A.L., 1996. A statistical power analysis of the 'internal reference' technique for comparing growth and growth depensation of tilapia strains. *J. Fish Biol.* 49, 277–286.
- Blackwell, T., Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science*, 250, 1104-1110.
- Blasco, J., Fernández, J., Gutiérrez, J., 1992. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilisation of reserves and plasma metabolites and hormone variations. *J. Comp. Physiol. B*, 162, 539–546.

- Bower, N.I.; Taylor, R.G.; Johnston, I.A., 2009. Phasing of muscle gene expression with fasting-induced recovery growth in Atlantic salmon. *Frontiers in Zoology*, v.7, 6-18.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anat. Histol. Embryol.*, 29(5), 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R.F., Pellizzon, C.H., Dal Pai, V., 2003a. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue Cell.*, 35, 179-187.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C., 2003b. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Arch. Fish Mar. Res.*, 50, 149-160.
- Damsgard, B., Arnesen, A.M., 1998. Feeding, growth and social interactions during smolting and seawater acclimation in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 168, 7–16.
- Dubowitz, V., Brooke, M.H., 1973. *Muscle biopsy: A modern approach*. WB Saunders Company, London.
- Edmonson, D.G., Olson, E.N., 1993. Helix loop helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.*, 268, 755-758.
- Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M.; Marcel, J., Vallot, D., 1995. Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture*, 129, 265-297.
- Fauconneau, B., Paboeuf, G., 2000. Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.*, 301, 459-463.
- Fernandez, D.A., Calvo, J., Franklin, C.E., Johnston, I.A., 2000. Muscle fibre types and size distribution in sub-Antarctic notothenoid fishes. *J. Fish Biol.*, 56, 1295-1311.

- Foss, A., Imsland, A.K., 2002. Compensatory growth in the spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen) after a period of limited oxygen supply. *Aquac. Res.*, 33, 1097–1101.
- Gaylord, T. G., Gatlin, D. M. III, 2001. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 194, 337–348.
- Goodman, L.A., 1964. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann. Math. Stat., Ann Arbor*, 35 (2), 716-725.
- Goodman, L.A., 1965. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*, Washington, D.C., 7 (2), 247-254.
- Greer-Walker, M.G., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.*, 7, 295-300.
- Grobet, L., Royo Martin, L.J., Poncelet, D.A., 1997. Deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17, 71-74.
- Hagen, O., Fernandes, J.M.O., Solberg, C., Johnston, I.A., 2009. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 152, 47-53.
- Hayard, R.S. Wang, N., Noltie, D.B., 2000. Group holding impedes compensatory growth of hybrid sunfish. *Aquaculture*, 183, 299-305.
- Heide, A., Foss, A., Stefansson, S.O., Mayer, I., Nordberg, B., Roth, B., Jenssen, M.D., Nortvedt, R., Imsland, A.K., 2006. Compensatory growth and fillet crude composition in juvenile Atlantic halibut: effect of short term starvation periods and subsequent feeding. *Aquaculture*, 261, 109–117.
- Hornick, J.L., Eenaeme, C.V., Gérard, O., Dufasne, I., Istasse, L., 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Dom An Endocrinol.*, 19, 121-132.

- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H., 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickerel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSeuer), and the muskellunge, *E. masquinongy* (Mitchell). *J. Fish Biol.*, 28, 393-401.
- Jobling, M., Jørgensen, E. H., Siikavuopio, S. I., 1993. The influence of previous feeding regime on the compensatory growth response of maturing and immature Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.*, 43, 409–419.
- Jobling, M., Johansen, J.S., 1999. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. *Aquaculture Res.*, 30, 473-478.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotech.*, 7, 576-587.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2006. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding and refeeding in rainbow trout. *Comp Bioch Physiol.*, 144, 119-127.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177, 99-115.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickel, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., Burt, M.L., 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.*, 203, 2539-2552.
- Joulia D., Bernardi H., Garandel V., Rabenoelina F., Vernus B. & Cabello G., 2003. Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Research*, 286, 263-275.
- Ko C.F., Chiou T.T., Chen T.T., Wu J.L., Chen J.C. & Lu J.K., 2006. Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific

- expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Mar Biotech.*, 9, 20-32.
- Kocabas, A.M., Kucuktas, H., Dunham, R.A., Liu, Z., 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Bioch. Biophys.* 1575-1599.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Bioch. Physiol. A*, 110, 3-20.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Witkam, A., Osse, J.W.M., 1994. Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Fish Biol.*, 44, 391-408.
- L.: the mobilisation of reserves and plasma metabolites and hormone variations. *J. Comp. Physiol. B*, 162, 539–546.
- Langley, B., Thomas, M., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.*, 277 (51), 49831-49840.
- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, 58, 823-831.
- Lee, S.J., Hu, S.Y., Gong, H.Y., Chen, M.H.C., Lu, J.K., Wu, J.L., 2009. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effects in transgenic zebrafish. *Bioch Bioph Res Com.*, 387, 766-771.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25, 402-408.

- Luther, P.K., Munro, P.M.G., Squire, J.M., 1995. Muscle ultrastructure in the teleost fish. *Micron*, 26, 431-459.
- Maccatrozo, L., Bargelloni, L., Rodaelli, G., Mascarello, F., Patarnelo, T., 2001. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure and expression pattern. *Mar Biotech.*, 3, 224-230.
- Manceau, M., Gros, J., Savage, K., Thomé, V., McPherron, A., Paterson B. and Marcelle C., 2008. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes Develop.*, 22, 668-681.
- Martínez, M., Winger, P., Guderley, H., Dutil, J.D., 1999. Longitudinal variation of metabolic capacities of cod muscle (*Gadus morhua*): response to starvation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 124-144.
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R., 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol.*, 162, 1135-1147.
- Mcpherron, A. C., Lawler, A.M., Lee, S., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387, 83-90.
- Mcqueen, D.J., Meischke, L., Manthri, S., Anwar, A., Solberg, C., Johnston, I.A., 2010. Characterisation of capn1, capn2-like, capn3 and capn11 genes in Atlantic halibut (*Hyppoglossus hippoglossus* L): Transcriptional regulation across tissues and in skeletal muscle at distinct nutritional states. *Gene*, 453, 45-58.
- Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Bioch. Cell Biol.*, 73, 723-732.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58, 537-544.

