



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL



**CRESCIMENTO COMPENSATÓRIO EM  
LINHAGENS DE TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus* L.) CULTIVADAS EM  
AMBIENTE RESFRIADO: MORFOLOGIA  
MUSCULAR E EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO CRESCIMENTO  
MUSCULAR.**

**Rondinelle Artur Simões Salomão**  
Biólogo

Jaboticabal – São Paulo.  
2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**



**CRESCIMENTO COMPENSATÓRIO EM  
LINHAGENS DE TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus* L.) CULTIVADAS EM  
AMBIENTE RESFRIADO: MORFOLOGIA  
MUSCULAR E EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO CRESCIMENTO  
MUSCULAR.**

**Rondinelle Artur Simões Salomão**

**Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – graduação em Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo.  
2014

Salomão, Rondinelle Artur Simões  
S171c Crescimento compensatório em linhagens de tilápia do nilo  
(*Oreochromis niloticus* L.) cultivadas em ambiente resfriado :  
morfologia muscular e expressão de genes relacionados ao  
crescimento muscular / Rondinelle Artur Simões Salomão. --  
Jaboticabal, 2014  
viii, 47 p. ; il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro  
de Aquicultura, 2014

Orientadora: Maeli Dal Pai

Banca examinadora: Diogo Teruo Hashimoto, Fernanda Antunes  
Alves da Costa

Bibliografia

1. Tilápia do Nilo. 2. Crescimento compensatório. 3. Temperatura.  
4. Músculo esquelético. 5. Fatores reguladores miogênicos. 6.  
Miostatina. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

*As pessoas esperam*

*Toda semana pela sexta-feira,*

*Todo ano pelo verão e*

*Toda vida pela felicidade.*

*Faça diferente, transforme todos os dias em sextas-feiras, aproveite as quatro estações e não espere a vida passar para ser feliz!*

*Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto.*

*A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender (Autoria desconhecida).*

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus pais Artur Bernardes Simões Salomão  
e Cleonice de Souza Salomão que sempre  
estiveram do meu lado, me apoiando e me  
incentivando durante todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Maeli Dal Pai, pela amizade, competência e acima de tudo pela paciência, agradeço também por ter me dado à oportunidade de ser seu aluno e de ter confiado em mim.

Ao Dr. Vander Bruno dos Santos, por todos esses anos de amizade e companheirismo, pela competência e pelos ensinamentos.

As minhas irmãs Danielle e Grazielle Salomão, aos meus cunhados Elton Pinheiro Salvador e Lucas Medeiros, e aos meus sobrinhos que tanto amo Eduarda (dudinha) e Miguel (lindão), que foram meus suportes fora do mundo acadêmico.

A toda família Ricci e Fama, pela amizade e pelos momentos de descontrações. Em especial a Angela e Carlinhos, e a Ana Carolina Ricci Fama, pela paciência, companheirismo e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos.

Ao Edson Assunção Mareco, pela amizade e por ter sido meu “irmão” durante todo esse tempo.

A minha amiga Rosimeire (rorose), por todos os momentos juntos, pelos aconselhamentos e por ter sido uma pessoa especial durante todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético: Ivan, Juarez, Jopa, Jason, Léo, Rodrigo, Bruno, Thiago, Fer Carani, Raquel, Tata, Luana, Aninha, Flávia, Artur e Warlen pelo convívio e pelos momentos de risadas.

Aos técnicos de laboratório, José Eduardo, Ricardo e Vivian por todos os momentos que passamos juntos, pelo profissionalismo e pela amizade.

Aos amigos dos demais laboratórios do Departamento de Morfologia.

A todos os meus amigos e companheiros da graduação, em especial ao Bruno Melegari e ao Thiago Nery.

Aos companheiros de República da K-Zona Rural, pela amizade, companheirismo e por terem me ensinado o verdadeiro significado de fraternidade.

A todos os amigos da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pelos momentos juntos e pelo companheirismo.

Aos membros da banca, por aceitarem fazer parte deste momento tão especial na minha vida.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pela disposição em sempre querer ajudar, em especial ao David pelo profissionalismo e pela paciência.

Agradeço também a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte deste momento, e sempre torceram pela minha vitória.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado e São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2011/16076-0).

Meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. Musculatura estriada esquelética em peixes .....	2
2.2. Desenvolvimento do tecido muscular em peixes .....	5
2.3. Crescimento de fibras musculares em peixes.....	7
2.4. Fatores reguladores miogênicos .....	9
2.5. Miostatina.....	11
2.6. Influência dos fatores extrínsecos no crescimento do músculo esquelético .....	12
2.7. Crescimento Compensatório .....	15
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1. Delineamento experimental .....	17
4.2. Análise do desempenho e avaliação do crescimento .....	18
4.3. Análise morfológica e morfométrica .....	19
4.4. Análise da expressão gênica da MyoD, Miogenina e da Miostatina .....	21
4.5. Extração do RNA total .....	21
4.6. Tratamento do RNA com DNase .....	22
4.7. Transcrição Reversa (RT) .....	23
4.8. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	23
4.9. Análise dos dados.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1. Condições experimentais .....	25
5.2. Desempenho e avaliação do crescimento.....	26
5.3. Análise morfológica do crescimento muscular .....	30
5.4. Análise da expressão gênica: MyoD, Miogenina e Miostatina.....	34
6. CONCLUSÃO.....	39
7. AGRADECIMENTOS .....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40



**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Razões de absorvância e concentração do RNA total extraído das amostras de músculo branco de exemplares de alevinos de tilápias do Nilo.....

**Tabela 2.** Descrição do gene, sequência do primer, tamanho e eficiência da amplificação.....**24**

**Tabela 3.** Valores médios de oxigênio dissolvido (mg/L), pH, alcalinidade (mg/L), dureza (mg/L) e concentrações máximas de amônia (mg/L), nitrito (mg/L) e nitrato (mg/L) da água de cultivo dos peixes nas diferentes temperaturas.....**26**

**Tabela 4.** Média e desvio padrão do peso corporal (g) das linhagens de tilápias do Nilo dos tratamentos T1 e T2 aos 30 dias do experimento.....**27**

**Tabela 5.** Médias e desvio padrão do peso corporal das linhagens de tilápias do Nilo aos 150 dias, inicialmente submetidas ou não a temperatura de 22°C por 30 dias.....**28**

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** (A) Desenho esquemático demonstrando a região da musculatura lateral, (B) Formato de um miômero de peixe teleósteo. Adaptado de Altringham e Ellerby, 1999. (C) Esquema demonstrando o movimento de natação ondulatória que tem relação direta com a disposição dos miômeros. Adaptado de Müller et al., 2001.....**3**
- FIGURA 2.** (A) Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), após reação de NADH-TR. demonstrando os compartimentos musculares vermelho (v), intermediário (i) e branco (b) adaptado de Aguiar et al., 2005. (B) Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), coloração em HE, demonstrando as fibras musculares distribuídas nos compartimentos vermelho (v), intermediário (i) e branco (b).....**5**
- FIGURA 3.** Esquemas de secções transversais do músculo esquelético durante a miogênese. (A) Células adaxiais flanqueiam a notocorda (N) e células pré-somíticas laterais apresentam disposição lateral em relação às células adaxiais. As setas menores indicam que as células adaxiais migrarão, entre as células laterais pré-somíticas, em direção à superfície do miótomo. (B) As células adaxiais na superfície do miótomo dão origem aos miotubos multinucleados, formando as fibras vermelhas (FV), enquanto que as demais células darão origem as fibras brancas (FB). TN: tubo neural, N: notocorda (Adaptado de Johnston e Hall, 2004).....**6**
- FIGURA 4.** Esquema demonstrativo dos principais eventos que ocorrem durante a embriogênese do músculo estriado. (Adaptado de Watabe, 1999).....**6**
- FIGURA 5.** Esquema demonstrativo da localização das células satélites na fibra muscular esquelética. (Adaptado de Buckingham, 2007).....**7**

**FIGURA 6.** Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia. A população de Células Satélites contribui para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético. (Adaptado de Johnston, 1999).....**8**

**FIGURA 7.** Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo dímero do fator transcricional da família *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) MyoD (Ma *et al.*, 1994)..**10**

**FIGURA 8.** Esquema mostrando a formação de uma fibra muscular (miofibra) durante a miogênese, sob o controle dos fatores de regulação miogênica. Células precursoras miogênicas, presentes nos somitos, tornam-se mioblastos, que iniciam a proliferação. Esses eventos são controlados pela expressão dos MRFs primários MyoD e Myf-5. A expressão de Miogenina e MRF4 controla a diferenciação dos mioblastos em miotubos que, posteriormente, diferenciam-se para formar as miofibras maduras (Adaptado de Watabe, 1999).....**11**

**FIGURA 9.** Fatores extrínsecos e sistemas fisiológicos que afetam o sistema funcional do músculo esquelético em peixes teleósteos. (Adaptado: I. A. Johnston, 2006).....**13**

**FIGURA 10.** Esquema da curva de desempenho dos peixes após o período de restrição alimentar seguido de realimentação. (Adaptado de Ali *et al.*, 2003).....**16**