- Nicieza, A.G., Metcalfe, N.B., 1997. Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. *Ecology*, 78, 2385–2400.
- Østbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal T., Andersen O., 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur J Bioch.*, 268, 5249-5257.
- Palma, E.H., Takahashi, L.S., Dias, L.T.S., Gimbo, R.Y., Kojima, J.T., Nicodemo, D., 2010. Estratégia alimentar com ciclos de restrição e realimentação no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT. *Ciência Rural de Santa Maria*, 10, 421-426.
- Patrino, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell Tissue Res.*, 331, 643-658.
- Power, D.M., Melo, J., Santos, C.R.A., 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *J.Fish Biol.*, 56, 374-387.
- Rescan, P.Y., Jutel, I., Ralliere, C., 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp. Biolog.*, 204, 3523-3529.
- Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J., 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282, 993-999.
- Roberts, S.B., Goetz, F.W., 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Letters*, 491, 212-216.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., Levine, M.A., 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two

- commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinol.*, 142 (4), 1412-1418.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., Levine, M.A., 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinol.* 142: 1412-1418.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species, in: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, 103-140.
- Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioassays*, 17, 203-209.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity, in: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, 187-250.
- Seiliez, I., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Fricot, A., Vachot, C., Kaushik, S., Tesseraud, S., 2008. Feeding status regulates the polyubiquitination step of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *J.Nut.*, 138, 487-491.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R., 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem.*, 275, 40235-40243.
- Usher, M.L., Stickland, N.C., Thorpe, J.E., 1994. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. *J. Fish Biol.*, 44, 953-964.

- Valente, L.M.P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., Silva, M.W., Oliveira, M.H., Monteiro, R.A.F., Fauconneau, B., 1999. Growth dynamics of White and red muscle fibres in fast and slow growing strains of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 55, 675-691.
- Wang, Y., Cui, Y., Yang, Y., Cai, F., 2000. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mossambicus* X *O. niloticus*, reared in seawater. *Aquaculture*. 189, 101-108.
- Wang, Y., Li, C., Qin, J.G., Han, H., 2009. Cyclical feed deprivation and refeeding fails to enhance compensatory growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture, Res.* 40, 204-210.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.*, 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors, In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, 19-41.
- Weatherley, A., Gill, H., 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia.*, 41, 353-354.
- Weintraub, H., 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, 75, 1241-1244.
- Zar, J.H., 2009. *Biostatistical Analysis*, fourth 5th ed. Prentice-Hall, New Jersey, 944.
- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C., 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *J. Morphol.*, 229, 71-81.

CAPÍTULO 2

CRESCIMENTO COMPENSATÓRIO EM JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*), APÓS RESTRIÇÃO ALIMENTAR E REALIMENTAÇÃO

Resumo

O objetivo do trabalho foi analisar o desempenho e a morfologia do músculo estriado em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem tailandesa durante períodos de jejum e realimentação. Juvenis com peso médio de $0,6 \pm 0,19$ g foram estocados em caixas de polietileno com sistema de fluxo contínuo de água e aeração constante. Os peixes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com três repetições: (AL), controle com alimentação contínua do início ao final do experimento; (JJ), jejum durante todo o período experimental; (J5), jejum por cinco dias e realimentação por 37 dias; (J10), jejum por dez dias e realimentação por 32 dias e (J20), jejum por 20 dias e realimentação por 22 dias. As análises foram realizadas aos 5, 10, 20, e 42 dias. Nestes períodos, foram realizadas biometrias para a avaliação do desempenho e coletadas amostras musculares para a análise morfológica. Os juvenis de tilápia do Nilo submetidos a 5, 10 e 20 dias de jejum mostraram um ganho compensatório; entretanto, somente no grupo que foi submetido a 5 dias de restrição alimentar houve crescimento compensatório total. Os dados do comprimento padrão corroboraram com os valores encontrados na análise do peso. Os grupos AL, J5 e J10 apresentaram maior comprimento dorso lateral do que nos grupos J20 e JJ, indicando um espessamento da massa muscular dorsal. A taxa de crescimento específico foi maior após 10 dias de realimentação, em todos os grupos jejum (J5, J10 e J20). Os resultados de sobrevivência foram influenciados pelo tempo de restrição alimentar. O índice de sobrevivência nos tratamentos AL, J5 e J10 foi de 95% indicando que a dieta forneceu os requerimentos nutricionais mínimos para os peixes nesta fase de crescimento. Nos grupos J20 e JJ, a taxa de sobrevivência foi de 58% e 24%, respectivamente. Em todos os períodos analisados, os grupos AL, J5 e J10 mostraram características morfológicas normais na musculatura, sendo a branca predominante em todos os grupos estudados. A partir de 20 dias de restrição alimentar, os animais dos grupos J20 e JJ apresentaram alterações morfológicas na musculatura, representadas por fibras com formato irregular, fibras hipertróficas e atroficas, e fibras com aspecto hialino, com desorganização e perda de proteínas sarcoplasmáticas. Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que períodos de 5 e 10 dias de restrição alimentar seguidos de realimentação não interferem com o desempenho e com a morfologia do músculo estriado em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Palavras chave: *Oreochromis niloticus*, restrição alimentar, crescimento compensatório, músculo esquelético

1. Introdução

No Brasil, a criação de tilápias teve como marco inicial a introdução de um plantel de *Tilapia rendalli*, na década de 1950, seguida de uma nova linhagem de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) em 1972. Com o objetivo de intensificar a tilapicultura no mundo, várias linhagens foram surgindo, dentre elas a tilápia chitralada, desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio Real de Chitralada na Tailândia. Esta linhagem foi introduzida no Brasil em 1996, a partir de alevinos doados pelo *Asian Institute of Technology* (AIT) e vem passando por melhoramentos genéticos (Zimmermann, 2000). Os primeiros trabalhos avaliando o desempenho das linhagens melhoradas mostraram que a tailandesa apresentou melhores índices de desempenho e principalmente ganho em massa muscular (Boscolo et al., 2001; Leonhardt et al., 2006).

A tilápia é uma espécie versátil para a piscicultura, pois se adapta tanto ao cultivo extensivo, com pouca tecnologia, quanto ao sistema intensivo com alta tecnologia de produção (Meurer et al., 2002). Apresentam inúmeras qualidades zootécnicas, como rusticidade, crescimento rápido, grande adaptação e conversão alimentar e ganho de peso, além de apresentar uma carne branca, de excelente paladar e textura, com ausência de espinhos na musculatura lateral, facilitando assim a técnica de filetagem e sua industrialização (Zanoni et al., 2000; Boscolo et al., 2001).

Trabalhos realizados com restrição alimentar em tilápias mostraram um aumento no ganho de peso com a realimentação, após um período de baixa oferta de alimento (Wang et al., 2000; Barreto et al., 2003; Wang et al., 2009). No entanto, as respostas metabólicas durante a restrição alimentar variam significativamente entre os teleósteos (Sheridan e Mommsen, 1991) e alguns fatores como a idade, estações do ano, condições ambientais e experimentais, temperatura da água e estado nutricional também podem influenciar o metabolismo aumentando ou diminuindo o efeito do jejum no ajuste biológico dos animais (Lovell, 1989; Bastrop et al., 1991).

Os mecanismos que contribuem para o aumento da taxa de crescimento ainda não estão totalmente compreendidos, porém sabe-se que alguns fatores como a ingestão e qualidade do alimento, secreção hormonal, idade e expressão gênica dos animais são fundamentais no desenvolvimento dos tecidos corporais (Souza et al., 2002; Johansen et al., 2006).

O jejum prolongado pode levar à diminuição na síntese de proteínas, aumento do catabolismo e um crescimento mais lento; o restabelecimento de condições favoráveis, após um período de restrição alimentar pode promover um crescimento compensatório, onde as condições normais são restabelecidas. A taxa de crescimento compensatório varia com o estágio de desenvolvimento, o período de jejum e realimentação e a espécie considerada. Após um período de jejum, a realimentação promove uma reversão nos processos de mobilização de reservas corporais para suprir o catabolismo. Somente quando esta condição estiver satisfeita, o destino da dieta será o crescimento (Dobson e Holmes, 1984; Kim e Lovell, 1995; Montserrat et al., 2007; Hagen et al., 2009).

O crescimento compensatório em peixes pode ser parcial, completo ou pode ocorrer sobre compensação. No caso da compensação parcial, os animais não conseguem alcançar o mesmo porte dos animais não submetidos à restrição alimentar, porém apresentam rápido crescimento e melhor conversão alimentar. A compensação total ocorre quando os animais que sofreram restrição alimentar durante algum período, alcançam o peso dos animais que foram continuamente alimentados e a sobre compensação ocorre quando animais de mesma idade, submetidos à restrição alimentar apresentam taxa de crescimento superior ao dos animais que não sofreram privação de alimento (Ali et al., 2003). Um dos principais mecanismos envolvidos no ganho compensatório é a elevação da taxa de ingestão alimentar durante a realimentação, fenômeno conhecido como hiperfagia. É observada nos primeiros dias de realimentação, sendo considerada como responsável pelo crescimento compensatório em muitas espécies de peixes (Jobling e Johansen, 1999; Gurney et al., 2003, 2004).

Como protocolos de restrição alimentar e realimentação podem ser utilizados como estratégias para maximizar a taxa de crescimento somático dos peixes, um dos mais importantes fatores para o sucesso da aquicultura, a hipótese do presente estudo é que períodos de jejum seguidos de realimentação podem interferir com o desempenho em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem tailandesa. O objetivo do trabalho foi analisar o desempenho e a morfologia do músculo estriado em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem tailandesa durante períodos de jejum e realimentação.

2. Material e Métodos

2.1 Instalações e condições experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP. Foram utilizados 1.500 juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem tailandesa provenientes da Piscicultura XV de novembro, São João da Boa Vista, SP. Os peixes com média de peso corporal de $0,6 \pm 0,19$ g e comprimento total $35,6 \pm 29,4$ mm foram estocados em 15 tanques de polietileno com 150 litros de água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo com aeração artificial constante. Os parâmetros físico-químicos da água (temperatura) foram aferidos diariamente, o pH e oxigênio dissolvido, mensurados semanalmente. Os tanques foram sifonados semanalmente, para manter uma boa qualidade da água.

Os peixes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com três repetições: (AL), controle com alimentação contínua do início ao término do experimento; (J5), jejum por cinco dias e realimentação por 37 dias; (J10), jejum por dez dias e realimentação por 32 dias e (J20), jejum por 20 dias e realimentação por 22 dias e (JJ), jejum durante todo o período experimental.

2.2 Manejo nutricional e avaliação do crescimento

Os animais foram alimentados com ração comercial farelada e extrusada, com quantidade de proteína bruta (PB) ideal para cada fase de crescimento. A ração farelada com 55% proteína bruta foi oferecida durante 30 dias sendo gradativamente substituída pela ração extrusada com 40% de proteína bruta, que foi fornecida por mais 12 dias.

A dieta foi oferecida da seguinte maneira: grupo AL foi alimentado durante todo o período experimental com ração comercial farelada com 55% proteína bruta até o 30º dia e ração extrusada do 31º ao 42º dia. O grupo J5, J10 e J20 sofreram restrição alimentar até o 5º, 10º e 20º dia respectivamente, com posterior realimentação utilizando ração comercial com 55% PB até o 30º dia e ração extrusada do 31º ao 42º dia; o grupo jejum sofreu restrição alimentar durante todo o período experimental. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia às 9:00, 14:00 e 17:00 horas até a saciedade aparente.

Uma biometria inicial dos peixes foi realizada com cerca de 10% do total de peixes utilizados no experimento e as demais análises foram realizadas aos 5, 10, 20 e 42 dias.