**FIGURA 11.** Sistemas de recirculação de água onde foi realizado o experimento, montados sob estufa agrícola para o cultivo de tilápias. (A) Detalhe das caixas e suportes de metalon. (B) Sistemas de filtragem abastecimento e escoamento de água. (C) Cultivo da linhagem GIFT ou Supreme. (D) Cultivo da linhagem vermelha.....**17**

**FIGURA 12.** Esquema indicando as condições de cultivo dos peixes dos tratamentos 1 (T1) e 2 (T2) e os períodos de coleta, (setas).....**18**

**FIGURA 13.** A) À esquerda, esquema demonstrando o local de coletas das amostras do tecido muscular, abaixo da nadadeira dorsal (MD), em vista

longitudinal. À direita, esquema de corte transversal do corpo, localizando a profundidade do corte para retirada da amostra muscular. B) Fotomicrografia mostrando a retirada da amostra muscular.....**20**

**FIGURA 14.** Programa computacional de análise de imagens para avaliação morfológica do tecido muscular. Foi calculado o perímetro das fibras para posterior cálculo do diâmetro;  $\text{diâmetro} = \text{perímetro}/\pi$ .....**21**

**FIGURA 15.** Monitoramento das temperaturas nos diferentes tratamentos: T1 (22°C) e T2 (28 °C).....**25**

**FIGURA 16.** Gráficos de curvas de crescimento das linhagens de tilápias do Nilo. (A) Linhagem Vermelha, (B) Linhagem GIFT, (C) Linhagem Supreme. T1, tratamento 1 (22°C). T2, tratamento 2 (28°C).....**29**

**FIGURA 17.** Seções transversais do músculo branco de tilápias do Nilo das diferentes linhagens Vermelha (A e B), GIFT (C e D) e Supreme (E e F), cultivadas em temperatura de 28°C, nos períodos de coleta (30 e 150 dias). Fibra muscular (f), núcleo (n). Coloração Hematoxilina e Eosina.....**30**

**FIGURA 18.** Gráficos de distribuição de frequência (%) das classes de diâmetros das fibras brancas aos 30 dias, nas linhagens Vermelha, GIFT e Supreme. (A): Tratamento 1 (cultivo na temperatura de 22°C com pós cultivo na temperatura de 28°C); (B): Tratamento 2 (temperatura de 28°C). Letras maiúsculas comparam as classes entre os tratamentos e minúsculas comparam as linhagens dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.....**32**

**FIGURA 19.** Gráficos de distribuição de frequência (%) das classes de diâmetros das fibras brancas aos 150 dias, nas linhagens Vermelha, GIFT e Supreme. (A): Tratamento 1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28°C); (B): Tratamento 2 (temperatura de 28 °C). Letras maiúsculas comparam as classes entre os tratamentos e minúsculas comparam as linhagens dentro do

mesmo tratamento. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.....**34**

**FIGURA 20.** Expressão gênica da MyoD nas linhagens de tilápia do Nilo durante o experimento. (A) tilápias cultivadas nas temperaturas de 22°C (Tratamento 1) e 28°C (Tratamento 2), por 30 dias. (B) tilápias cultivadas na temperatura de 28°C por 120 dias. Tratamento 1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28°C). Letras maiúsculas comparam linhagens no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam a mesma linhagem entre os diferentes tratamentos. Letras maiúsculas e minúsculas não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.....**36**

**FIGURA 21.** Expressão gênica da Miogenina (MyoG) nas linhagens de tilápia do Nilo durante o experimento. (A) tilápias cultivadas nas temperaturas de 22°C (Tratamento 1) e 28°C (Tratamento 2), por 30 dias. (B) tilápias cultivadas na temperatura de 28°C por 120 dias. Tratamento 1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28°C). Letras maiúsculas comparam linhagens no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam a mesma linhagem entre os diferentes tratamentos. Letras maiúsculas e minúsculas não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.....**37**

**FIGURA 22.** Expressão gênica da Miostatina (Mstn) nas linhagens de tilápia do Nilo durante o experimento. (A) tilápias cultivadas nas temperaturas de 22°C (Tratamento 1) e 28°C (Tratamento 2), por 30 dias. (B) tilápias cultivadas na temperatura de 28°C por 120 dias. Tratamento 1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28°C). Letras maiúsculas comparam linhagens no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam a mesma linhagem entre os diferentes tratamentos. Letras maiúsculas e minúsculas não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.....**38**

## RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta inúmeras qualidades zootécnicas, entre elas a grande tolerância térmica. A temperatura de cultivo em peixes está diretamente relacionada com o controle do desenvolvimento e crescimento muscular, sendo considerada um dos principais fatores limitantes para a produção. Tilápias do Nilo cultivadas em temperatura resfriada, por curtos períodos de tempo, podem apresentar alterações na taxa de crescimento, bem como na expressão dos MRFs e da Miostatina durante o crescimento, portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da temperatura de cultivo sobre o crescimento compensatório em juvenis de tilápias do Nilo das linhagens Vermelha, GIFT e Supreme, submetidas a diferentes temperaturas. Alevinos de aproximadamente 1 g foram cultivados em dois sistemas de recirculação. Em um dos sistemas, a temperatura da água foi mantida a 22 °C (T1) por um período de 30 dias e após esse período foram cultivados na temperatura de 28°C por 120 dias. Outro grupo foi mantido à temperatura de 28°C (T2) até o final do experimento (150 dias). Aos 30 e 150 dias de cultivo foram amostrados 20 peixes de cada linhagem em cada temperatura. Nas 3 linhagens estudadas, o peso aos 30 dias em T1 foi inferior ao T2. Porém, observou-se que a taxa de crescimento dos peixes cultivados em T1 foi superior a aquela dos peixes cultivados em T2 e isso ocorreu nas três linhagens de tilápias estudadas. Aos 30 dias, as linhagens Vermelha e Supreme em T1 apresentaram maior frequência de fibras na classe <20 µm e menor na classe 20-50 µm em relação à T2. Porém, para a linhagem GIFT, houve maior porcentagem de fibras na classe 20-50 µm (hipertrofia). Aos 150 dias de cultivo as linhagens Vermelha e GIFT em T1 apresentaram maior frequência de fibras na classe <20 µm em relação à T2. A linhagem Vermelha apresentou maior frequência de fibras na classe de 20-50 µm em T1 comparado com T2. A expressão aos 30 dias da Miogenina em T1 foi menor na linhagem GIFT comparada com as linhagens Vermelha e Supreme. A linhagem GIFT apresentou menores níveis de expressão em T1 quando comparada com T2. Aos 150 dias de cultivo, a linhagem Supreme apresentou maior nível de expressão de Miostatina comparada à Linhagem GIFT e em relação aos peixes da mesma linhagem em T2. Nossos dados mostraram que a temperatura de cultivo pode influenciar no crescimento compensatório dos peixes. Nas três linhagens de tilápia de Nilo estudadas, a baixa temperatura de cultivo de 22°C, por curto período de tempo (30 dias), promoveu o crescimento compensatório, alterou a expressão dos genes Miogenina e Miostatina, e a hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares.

**Palavras chave:** Tilápia do Nilo, Crescimento compensatório, Temperatura, Músculo esquelético, Fatores reguladores miogênicos, Miostatina.

## ABSTRACT

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) has many qualities husbandry, including the high thermal tolerance. The cultivation temperature in fish is directly related with the control of muscle development and growth, and is considered one of the main limiting factors for the production. Nile tilapia grown in cold temperatures for short periods of time, may show changes in growth rate, as well as the expression of MRFs and Myostatin during growth, thus the aim of the present study the effect of temperature was investigated on compensatory growth in juvenile Nile tilapia of Red, GIFT and Supreme strain, submitted to different temperatures. Fingerlings (approximately 1g) were cultivated on two recirculation systems. In one, the water temperature was 22 °C (T1) for 30 days and after this, fish were cultivated at 28 °C for 120 days and in other group, water temperature was 28 °C until the end of the experiment (150 days) (T2). At 30 and 150 days of cultivation, fish from T1 and T2 (n=20) for each strain were sacrificed for the analyses. The parameters of water quality were considered ideal for the cultivation of the specie. In the strains studied, the weight gain at 30 days were lower in T1 compared to T2. However, the growth rate of fish reared at T1 was higher than that of fish reared in T2 in the three strains studied. After 30 days, Supreme and Red strains in T1 showed higher frequency of muscle fibers in the class < 20 µm and lowest in class 20-50µm. However, for the GIFT strain, the temperature allowed muscle fiber hypertrophy, in view of the higher muscle fibers percentage in the class 20-50µm. At 150 days, we observed muscle fiber diameters in class > 50µm characterizing muscle hypertrophy in both treatments and strains. Red and GIFT strains in T1 showed higher frequency of fibers in the class < 20 µm compared to T2. Red strain showed higher frequency of fibers in the class of 20-50 µm in T1 compared with T2. At day 30, myogenin gene expression in T1 was lower in the GIFT compared with the Supreme and Red strains. The GIFT strain showed lower levels in T1 compared with T2. After 150 days of cultivation, the Supreme strain showed higher expression level of myostatin compared to the GIFT strain. Additionally, the Supreme strain in T1 showed higher myostatin expression level compared to fish of the same strain at T2. Our data showed that the cultivation temperature can influence the compensatory growth in fish. In the three strains of Nile Tilapia studied, low cultivation temperature (22 °C), for short periods (30 days), promoted compensatory growth, changed the myogenin and myostatin genes expression, altering muscle growth hyperplasia and hypertrophy process.