Nestes períodos, foram analisados o peso individual (g), comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e comprimento dorso lateral (mm) e a conversão alimentar aparente (consumo aparente da dieta/ganho de peso) de todos os tratamentos. Os animais foram anestesiados com benzocaína (0,1g.L⁻¹ água) para coleta de amostras de tecido muscular (n=7 por grupo) para a análise morfométrica das fibras musculares.

Com os resultados de peso inicial, intermediários e final de todos os tratamentos, calculou-se a taxa de crescimento específico (TCE) dos indivíduos (Kestmont e Stalmans, 1992), calculado pela seguinte fórmula:

$$TCE = \frac{(\text{LnPf} - \text{LnCi})}{\Delta t} \times 100$$

Onde:

LnPf = logaritmo do comprimento final

LnCi = logaritmo do comprimento inicial

Δt = duração em dias entre as biometrias

Ao final do experimento, foi determinada a taxa de sobrevivência de todos os grupos experimentais que foi transformada em $y = \arcsin \sqrt{x/100}$, onde x indica o valor da porcentagem da sobrevivência de cada grupo experimental.

$$TS\% = \frac{Nf}{Ni - Nc} \times 100$$

Onde:

TS = taxa de sobrevivência

Nf = número de juvenis no final do experimento

Ni = número de juvenis do início

Nc = número de juvenis coletados para biometrias

Para análise morfológica, amostras de tecido muscular foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 8% e glutaraldeído 2,5% em PBS). Após 24 horas, o material foi lavado em PBS, desidratado em etanol (concentrações crescentes de 50 a 100%) e submetidos

à pré-infiltração com solução de glicol-metacrilato e ativador (embedding kit – Leica) e etanol 95% (1:1, v/v), durante 4 horas. Na sequência, as amostras foram incluídas em resina (glicol-metacrilato e endurecedor) e permaneceram em estufa 37°C durante 24 horas. Cortes histológicos com espessura de 4 µm foram corados com Hematoxilina-eosina para a avaliação do padrão morfológico das fibras musculares.

2.3 Análise estatística

Os dados de desempenho foram submetidos à análise de variância não paramétrica para um modelo com dois fatores, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn, considerando o nível de 5% de significância (Zar, 2009).

3. Resultados e Discussão

3.1 Desempenho e sobrevivência dos juvenis

Durante o período experimental, os valores médios da qualidade da água dos tanques foram: temperatura $26,7 \pm 0,6$ °C, pH $8,3 \pm 0,55$ e oxigênio dissolvido $6,5 \pm 0,17$ mg/L, valores considerados ideais para a criação de tilápias (Kubtiza, 2000).

Aos 5 dias do experimento, todos os grupos experimentais apresentaram peso semelhante. Aos 10 dias, o peso dos grupos AL, J5, J10 e JJ foi semelhante; em J20 o peso menor. Aos 20 dias, o peso dos grupos AL, J5 e J10 não diferiu entre si; o peso dos grupos J20 e JJ foi inferior ao do grupo AL. Ao final do experimento, o peso dos animais dos grupos AL e J5 foi similar; J10 e J20 apresentaram peso similar e o peso do grupo JJ não diferiu do peso do grupo J20 (Tabela 1).

Tabela 1. Valores medianos de peso (g) de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a períodos de jejum e realimentação.

Variável	Grupos	Tempo (dias) Avaliação			
		5	10	20	42
Peso (g)	AL	0,83 (0,78;1,15) a	1,20 (1,0;1,51) b	2,34 (2,15;2,7) b	5,28 (5,16;5,56) c
	J5	0,52 (0,5; 0,67) a	0,81 (0,5;0,57) ab	1,56 (1,23;2,0) ab	4,19 (3,19;4,9) c
	J10	0,56 (0,45;0,64) a	0,52 (0,48;0,55) ab	1,01 (0,95;1,2) ab	2,63 (2,18;3,8) b
	J20	0,61 (0,56;0,62) a	0,45(0,5;0,56) a	0,49 (0,46;0,58) a	1,64 (1,45;2,6) ab
	JJ	0,56 (0,49;0,58) a	0,53(0,41;0,5) ab	0,50 (0,46;0,57) a	0,57 (0,5;0,73) a

Medianas seguidas de mesma letra na vertical não diferem entre si pela análise de variância não paramétrica com dois fatores, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$). Grupos: AL, alimentado; JJ: jejum durante todo o período experimental; J5: jejum de 5 dias seguido de realimentação; J10: jejum de 10 dias seguido de realimentação; J20: jejum de 20 dias seguido de realimentação.

O crescimento compensatório após um período de supressão alimentar tem sido descrito em várias espécies de teleósteos (Ali et al., 2003). Palma et al., (2010), também observaram crescimento compensatório em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem GIFT submetidas à ciclos de cinco dias de alimentação e dois dias de restrição alimentar. Os animais submetidos ao jejum de dois dias e alimentação de cinco dias apresentaram ganho de peso e comprimento total semelhante ao grupo controle que foi alimentado durante 63 dias de experimento. Os autores sugeriram que esta seria uma boa estratégia alimentar para diminuir os custos com a produção. No entanto, em híbridos de juvenis de tilápia (*O. mossambicus* x *O. niloticus*), submetidos à restrição alimentar de uma, duas e quatro semanas, seguidos de quatro semanas de realimentação o peso dos animais submetidos a duas e quatro semanas de jejum foi menor que os animais controle, apesar da ocorrência da hiperfagia nos primeiros dias de realimentação. O crescimento compensatório foi observado em todos os tratamentos, porém apenas nos animais que passaram por restrição alimentar de uma semana, seguido de realimentação por quatro semanas apresentaram crescimento compensatório total, enquanto que nos animais que passaram por duas e quatro semanas de jejum e quatro semanas de realimentação, o crescimento compensatório foi parcial. A inabilidade da tilápia em recuperar o peso corporal, mesmo após quatro semanas de realimentação pode ter sido resultado do período severo de privação alimentar que resultou em maior perda de peso e menor ganho compensatório (Wang et al., 2000).