**Keywords:** Nile Tilapia, Compensatory growth, Temperature, Skeletal muscle, Myogenic Regulatory Factors, Myostatin.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), o consumo de pescado no Brasil cresceu cerca de 40% desde 2003, aproximando-se do patamar considerado ideal pela Organização Mundial de Saúde (MPA, 2010). Diversas espécies de peixes têm sido utilizadas com objetivo de suprir este aumento na demanda.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie que vem apresentando a maior produção dentre as espécies de peixes cultivadas no Brasil, por apresentar inúmeras qualidades zootécnicas, como rusticidade, crescimento rápido, boa adaptação a alimentos artificiais, conversão alimentar e ganho de peso, além de apresentar uma carne branca saborosa e de excelente aceitação no mercado consumidor devido à ausência de espinhos (BRASIL, 2010).

Com o objetivo de intensificar a tilapicultura, várias linhagens de tilápia melhoradas tem surgido, entre as quais se destacam a Vermelha que, segundo Hilsdorf (1995), é um mutante genético selecionado a partir de espécies do gênero *Oreochromis*, cruzadas com outras tilápias vermelhas de origens desconhecidas ou tipos selvagens de *Oreochromis sp.*, temos também a Supreme Tilápia, desenvolvida pela empresa Genomar, que é produto do maior, mais caro e mais longo programa de melhoramento genético de tilápias (Zimmerman, 2003) e a GIFT (Genetic Improvement of Farmed Tilapia), oriunda do cruzamento entre quatro linhagens silvestres de tilápias e quatro linhagens confinadas (Bentsen et al., 1998). Estes cruzamentos mostraram que as linhagens melhoradas possuem alto desempenho zootécnico (melhor crescimento, maior peso do pescado, filé mais espesso) quando comparadas às linhagens tradicionais. Apesar de as linhagens Supreme e GIFT serem da mesma origem, o seu desenvolvimento ocorreu de forma independente após o ano de 1999 (Zimmerman, 2003). Um estudo realizado em Bangladesh comparou o crescimento da linhagem GIFT com o crescimento de linhagens de tilápia do Nilo não selecionadas e foi observado um ganho médio de peso 40 a 57% superior pela linhagem GIFT. Outros estudos compararam a linhagem GIFT com linhagens de tilápia do Nilo já submetidas à seleção e demonstraram a superioridade da linhagem GIFT em cerca de 10-15% no ganho de peso. Porém, o crescimento da tilápia GIFT é mais acelerado no



início do cultivo e diminui quando o animal atinge cerca de 200 a 300g (Kubitza, 2006).

Muitos peixes mostram alterações sazonais na taxa de crescimento, e o principal fator é a temperatura da água. É bem conhecido que o aumento da temperatura a um valor ótimo favorece o crescimento, acima do qual o crescimento decresce (devido ao custo do aumento da taxa metabólica) antes de atingir um limite para a sobrevivência.

Os efeitos do aumento da temperatura no crescimento muscular em diferentes estágios da vida também têm sido descritos em algumas espécies de peixes (Rowlerson e Veggetti, 2001). Entretanto, alterações na dinâmica de crescimento muscular podem ocorrer diferentemente entre linhagens de tilápias e, estudos nesse sentido, não foram realizados. Faz-se necessário um conhecimento mais detalhado da mudança proporcional no tamanho relativo dos tecidos, para que se possa maximizar o conteúdo protéico das carcaças durante o cultivo, bem como, observar as diferenças no padrão de crescimento, otimizando a produção de diferentes grupos genéticos e tornando o sistema de produção mais eficiente. Como o músculo esquelético constitui a parte “comestível” do peixe, o conhecimento sobre os mecanismos de crescimento muscular e os genes envolvidos neste processo pode indicar estratégias para a obtenção de dados zootécnicos que não comprometam a produção em períodos de variação da temperatura, em espécies de interesse econômico, como a Tilápia do Nilo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Musculatura estriada esquelética em peixes**

O tecido muscular esquelético tem como principal característica a plasticidade e esta característica torna o músculo extremamente importante para a adaptação dos organismos ao seu habitat, uma vez que esse tecido tem que alterar suas funções morfológicas, metabólicas e funcionais em resposta a vários estímulos (Acosta et al., 2005).

Na maioria das espécies de peixes, o músculo estriado esquelético é constituído por unidades morfofuncionais, chamadas de miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal e estão inseridos por curtos tendões em bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos (Alexander, 1969) (Figura 1). A

disposição dos miômeros confere a esses animais uma maior mobilidade e destreza durante a realização dos movimentos ondulatórios da natação (Van Leeuwen, 1999). Os miômeros apresentam formato em “W” (Figura 1B) e cada um contém uma região superficial, em formato de cunha, disposta imediatamente abaixo da linha lateral, onde as fibras musculares têm disposição paralela ao eixo corporal do animal e uma região mais profunda, na qual as fibras musculares apresentam uma disposição em hélice, formando ângulos maiores que  $40^\circ$  em relação ao eixo corporal. (Alexander, 1969; Altringham e Ellerby, 1999; Sanger e Stoiber, 2001).

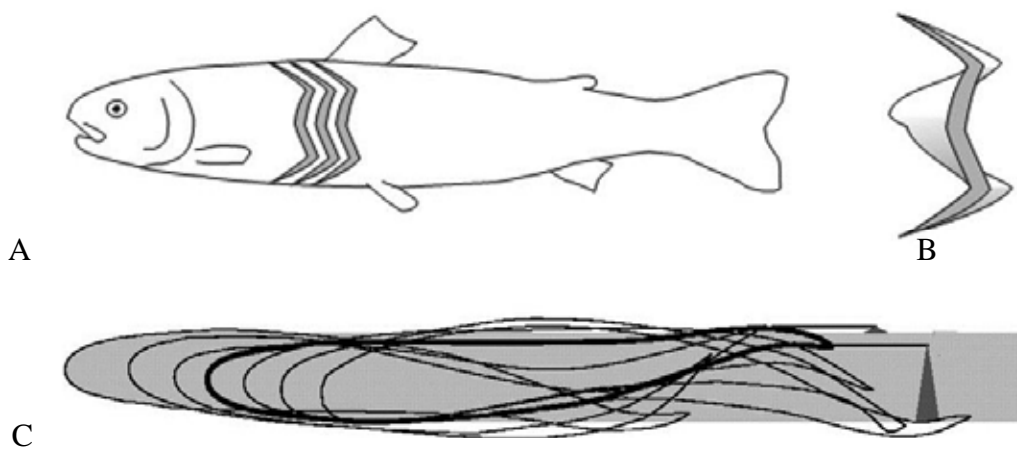


FIGURA 1 - (A) Desenho esquemático demonstrando a região da musculatura lateral, (B) Formato de um miômero de peixe teleósteo. Adaptado de Altringham e Ellerby, 1999. (C) Esquema demonstrando o movimento de natação ondulatória que tem relação direta com a disposição dos miômeros. Adaptado de Müller et al., 2001.

Segundo Gemballa e Vogel (2002), a locomoção axial ondulatória é o primeiro e mais comum modo de locomoção em vertebrados aquáticos, e o desempenho ondulatório tem de ser mantido por forças musculares, as quais são transmitidas para estruturas axiais, como a coluna vertebral (Figura 1C).

A maneira que o músculo é utilizado, para gerar impulso, pode variar ao longo do corpo do animal e entre as espécies (Altringham e Ellerby, 1999).

Os músculos natatórios de todos os grupos de peixes são altamente especializados para atender a demanda de força que é necessária, tanto durante o movimento de sustentação, quanto durante movimentos rápidos. Devido a esta capacidade, a solução adotada universalmente pelos peixes é dividir o sistema

locomotor em vários compartimentos ou camadas contendo fibras musculares distintas (Sänger e Stoiber, 2001).

A classificação dos tipos de fibras musculares em peixes é mais simples quando comparada com a classificação utilizada nos músculos de mamíferos. Nos peixes, esta classificação é restrita a três tipos principais de fibras, (vermelhas, intermediárias e brancas), (Figura 2 B) distribuídas nos compartimentos Vermelho, Intermediário e Branco, respectivamente (Figura 2 A). No entanto, essa organização pode variar de acordo com a espécie e a fase de crescimento estudada (Alexander, 1969; Weatherley e Gill, 1985).

O compartimento vermelho, normalmente, corresponde de 5 a 15% em relação a toda a musculatura miotomal dos peixes (Altringham e Johnston, 1981). Esta musculatura é encontrada na região superficial, abaixo da derme, em maior proporção em direção a região caudal e próxima à região da linha lateral. As fibras musculares vermelhas apresentam pequeno diâmetro (entre 25 e 45  $\mu\text{m}$ ), excelente suprimento sanguíneo, grande quantidade de mitocôndrias e normalmente são recrutadas durante a realização de movimentos lentos e de longa duração, como exemplo, a migração (Sänger e Stoiber, 2001).

O compartimento branco corresponde à aproximadamente 70 % do volume total do tecido muscular (Sänger e Stoiber, 2001). Essa proporção varia ao longo do comprimento do peixe com maior proporção na região anterior do animal e um com grande declínio em direção à região caudal (Zhang et al., 1996). Quando comparadas com as fibras vermelhas, estas fibras musculares apresentam maiores diâmetros (entre 50 e 100  $\mu\text{m}$ ), menor suprimento de capilares sanguíneos e poucas mitocôndrias. Esse tipo de musculatura é recrutado nos movimentos bruscos de natação, como a captura de alimento e/ou fuga de predadores (Altringham e Johnston, 1981; Sänger e Stoiber, 2001).

Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento intermediário com fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias em relação as das fibras musculares brancas e vermelhas e apresentam contração rápida com metabolismo oxidativo/glicolítico (Sänger e Stoiber, 2001).

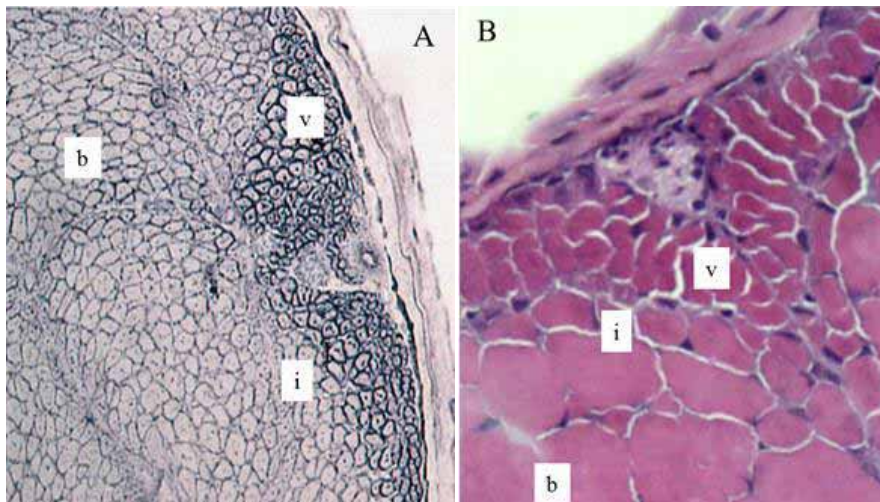


FIGURA 2. (A) Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), após reação de NADH-TR, demonstrando os compartimentos musculares vermelho (v), intermediário (i) e branco (b) adaptado de Aguiar et al., 2005. (B) Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), coloração em HE, demonstrando as fibras musculares distribuídas nos compartimentos vermelho (v), intermediário (i) e branco (b).

## 2.2. Desenvolvimento do tecido muscular em peixes

Nos peixes, a formação das primeiras fibras musculares ocorre nas fases iniciais da embriogênese. O desenvolvimento inicial é crucial e importante para a formação do indivíduo adulto. Nas primeiras etapas da embriogênese, o desenvolvimento dos peixes teleostes é influenciado por fatores maternos depositados no ovócito durante a ovogênese (Johnston et al., 2011). Após a fertilização, os ovócitos tornam-se ativos, iniciando uma cascata de eventos necessários para o desenvolvimento do indivíduo (Pelegri, 2004).

O padrão de desenvolvimento muscular ocorre de modo similar nos peixes e segue um padrão de desenvolvimento semelhante ao de outros vertebrados (Johnston e Hall, 2004). Durante o processo de formação muscular ocorre a segmentação do mesoderma paraxial, definindo um modelo para o desenvolvimento muscular (Zhang et al., 2001). Neste período, ocorrem à formação de blocos pareados de células mesodérmicas, os somitos, que são estruturas epiteliais transitórias que se formam nas primeiras etapas do desenvolvimento sendo subdivididos em três regiões: esclerótomo, miótomo e dermomiótomo (Christ e Ordahl, 1995). O esclerótomo dará origem ao esqueleto axial e a cartilagem do embrião. O dermomiótomo formará a derme, enquanto o miótomo, originará os músculos do tronco e da cauda (Devoto et al., 1996; Currie e Ingham, 2001).

A especificação das células adaxiais e das células pré-somíticas presentes no miótomo, depende de estímulos liberados pelos tecidos adjacentes, como o tubo neural e a notocorda (Devoto et al., 1996) (Figura 3 A).

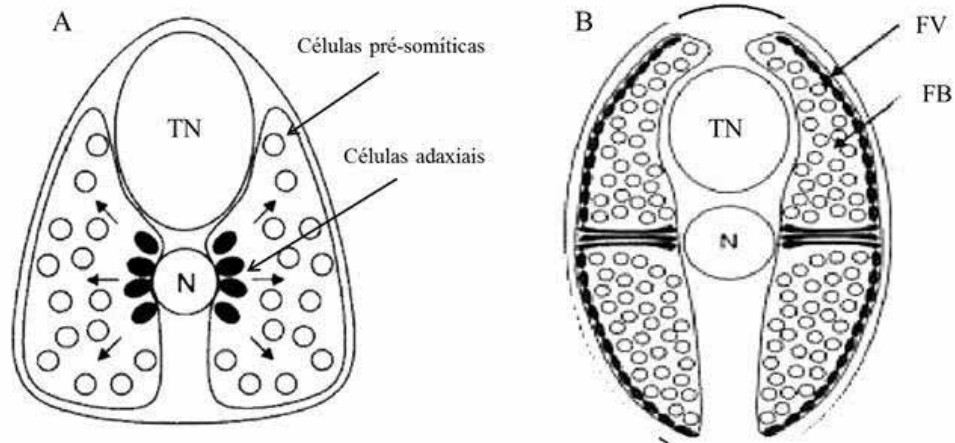


FIGURA 3. Esquemas de seções transversais do músculo esquelético durante a miogênese. (A) Células adaxiais flanqueiam a notocorda (N) e células pré-somíticas laterais apresentam disposição lateral em relação às células adaxiais. As setas menores indicam que as células adaxiais migrarão, entre as células laterais pré-somíticas, em direção à superfície do miótomo. (B) As células adaxiais na superfície do miótomo dão origem aos miotubos multinucleados, formando as fibras vermelhas (FV), enquanto que as demais células darão origem as fibras brancas (FB). TN: tubo neural, N: notocorda (Adaptado de Johnston e Hall, 2004).

Em resposta a estes estímulos, as células adaxiais migram em direção à superfície originando os mioblastos, células mononucleadas (Figura 3 B). Em seguida, vários mioblastos fundem suas membranas originando os miotubos multinucleados que se diferenciam em fibras musculares vermelhas onde os núcleos estão localizados na região central. (Rescan, 2001). As demais células do miótomo, conhecidas como células laterais pré-somíticas, fundem-se para formar miotubos, dando origem ao compartimento de músculo branco do embrião (Currie e Ingham, 2001) (Figura 4).

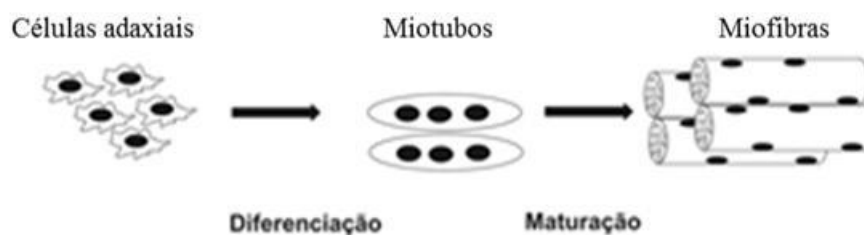


FIGURA 4. Esquema demonstrativo dos principais eventos que ocorrem durante a embriogênese do músculo estriado. (Adaptado de Watabe, 1999).

A formação das fibras musculares adultas ocorre através da migração dos mionúcleos centrais para a periferia da fibra e, assim, alcançam sua forma definitiva como uma fibra multinucleada com núcleos periféricos (Watabe. 1999).

### 2.3. Crescimento de fibras musculares em peixes

O crescimento pós-embriológico do músculo estriado em peixes inicia-se 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 (Vasyutina et al., 2007).

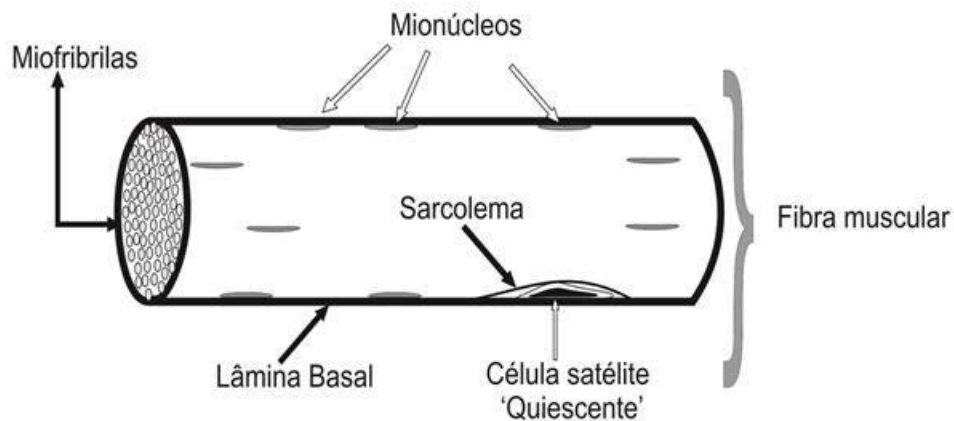


FIGURA 5. Esquema demonstrativo da localização das células satélites na fibra muscular esquelética. (Adaptado de Buckingham, 2007).