Em nosso estudo, os juvenis de tilápia do Nilo submetidos a 5, 10 e 20 dias de jejum mostraram um ganho compensatório; entretanto, somente no grupo que foi submetido a cinco

dias de restrição alimentar, houve crescimento compensatório total, indicando que curtos períodos de jejum não interferem com o desempenho da tilápia nesta fase do crescimento.

Por outro lado, Takahashi et al., (2010), avaliando ciclos curtos, porém repetitivos de jejum de três dias seguidos de 3 dias de realimentação controlada ou até a saciedade aparente durante 36 dias, em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), observaram que os animais que passaram por três dias de realimentação até a saciedade aparente apresentaram hiperfagia nos dois primeiros dias, enquanto que o grupo controle e com realimentação controlada apresentaram consumo alimentar constante. Os animais que tiveram a realimentação controlada e até a saciedade aparente apresentaram crescimento compensatório parcial, mostrando que a realimentação não foi capaz de reverter em significativo ganho de peso nos grupos jejum.

Há várias hipóteses que tentam explicar a elevada taxa de crescimento que normalmente ocorre durante o ganho compensatório. Uma delas é que há um aumento no consumo de alimento levando a taxa de crescimento mais elevado (Hayward et al., 2000); outra é que a resposta hormonal durante e após o período de restrição alimentar (jejum) impulsiona o crescimento (Gaylord et al., 2001). O crescimento dos peixes é regulado por componentes do eixo hipófise-tecido hepático-somático (Donaldson et al., 1979). O GH secretado pela hipófise estimula o fígado a sintetizar e liberar fatores de crescimento como o IGF que tem efeito direto sobre os tecidos somáticos, resultando em crescimento. De fato, em estudo realizado na tilápia (*O. mossambicus*), Fox et al., (2010) mostraram que os níveis plasmáticos de IGF-I, bem como a expressão gênica do IGF-I muscular foram menores no grupo jejum de quatro semanas do que nos animais controle, sugerindo um estado catabólico. Os níveis plasmáticos de GH não foram afetados pelo jejum ou realimentação. Após uma e duas semanas de realimentação, houve ganho compensatório e os níveis plasmáticos de IGF-I, bem como a expressão gênica do IGF-I muscular, respectivamente, aumentaram, indicando que o IGF-I é sensível ao estado nutricional da tilápia.

Após 42 dias de experimento, não houve diferença no comprimento total dos grupos J5 e J10 em relação ao grupo AL. Entretanto, os grupos J20 e JJ apresentaram diferença em relação aos grupo AL e J5, sendo menor. Já o comprimento padrão do grupo J5 não apresentou diferença em relação ao grupo AL, porém nos grupos J10, J20 e JJ o comprimento padrão diferiu em relação ao grupo controle AL, sendo menor ($p < 0,05$). Os dados do comprimento padrão corroboram com os valores encontrados na análise do peso. Em relação ao comprimento dorso lateral, os grupos AL, J5 e J10 apresentaram maior comprimento e não

diferiram entre si; nos grupos J20 e JJ, as medidas foram similares, porém menores que as dos demais grupos (Figura 1). Esse resultado mostra um espessamento da massa muscular dorsal ou epiaxial nos peixes destes grupos, fenômeno que ocorre durante o crescimento muscular (Almeida et al., 2008, 2010). Nos grupos J5 e J10, o espessamento muscular que ocorreu durante a realimentação indica a reversão do estado catabólico do músculo e aumento da síntese protéica.

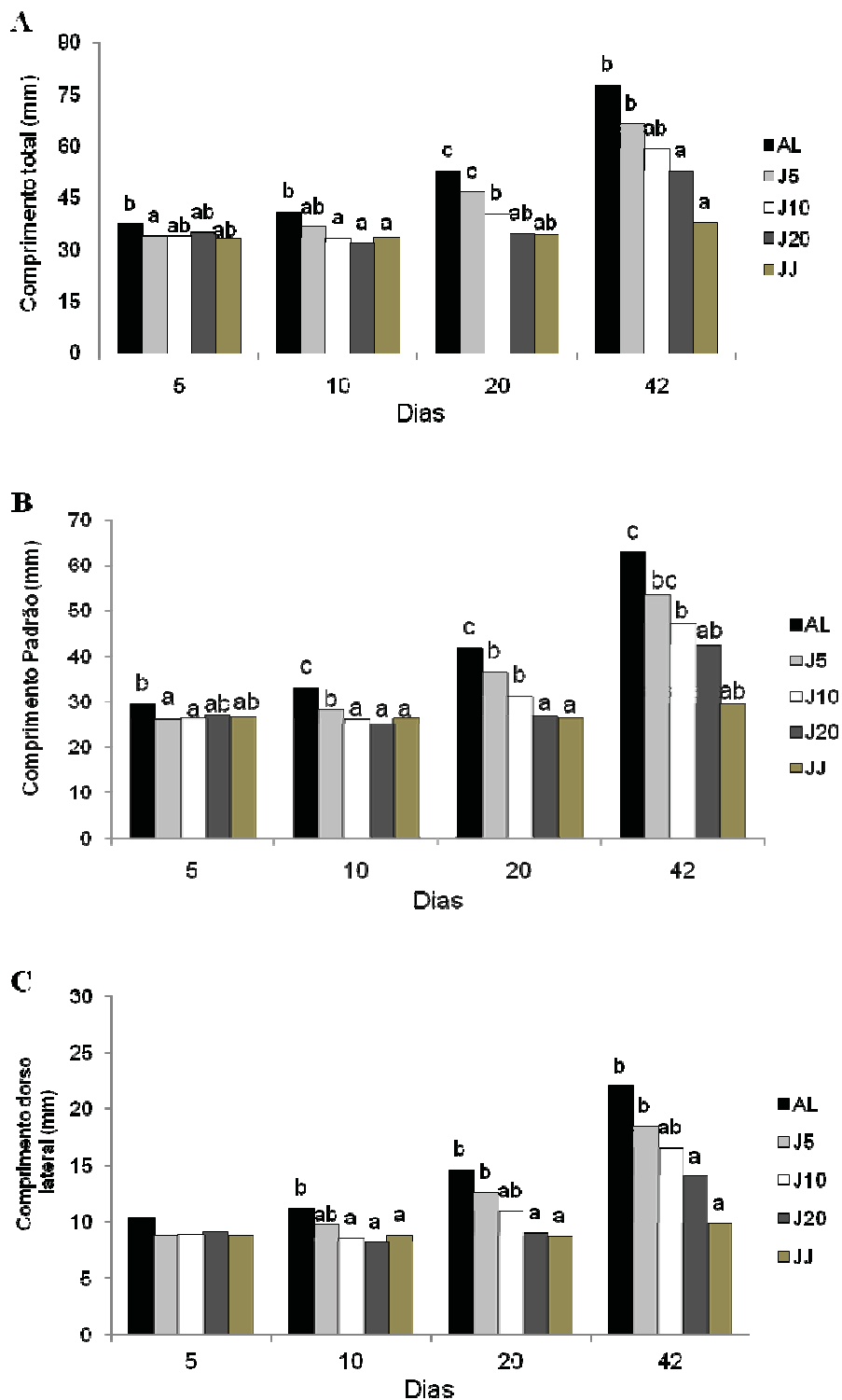


Figura 1. Valores medianos dos parâmetros: A: comprimento total (mm); B: comprimento padrão (mm) e C: comprimento dorso lateral (mm) de juvenis de tilápia do Nilo nos grupos estudados. Medianas seguidas de mesma letra não diferem entre si pela análise de variância não paramétrica para dois fatores, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$).

Aos 10 dias, a taxa de crescimento específico nos grupos J5 não diferiu em relação ao grupo AL. Os grupos J10, J20 e JJ foram menores diferindo do grupo AL. Considerando o período de 10 a 30 dias, AL, J5 e J10 não diferiram entre si; no período 10-20 dias, os grupos J20 e JJ apresentaram menor taxa de crescimento específico, uma vez que, estavam em jejum. No período de 20-30 dias, o grupo J20 apresentou a maior taxa de crescimento, pois estava sendo alimentado (10 dias de realimentação). Ao final do experimento, os grupos AL, J5, J10 e J20 não diferiram entre si em relação à taxa de crescimento; o grupo JJ apresentou o menor valor em relação, aos demais grupos, embora estatisticamente diferiu somente do grupo J10 (Tabela 2). A análise dos dados mostra que após a realimentação, a taxa de crescimento foi maior após 10 dias de realimentação, em todos os grupos jejum (J5, J10 e J20). É provável que neste período o aumento do consumo alimentar tenha favorecido a taxa de crescimento específico.

Tabela 2. Taxa de crescimento específico dos juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a restrição alimentar e realimentação.

Grupos	Taxa de Crescimento Específico, % dia ⁻¹			
	0-10dias	10-20dias	20-30dias	30-42dias
AL	6.93 b	6.93 b	5.06 ab	1.69 ab
J5	3.00 ab	6.62 b	6.83 ab	0.84 ab
J10	-1.43 a	7.17 b	5.58 ab	2.89 b
J20	-2.88 a	1.69 ab	9.03 b	2.23 ab
JJ	-1,24 a	-0.58 a	0,64 a	0.41 a

Letras minúsculas na vertical de mesma letra não diferem entre si pela análise de variância não paramétrica com dois fatores, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($p > 0,05$). AL: alimentado; JJ: jejum durante o período experimental; J5: jejum de 5 dias seguido de realimentação; J10: jejum de 10 dias seguido de realimentação; J20: jejum de 20 dias seguido de realimentação.

Os resultados de sobrevivência foram influenciados pelo tempo de restrição alimentar. O alto índice de sobrevivência encontrado nos tratamentos AL, J5 e J10 (95%) indica que a dieta forneceu os requerimentos nutricionais mínimos para os peixes nesta fase de crescimento. Entretanto, nos grupos J20 e JJ, que sofreram jejum prolongado, a taxa de sobrevivência foi de 58% para o grupo J20 e 24% para o grupo JJ; isso demonstra que o tempo de restrição alimentar promoveu o catabolismo protéico e no grupo J20, o período de realimentação de 22 dias não foi suficiente para reverter o estado catabólico dos animais. (Figura 2).

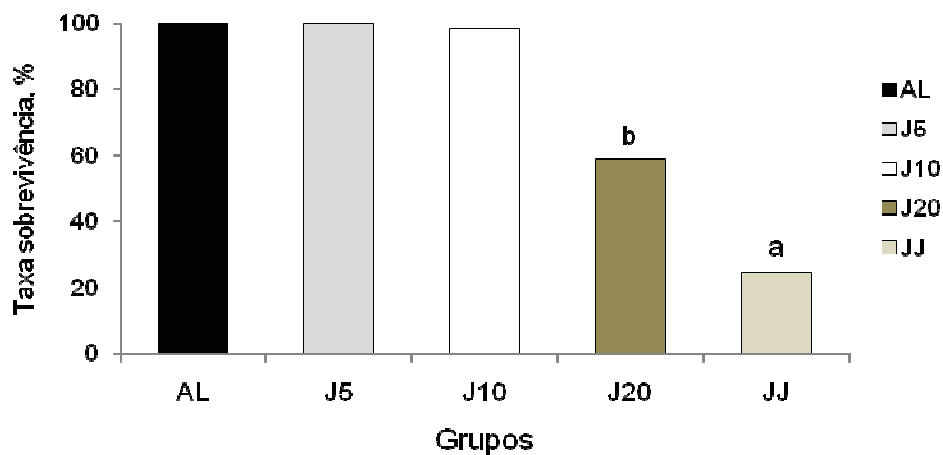


Figura 2. Taxa de sobrevivência dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos a períodos de jejum e realimentação. ($p < 0,05$) AL: alimentado durante todo período experimental; J5: jejum de 5 dias seguido de realimentação; J10: jejum de 10 dias seguido de realimentação; J20: jejum de 20 dias seguido de realimentação e JJ: jejum durante todo o período experimental;

3.2 Análise morfológica das fibras musculares

Em todos os períodos analisados, os grupos AL, J5, J10 e J20 mostraram características morfológicas normais na musculatura. A musculatura branca foi predominante em todos os grupos estudados, sendo constituída por fibras poligonais ou arredondadas separadas por um fino septo de tecido conjuntivo, o endomísio. As fibras musculares apresentaram diâmetros variáveis (grandes e pequenas), distribuídas em um padrão mosaico. A partir de 20 dias de restrição alimentar, os animais do grupo J20 e JJ apresentaram alterações morfológicas nas fibras musculares. Foram evidenciadas fibras com formato irregular, fibras hipertróficas e atroficas, e fibras com aspecto hialino (claro), com desorganização e perda de proteínas sarcoplasmáticas (Figura 3).