As células satélites são células pequenas ( $<5\mu\text{m}$ ), mononucleadas e quiescentes, localizadas entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular. Essas células servem como principal fonte celular para a regeneração e para o processo de crescimento muscular pós-natal (Buckingham, 2007) (Figura 5).

Esse processo pode aumentar o diâmetro e área das fibras, processo denominado hipertrofia e/ou podem se agregar às fibras musculares pré-existent, 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 6).

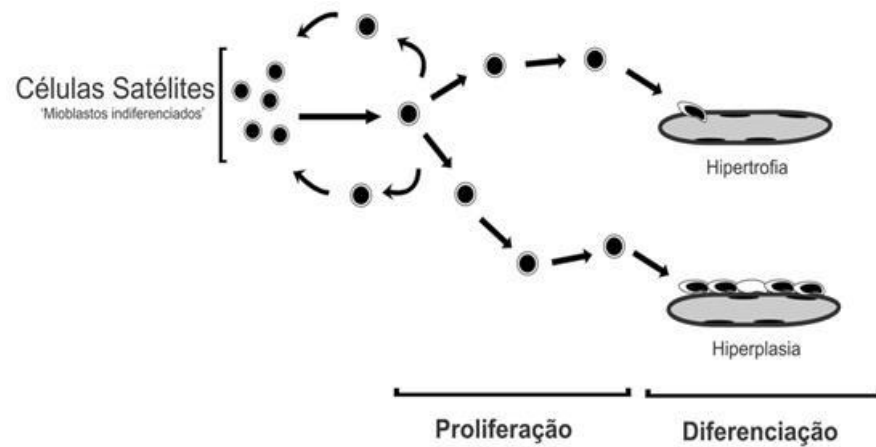


FIGURA 6. Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia. A população de Células Satélites contribui para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético. (Adaptado de Johnston, 1999).

O número de fibras musculares recrutadas alcança um número variável entre espécies e linhagens dentro de uma mesma espécie e pode ser influenciado por fatores ambientais incluindo dieta, exercício, luz e temperatura (Romanello et al, 1987; Usher et al, 1994; Johnston, 1999; Ayala et al, 2001).

Embora o crescimento somático possa ser facilmente medido na forma de peso do corpo (ou peso da carcaça ou comprimento e/ou fator de condição), isso é somente uma medida indireta do crescimento muscular. Um método mais eficaz, que usa dados quantitativos, é a medida do diâmetro ou área das fibras em uma área representativa da musculatura lateral em peixes de diferentes idades, tamanhos ou condições (Veggetti et al, 1990; Kiessling et al, 1991; Rowleron et al, 1995; Alami-Durante et al, 1997; Faucounneau et al, 1997; Johnston et al, 1998; Galloway et al, 1999; Valente et al, 1999). Os diâmetros das maiores fibras dão um indício de crescimento hipertrófico que continua até eles atingirem o máximo valor funcional característico da espécie (Kiessling et al, 1991; Alami-Durante et al, 1997).

A distribuição dos diâmetros das fibras (ou áreas), e especialmente, a presença de fibras com diâmetros pequenos, é frequentemente usado como uma medida da formação de novas fibras, ou seja, da hiperplasia. Entretanto, a presença de pequenas fibras não necessariamente indica o crescimento rápido porque elas podem ser típicas do tamanho do peixe ao invés da taxa de crescimento e até mesmo peixes de crescimento lento podem possuir fibras de pequenos diâmetros no conteúdo muscular (Weatherley e Gill, 1985).

O crescimento em peixes envolve o recrutamento e hipertrofia de fibras musculares (Weatherley e Gill, 1985; Koumans e Akster, 1995).

Ayala et al (2001), observaram predomínio da hipertrofia muscular ao final da fase vitelina de robalo (*Dicentrarchus labrax*), sendo um método menos custoso para o peixe em termos de gasto energético comparado à gênese de novas fibras, em um período quando as reservas energéticas são limitadas, já que não se recebe alimentação externa. Por outro lado, a hiperplasia é associada às fases de rápido crescimento, ocorre principalmente quando os níveis nutricionais não estão limitados e o peixe pode adquirir toda a energia necessária para a geração de novas fibras (Usher et al, 1994). Na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) a hiperplasia é o principal processo de crescimento até os 20 cm de comprimento, e a hipertrofia assume uma maior importância por volta de 60 cm e passa a ser o único processo de crescimento (Weatherley e Gill, 1984). O recrutamento de novas fibras eventualmente cessa também nas grandes espécies, e então, como nas menores, um crescimento adicional de músculo é, presumivelmente, continuado pelo método do aumento do diâmetro das fibras até elas atingirem o tamanho máximo para suas espécies (Weatherley et al, 1988). Johnston et al. (2000), estudando o padrão de crescimento muscular de duas linhagens de salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) concluíram que o desempenho de crescimento superior de uma população precoce estava associado com o período mais longo de recrutamento de fibras e maior hipertrofia do que na população de maturidade tardia.

#### **2.4. Fatores reguladores miogênicos**

Nos peixes, a relativa contribuição da hiperplasia e da hipertrofia no crescimento muscular tem sido estudada em muitas espécies e foi verificado que nas espécies de crescimento rápido e que atingem um tamanho final grande, o crescimento hiperplásico persiste por um período mais prolongado (Valente et al., 1999; Rowleron e Veggetti, 2001).

Durante o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura, é observada a retomada dos eventos ocorridos durante a miogênese. A ativação, proliferação e diferenciação das células precursoras miogênicas (células mio-satélites), são controladas pela expressão diferencial de diversos fatores,



entre eles os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4 (Rescan, 2001; Johansen e Overturf, 2005).

Os MRFs são fatores transcricionais músculo-específicos que contêm um domínio altamente conservado evolutivamente, conhecido como “*basic helix-loop-helix*” (bHLH); este liga-se a sequências de DNA (5′-CANNTG-3′), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos, culminando com a expressão dos mesmos (Ma et al., 1994) (Figura 7).

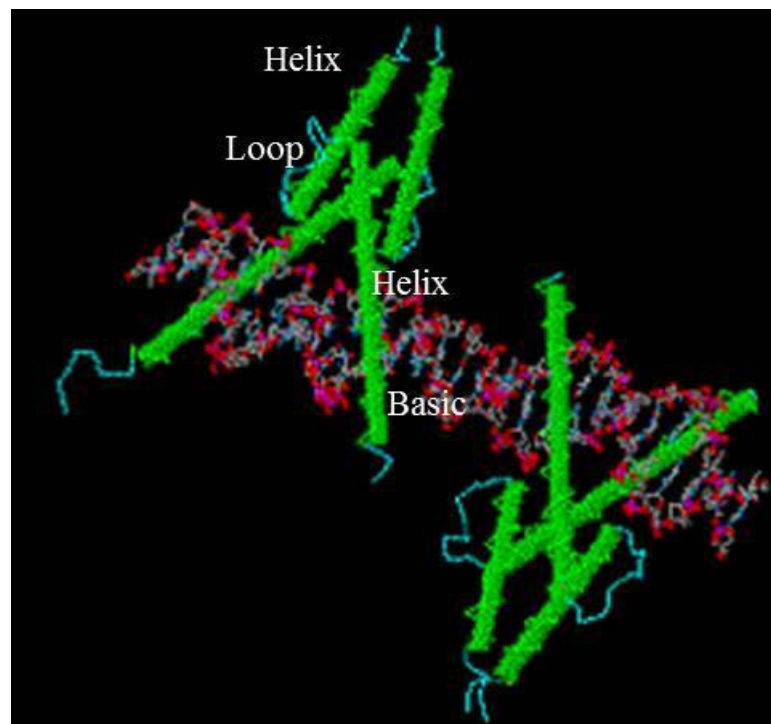


FIGURA 7. Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo dímero do fator transcrional da família *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) MyoD (Ma et al., 1994).

Em algumas espécies de peixes, muitos estudos têm caracterizado as sequências codificantes completas dos RNAs mensageiros (RNAm) referentes à MyoD e à Miogenina. Essas sequências apresentam similaridade com as respectivas sequências descritas em outras espécies de vertebrados, principalmente em relação ao domínio de ligação ao DNA, bHLH.

A comparação da sequência de aminoácidos dos MRFs de peixes com a de outros vertebrados mostrou que a sequência da MyoD é mais conservada que a da Miogenina, inclusive em relação ao domínio bHLH (Kobiyama et al., 1998).

A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a de diferenciação,

enquanto a Miogenina e o MRF4 são expressos em células na fase de fusão e diferenciação em fibras musculares maduras (Watabe, 1999) (Figura 8).



FIGURA 8. Esquema mostrando a formação de uma fibra muscular (miofibrila) durante a miogênese, sob o controle dos fatores de regulação miogênica. Células precursoras miogênicas, presentes nos somitos, tornam-se mioblastos, que iniciam a proliferação. Esses eventos são controlados pela expressão dos MRFs primários MyoD e Myf-5. A expressão de Miogenina e MRF4 controla a diferenciação dos mioblastos em miotubos que, posteriormente, diferenciam-se para formar as miofibras maduras (Adaptado de Watabe, 1999).

## 2.5. Miostatina

Outros importantes reguladores do crescimento muscular são os fatores transcricionais pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor -  $\beta$* ), entre os quais, a Miostatina (GDF-8, *Growth and Differentiation Factor-8*), que controla a ativação da transcrição de genes músculo-específicos (Chargé e Rudnicki, 2004).