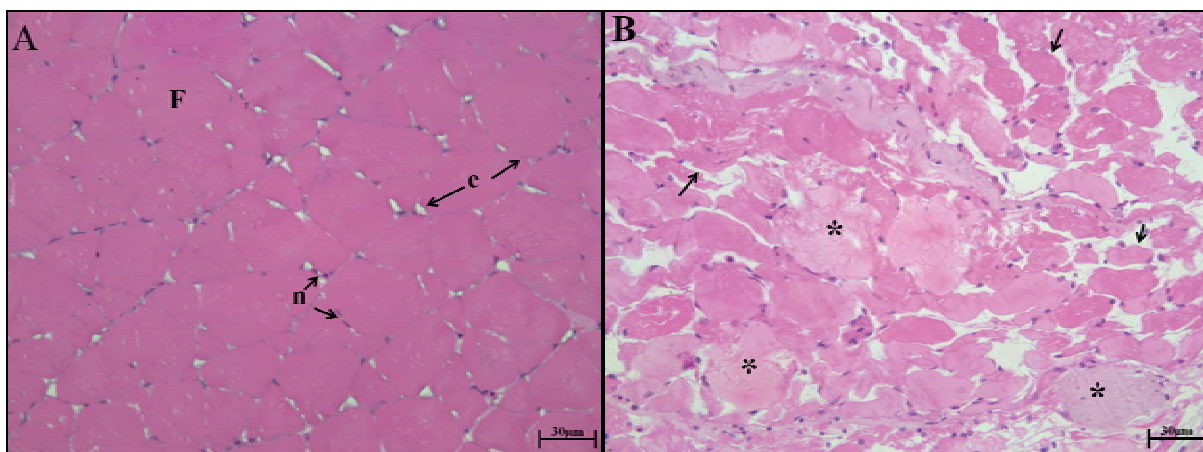


Figura 3. Fotomicrografia em corte transversal do tecido muscular de juvenis de tilápia do Nilo, aos 42 dias do experimento. A: grupo AL com padrão normal do músculo. Fibras musculares arredondadas ou poligonais (F), núcleos periféricos (n), endomísio (e). B: grupo JJ, padrão alterado do músculo com fibras atróficas (seta), fibras com formato irregular e perda de proteínas no sarcoplasma (*). Coloração Hematoxilina/eosina. Aumento 40x, Barra = 30 µm.

Estes resultados mostram que em juvenis de tilápias do Nilo, os períodos de 20 e 42 dias de restrição alimentar promoveram alterações na morfologia das fibras musculares nos grupos J20 e JJ, indicativas de degradação de proteínas sarcoplasmáticas, pela falta de nutrientes ou pela não recuperação após o período mais prolongado de jejum (20 dias).

Poucos estudos relatam o efeito da restrição alimentar e a re-alimentação sobre a morfofisiologia das fibras musculares nos peixes. Em trabalhos com adultos de matrinxãs (*Brycon cephalus*) submetidos a ciclos de restrição alimentar de dois dias jejum e três dias de realimentação durante um ano, os resultados mostraram que o jejum não afetou o crescimento, a composição dos músculos vermelho e branco e a porcentagem de lipídio muscular mostrando que a restrição alimentar não altera a dinâmica dos nutrientes nos tecidos musculares do matrinxã (Carvalho e Urbinati, 2005). O mesmo resultado foi encontrado em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), após ciclos repetitivos de três dias de restrição alimentar e três dias seguidos de realimentação controlada ou até a saciedade aparente durante 36 dias. Os níveis de lipídio muscular nos grupos que passaram por ciclos de restrição alimentar foram inferiores ao grupo controle, porém não significativo. Os animais que passaram por jejum de três dias seguido por três dias de realimentação até a saciedade aparente apresentaram hiperfagia nos dois primeiros dias de realimentação, enquanto os grupos controle e jejum com realimentação controlada apresentaram consumo alimentar constante. Os animais que passaram por ciclos de restrição alimentar e realimentação apresentaram crescimento compensatório parcial, mostrando que em ambos os tratamentos

com restrição alimentar e realimentação controlada ou até a saciedade aparente não mostraram diferenças em 36 dias de experimento e o consumo alimentarem nos dois primeiros dias de realimentação não foi capaz de reverter em significativo ganho de peso (Takahashi et al., 2010).

Durante o jejum, para compensar a falta de nutrientes, ocorre uma diminuição do metabolismo basal bem como alteração no metabolismo; há a ativação das vias destinadas a obter energia a partir de fontes de armazenamento e inibição das vias destinadas a obter energia a partir da ingestão de alimentos (Salway, 2004). Essas alterações metabólicas são controladas pelo sistema endócrino, porém, os mecanismos envolvidos são complexos e pouco elucidados (Mommsen, 2002).

Estudos *in vitro* tem demonstrado que o sistema endócrino pode estar envolvido com a regulação do catabolismo muscular em zebra fish (Pozios et al., 2001). De fato, estudos *in vivo* e *in vitro* realizados em modelos de mamíferos e aves mostraram que a expressão de genes do sistema de degradação de proteínas (Ubiquitina-proteossoma) é fortemente regulada pelo IGF-1 e também por nutrientes (Sandri et al., 2004; Sacheck et al., 2004).