A Miostatina é um fator de crescimento considerado essencial por promover a regulação do crescimento do músculo estriado esquelético (McPherron et al., 1997). Nos mamíferos, a Miostatina é expressa em níveis elevados no músculo esquelético, porém, em níveis mais baixos no tecido adiposo, glândula mamária e músculo cardíaco (Ji et al., 1998).

Alguns trabalhos sugerem que a Miostatina inibe a proliferação e a diferenciação das células precursoras miogênicas, diminuindo a expressão dos MRFs (Langley et al., 2002; Rios et al., 2002). A super-expressão da Miostatina inibe a expressão dos MRFs MyoD, Myf-5 e Miogenina. Por outro lado, a inativação da Miostatina em camundongos e bovinos pode aumentar a expressão da MyoD e Miogenina, levando a um aumento na proliferação e diferenciação dos mioblastos e a um intenso crescimento muscular devido à hiperplasia e hipertrofia das fibras (Langley et al., 2002). Nos animais adultos, a Miostatina

parece atuar sobre as células mio-satélites, mantendo-as em um estado quiescente, suprimindo a proliferação e/ou a diferenciação. Quando necessário, a atividade da Miostatina é inibida e as células satélites são ativadas (Lee, 2007).

O gene da Miostatina foi identificado em muitas espécies, incluindo alguns peixes (Rodgers et al., 2003; Maccatrozzo *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001). Apesar de estudos recentes indicarem que a Miostatina pode influenciar o crescimento do músculo cardíaco e, possivelmente, a diferenciação dos adipócitos, sua função primordial é regular negativamente o crescimento do músculo estriado esquelético (McPherron et al., 1997).

Lee et al. (2009), descreve dois tipos de Miostatina (Miostatina I e Miostatina II) encontradas em zebrafish, peixe que atinge um tamanho final de poucos centímetros. A expressão dos genes fica restrita a áreas específicas, sendo a Miostatina I altamente expressa em músculos, cérebro, olhos, rins, ovários, trato digestivo e coração. Entretanto a expressão dos genes da Miostatina II fica restrita ao cérebro. Somente a Miostatina I é dinamicamente regulada durante o desenvolvimento, enquanto a expressão de Miostatina II permanece constante.

Com base nos trabalhos analisados é possível constatar que vários fatores ambientais e de transcrição podem interferir com o crescimento somático dos peixes e, esses podem ser explorados de forma positiva no cultivo, pois podem resultar em aumento na massa muscular, característica importante e desejada para a aquicultura.

## **2.6. Influência dos fatores extrínsecos no crescimento do músculo esquelético**

A taxa de crescimento dos peixes pode ser afetada por diversos fatores (fatores extrínsecos e intrínsecos), podendo assim comprometer os custos de produção. Mudanças na alimentação, oxigênio, salinidade, pH e temperatura da água podem alterar o crescimento (Figura 9), porém podem ocorrer diferenças entre as espécies e linhagens de peixes (Johnston, 2006).

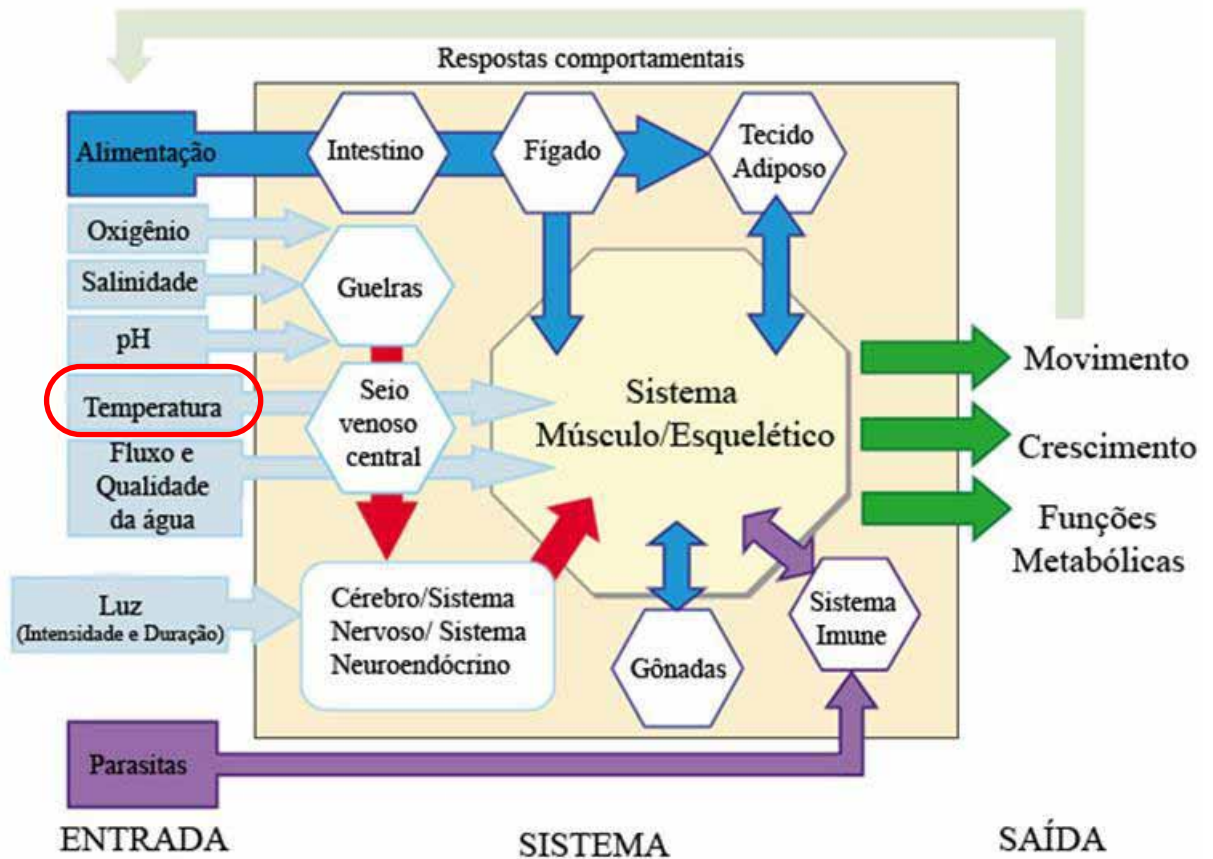


FIGURA 9. Fatores extrínsecos e sistemas fisiológicos que afetam o sistema funcional do músculo esquelético em peixes teleósteos. (Adaptado: I. A. Johnston, 2006).

Estudos têm demonstrado que a temperatura pode promover vários efeitos no crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético (Vieira e Johnston, 1992; Johnston et al., 1998).

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes que influenciam o crescimento dos peixes, composição corporal e balanço energético. A baixa temperatura diminui as taxas de crescimento, de alimentação e metabólicas, enquanto temperaturas elevadas correlacionam com um aumento no crescimento até um ponto ótimo, acima do qual o estresse térmico ocorre (Johnston, 2006).

Durante os estágios embrionário e larval, alterações na temperatura de cultivo podem afetar a atividade das células precursoras miogênicas, afetando o número e/ou tamanho das fibras musculares, influenciando assim, a celularidade muscular (Vieira e Johnston, 1992; Usher et al., 1994; Johnston et al., 1999).

O crescimento de peixes e, conseqüentemente, o crescimento muscular são dependentes da temperatura, mas as alterações observadas na celularidade muscular são geralmente incluídas na relação alométrica normal da celularidade

muscular com o tamanho ou peso do peixe (Alami-Durante et al., 1997; Fauconneau et al., 1997; Valente et al., 1999). Stickland et al. (1988), observaram que nem todos os processos associados com a miogênese alteram-se na mesma extensão com o aumento da temperatura, resultando em diferenças na celularidade muscular. Ovos de uma única família de salmão do Atlântico foram incubados em temperatura ambiente flutuando em torno de 1,6°C ou em água aquecida em 10°C constantes. Significativamente, o número de fibras musculares aumentou muito mais no grupo que se manteve na temperatura ambiente do que no grupo aquecido no período antes da eclosão. Como um resultado da eclosão, alevinos de salmão no grupo ambiente tiveram significativamente mais fibras que eram de menor área do que aqueles no grupo aquecido. Isso pode ocorrer diferentemente em espécies de clima tropical.

Nathanailides et al. (1995), encontraram resultados semelhantes quando estudaram a progênie de um único cruzamento de salmão, cultivados em ambiente de temperaturas flutuando em torno de 5° C ou em uma constante de 11°C. Nesse estudo, a área de secção transversal do músculo branco também foi similar nos dois grupos na eclosão, e o grupo ambiente teve aproximadamente 4500 fibras por secção transversal nos miótomos caudais comparados com somente 3200 no grupo aquecido. O mesmo padrão de resultado foi obtido por Usher et al. (1994), embora na eclosão, o número total de fibras por secção transversal em embriões cultivados à 5°C foi quase o dobro do de 11°C.

Johnston e McLay (1997), investigaram o início da miogênese em cinco famílias de salmão. Os ovos foram incubados em cativeiro em temperatura ambiente medindo 4,3°C ou em água aquecida a 8°C. Na eclosão, os embriões incubados a 8°C tiveram uma área de secção transversal total significativamente menor de ambos os músculos vermelho e branco, reduzido número de fibras e núcleos, e uma reduzida área de secção transversal média de fibras musculares brancas. A diferença no número de fibras musculares entre os grupos de temperatura foi na ordem de 6 – 12%.

Entretanto, Assis et al. (2004), observaram que os ovos de pacu que foram incubados em diferentes temperaturas (25°, 27° e 29° C), apresentaram diferenças significativas entre as temperaturas estudadas após 60 dias (pós-eclosão), onde os animais que foram incubados a 29° C apresentaram maior comprimento total, maior número de núcleos e fibras brancas quando comparados

com as demais temperaturas. Isso é indicativo de que peixes de clima tropical, a exemplo do pacu, podem apresentar diferenças no desenvolvimento e crescimento muscular em relação aos peixes de climas temperados.

Em um estudo onde os autores avaliaram o efeito da temperatura na dinâmica do crescimento muscular em robalos (*Dicentrarchus labrax*), foi observado que a dinâmica de crescimento do músculo branco e vermelho foi influenciada pela temperatura e as respostas observadas variou ao longo dos períodos larval e pós-larval (López-Albors et al., 2003).

Os estudos mostram que a temperatura de cultivo durante o desenvolvimento inicial afeta o número de fibras na eclosão e também a população de células precursoras miogênicas envolvidas no crescimento muscular pós-larval. As várias hipóteses propostas para explicar tal efeito da temperatura são relacionadas à duração do ciclo celular ou ao comprimento do período de recrutamento de células precursoras (Stickland et al, 1988; Johnston et al., 1998).

## **2.7. Crescimento Compensatório**

Períodos com alterações climáticas sazonais e períodos de privação alimentar podem diminuir a taxa de crescimento e após estes períodos pode ocorrer um crescimento rápido no animal, chamado crescimento compensatório (Dobson e Holmes, 1984).

O crescimento compensatório é um período de aceleração do crescimento que ocorre quando os animais voltam a ter condições ideais ao crescimento (Won e Borski, 2013). Pode ocorrer também por um aumento na alimentação (hiperfagia) ou por uma combinação de hiperfagia e aumento na eficiência do crescimento (Jobling et al., 1999), e pode ser dividido em diferentes categorias: crescimento compensatório parcial, total ou sobre compensação (Figura 10). 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).

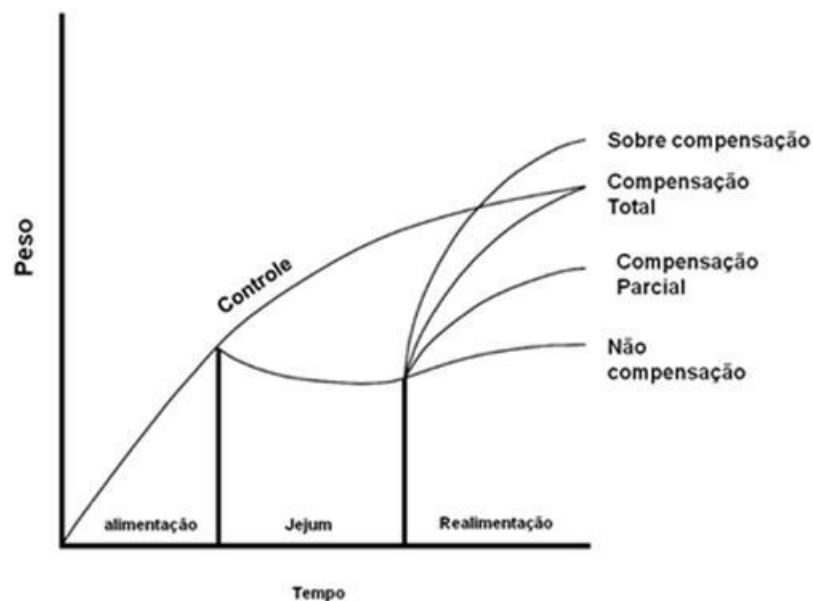


FIGURA 10. Esquema da curva de desempenho dos peixes após o período de restrição alimentar seguido de realimentação. (Adaptado de Ali et al., 2003).

Com base nos trabalhos analisados é possível constatar que a temperatura da água pode ser explorada de forma positiva no cultivo, resultando taxas de crescimento muscular mais rápida, diminuição no custo de produção e aumento na produção de filés de tilápia do Nilo, características importantes e desejadas para a aquicultura.

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito da temperatura de cultivo sobre o crescimento compensatório em juvenis de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) das linhagens Vermelha, GIFT e Supreme.

Objetivos específicos: a) estabelecer as curvas de crescimento de peso em função da idade; b) avaliar a morfologia do tecido muscular, caracterizando o grau de hiperplasia e hipertrofia das fibras; c) avaliar a expressão de genes que controlam o crescimento muscular, como os fatores reguladores miogênicos MyoD e Miogenina e o fator de crescimento Miostatina em peixes cultivados nas temperaturas de 22 e 28°C aos 30 e 150 dias.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento experimental

O cultivo dos peixes foi realizado no Pólo Regional da Alta Sorocabana, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), com sede em Presidente Prudente, SP. As análises laboratoriais histológicas e dos fatores regulatórios miogênicos foram realizadas no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

Foram utilizados nesta pesquisa alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) das linhagens Vermelha, GIFT (do inglês *Genetically Improved Farmed Tilapia*) e Supreme Geração14. Os peixes, oriundos de uma população monossexo masculina, foram cultivados em dois sistema de recirculação de água contendo 6 caixas d'água de 0,5 m<sup>3</sup> (Figura 11), sendo que cada caixa recebeu 40 alevinos de uma mesma linhagem, de aproximadamente 1g.



FIGURA 11. Sistemas de recirculação de água onde foi realizado o experimento, montados sob estufa agrícola para o cultivo de tilápias. (A) Detalhe das caixas e suportes de metalon. (B) Sistemas de filtragem abastecimento e escoamento de água. (C) Cultivo da linhagem GIFT ou Supreme. (D) Cultivo da linhagem vermelha.



Conforme mostra a Figura 12, os peixes das 3 linhagens foram acondicionados em dois sistemas de recirculação de água: temperatura de 22°C, mantida por um período de 30 dias com auxílio de resfriadores (chillers de 1hp) e, após esse período, os resfriadores foram desligados e a temperatura da água foi mantida à 28 °C durante 120 dias (tratamento 1 – T1). Em outro sistema, os peixes foram mantidos à temperatura de 28 °C durante todo o experimento (150 dias) (tratamento 2 – T2). Foram utilizadas duas repetições para cada tratamento. A temperatura e o oxigênio dissolvido foi monitorado diariamente e pH, alcalinidade, dureza, amônia, nitrito e nitrato semanalmente.

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia, com uma mesma ração comercial, específica para cada fase de crescimento, com o teor de proteína bruta de 32%, sendo a quantidade fornecida de acordo com a biomassa do tanque. A cada 30 dias foram realizadas a biometria de 20 peixes de cada linhagem (10 peixes de cada tanque).

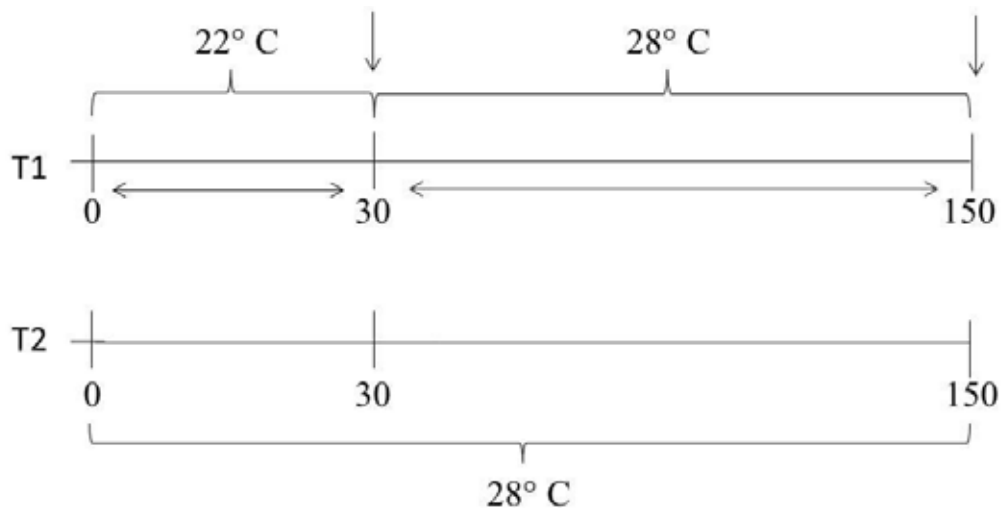


FIGURA 12. Esquema indicando as condições de cultivo dos peixes dos tratamentos 1 (T1) e 2 (T2) e os períodos de coleta, (setas).

#### 4.2. Análise do desempenho e avaliação do crescimento

Aos 30 e 150 dias de cultivo, foram realizadas amostragens de 20 peixes de cada linhagem e tratamento (10 peixes por tanques) para a aferição do peso (g) e comprimento (cm), após terem passado por um período de jejum de 24 horas. Todos os animais foram insensibilizados por choque térmico (água e gelo), eutanaziados através de punção cerebral e pesados.