Seiliez et al., (2008) mostraram, em juvenis de truta submetidos a 14 dias de jejum, proteólise muscular pela ativação de proteínas do sistema ubiquitina-proteossoma. Com 24 horas de realimentação, os autores observaram significativa diminuição na expressão destas proteínas. É possível que, no nosso experimento, o sistema ubiquitina-proteossoma esteja envolvido no controle da degradação de proteínas musculares em J20 e JJ. Nos grupos J5 e J10, é provável que tenha ocorrido a inibição desta via de degradação ou a via anabólica pode ter sido mais eficiente nestes grupos. Os resultados da análise morfológica corroboram com os dados de desempenho, indicando que 5 e 10 dias de jejum não comprometem o desempenho em juvenis de tilápia do Nilo.

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que períodos de 5 e 10 dias de restrição alimentar seguidos de realimentação não afetam o desempenho, a morfologia e o crescimento muscular em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada. A compreensão dos efeitos provocados pela restrição alimentar pode servir como estratégias alternativas de alimentação no crescimento muscular em peixes, para minimizar os custos de produção.

Referências Bibliográficas

Ali M, Nicieza A, Wootton R.J. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*. 2003; 4: 147-190.

Barreto R.E, Moreira P.S.A, Carvalho, R.F. Sex-specific compensatory growth in food deprived Nile tilapia. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36: 477-483.

Bastrop R, Spangerberg R, Jurss K. Biochemical adaptation of juvenile carpa (*Cyprinus carpio* L) to food deprivation. *Comp Bioch Physiol*. 1991; 9: 143-149.

Boscolo W. R, Hayashi C, Soares C. M, Furuya W. M, Meurer F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, na fase inicial e de crescimento. *Rev Bras Zoot*. 2001; 30: 1391-1396.

Carvalho E.G,Urbinati E.C. Crescimento, desenvolvimento gonadal e composição muscular de matrinxãs (*Brycon cephalus*) submetidos à restrição alimentar e realimentação durante um ano. *Ciência Rural, Santa Maria*. 2005; 35: 897-902.

Dobson S.H, Holmes R.M, 1984. Compensatory growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Biol*. 1984; 25: 649-656.

Donaldson E.M, Fagerlung U.H.M, Higgs D.A, McBride J.R. Hormonal enhancement of growth in fish. In: *Fish Physiology*. Academic Press, San Diego. 1979; 8: 455–597.

Gaylord T. G, Gatlin D.M. III. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 2001; 194: 337–348.

Gurney W.S.C, Jones W, Veitch A.R, Nisbet R.M. Resource allocation, hyperphagia and compensatory growth in juveniles. *Ecology*. 2003; 84: 2777-2787.

Gurney W.S.C, Veitch A.R, Nisbet R.M. Resource allocation, hyperphagia and compensatory growth. *Soc Math Biol.* 2004; 66: 1731-1753.

Hagen O, Fernandes J.M.O, Solberg C, Johnston I.A. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Comp Biochem Physiol.* 2009; 152: 47-53.

Hayward R.S, Wang N, Noltie, D.B. Group holding impedes compensatory growth of hybrid sunfish. *Aquaculture.* 2000; 183: 299-305.

Jobling M, Johansen, J.S. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. *Aquaculture Res.* 1999; 30: 473-478.

Kestmont P, Stalmans, J. M. Initial feeding of European minnow larvae, *Phonixus phonixus* L. influence of diet and feeding level. *Aquaculture, Amsterdam.* 1992; 104: 327-340.

Kim M.K, Lovell, R.T. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Aquaculture.* 1995; 125: 285-293.

Kubitza, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 2000, 285.

Leonhardt J. H, Filho C. M, Frossard H, Moreno A. M. Características morfométricas, rendimento e composição do filé de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, da linhagem tailandesa, local e do cruzamento de ambas. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina.* 2006; 27: 125-132.

Lovell R.T. Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, 260: 1989.

Meurer F, Hayashi C, Boscolo W.R, Soares C.M. Lipídeos na Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *Rev Bras Zoot.* 2002; 31: 566-573.

Mommsen T.P, Silverstein J.T, Plisetskaya E.M, Whittaker L.J, Whittaker J, Conlon J.M. Two insulins from channel catfish: purification, structures, receptor binding and cDNA sequences. *Fish Physiol. Biochem.* 2002; 25: 61–70.

Montserrat N, Gabillard J.C, Capilla E, Navarro M.I, Gutiérrez J. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 2007; 150: 462-472.

Palma E.H, Takahashi L.S, Dias L.T.S, Gimbo R.Y, Kojima J.T, Nicodemo D. Estratégia alimentar com ciclos de restrição e realimentação no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT. *Ciência Rural, Santa Maria.* 2010; 40: 421-426.

Pozios KC, Ding J, Degger B, Upton Z, Duan C. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinasesignaling pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 280: 1230–1239.

Salway J.G. *Metabolism at a Glance*, 3rd ed. Blackwell Publishing Ltd., Malden, MA. 2004.

Seilliez I, Panserat S, Skiba-Cassy S, Fricot A, Vachot C, Kaushik S, Tesseraud S. Feeding status regulates the polyubiquitination step of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *J.Nutr.* 2008; 138: 487-491.

Sheridan M.A, Mommsen T.P. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol.* 1991; 81: 473-483.

Souza V.L, Urbinati E.C, Gonçalves D.C, Silva P.C. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. *Acta Scientiarum, Maringá.* 2002; 24: 533-540.

Takahashi L.S, Biller J.D, Criscuolo-Urbinati E, Urbinati E.C. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2010; 1-8.

Wang Y, Cui Y, Yang Y, Cai F. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mossambicus* X *O. niloticus*, reared in seawater. *Aquaculture.* 2000; 189: 101-108.

Wang Y, Li C, Qin J.G, Han H. Cyclical feed deprivation and refeeding fails to enhance compensatory growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquac Res.* 2009; 40: 204-210.

Zanoni M.A, Filho M.C, Leonhardt J.H. Performance de crescimento de diferentes linhagens de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757), em gaiolas. *Acta Scientiarum, Maringá.* 2000; 22: 683-687.

Zar J. H. Biostatistical analysis. Editora prentice – Hall: New Jersey, 5rd ed. 2009.

Zimmermann S. O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. *Pan Aquicult, Rio de Janeiro.* 2000; 10: 15-19.