Os dados foram analisados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado com os tratamentos em esquema fatorial 2 x 3 (temperatura X linhagem), considerando o tanque como unidade experimental. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Para o estudo do crescimento dos animais, dados de pesos de todos os peixes foram ajustados ao modelo  $y_i = Ae^{Kx_i} + e_i$ , onde “y” é o peso observado de cada peixe,  $i = 1, 2, \dots, n$ ; A, o peso inicial estimado (g); e, base natural do logaritmo; K, a taxa de crescimento específico (g/dia);  $x_i$ , a idade de cada peixe;  $e_i$ , o erro associado com cada observação, que por suposição é  $N(0, \sigma^2)$ . Os parâmetros do modelo de crescimento de cada linhagem em cada tratamento foram comparados por seus intervalos de confiança a 95% de probabilidade. As estimativas foram obtidas por Quadrados Mínimos Ponderados (Draper e Smith, 1998) considerando erros autoregressivos, pois as variâncias das observações não são iguais e à medida que o tempo aumenta as variâncias dos pesos também aumentam (Santos et al., 2008).

### **4.3. Análise morfológica e morfométrica**

Aos 30 e 150 dias de cultivo amostras de tecido muscular esquelético (músculo branco) de sete peixes de cada linhagem e tratamento foram removidas na porção mediana do corpo, abaixo da nadadeira dorsal para posterior avaliação das fibras brancas conforme ilustrada na Figura 13.

As amostras retiradas foram fixadas em formol tamponado, processadas e incluídas em historesina. Secções transversais de 4 $\mu$ m foram obtidas com Micrótomo Leica RM2165 e foram coradas em Hematoxilina e Eosina. Foi calculado o diâmetro das fibras musculares com auxílio de um microscópio Leica DM50 acoplado a um sistema de análise de imagem. Sob o microscópio, áreas representativas das secções musculares foram identificadas em cada animal para se determinar a área e o diâmetro de 350 fibras musculares conforme a Figura 14.

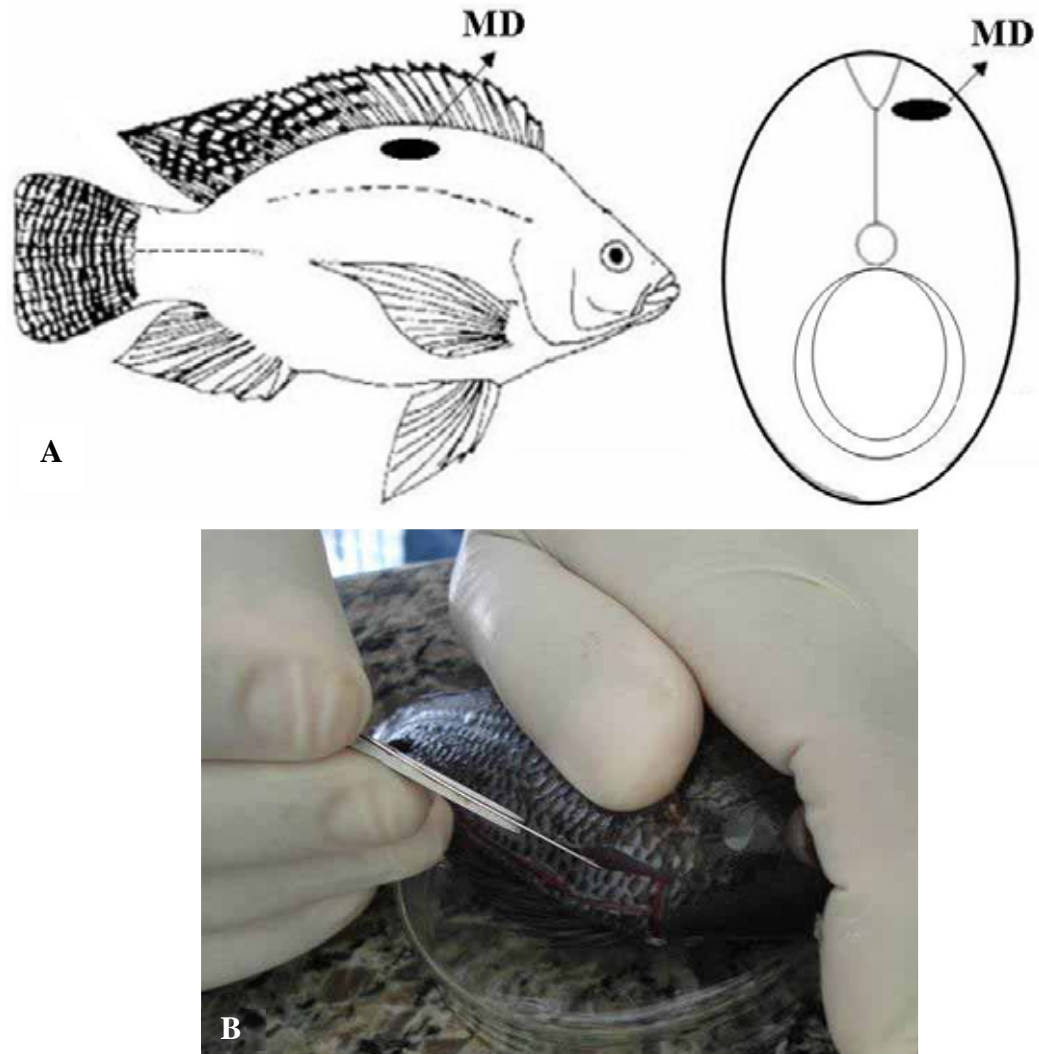


FIGURA 13. A) À esquerda, esquema demonstrando o local de coletas das amostras do tecido muscular, abaixo da nadadeira dorsal (MD), em vista longitudinal. À direita, esquema de corte transversal do corpo, localizando a profundidade do corte para retirada da amostra muscular. B) Fotomicrografia mostrando a retirada da amostra muscular.

A análise de variância para o diâmetro médio das fibras foi realizada segundo delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 3), com 7 repetições. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Os dados relacionados aos diâmetros das fibras musculares foram distribuídos em classes de diâmetros (<20 $\mu$ m, 20-50, >50 $\mu$ m), conforme a metodologia adotada por Almeida et al. (2008), e as médias foram plotadas em um histograma de frequência (%) para cada linhagem de tilápia aos 30 e 150 dias. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis One Way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla Dunn para diferenças entre linhagens e teste t entre os tratamentos. O nível de significância foi de 5% para todas as análises.

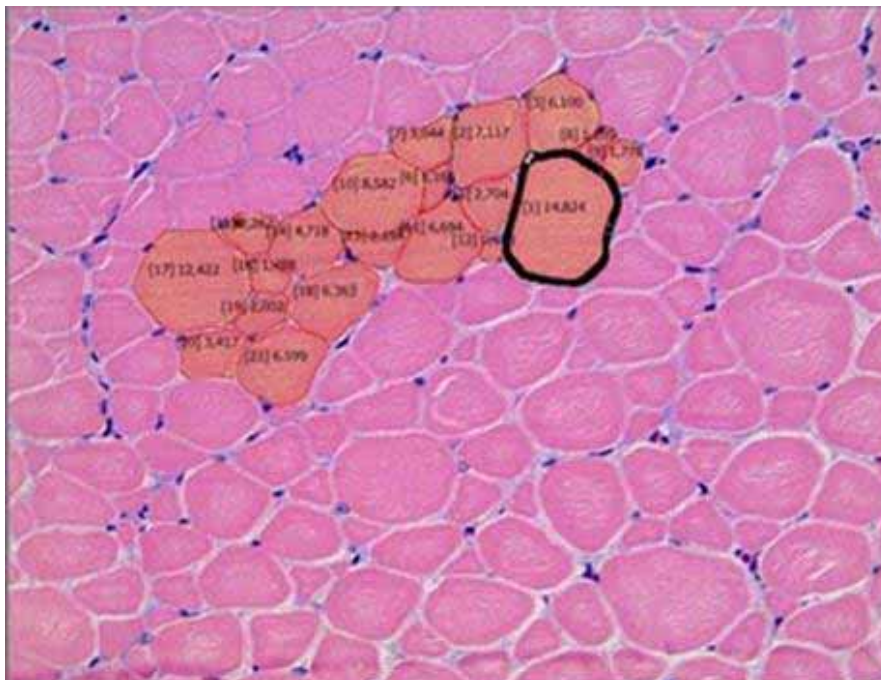


FIGURA 14. Programa computacional de análise de imagens para avaliação morfológica do tecido muscular. Foi calculado o perímetro das fibras para posterior cálculo do diâmetro; diâmetro = perímetro/ $\pi$ .

#### 4.4. Análise da expressão gênica da MyoD, Miogenina e da Miostatina

Para a análise da expressão gênica, fragmentos de músculo branco dos peixes de cada linhagem e tratamento foram retirados aos 30 e 150 dias e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs (MyoD e Miogenina) e do fator de crescimento negativo (Miostatina) foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).

#### 4.5. Extração do RNA total

Os fragmentos musculares congelados foram homogeneizados com o homogeneizador politrom em 1ml de TRIzol Reagent para cada 50/100mg tecido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O material foi incubado por 5 minutos em temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foi descartada a parte insolúvel e adicionado 0,2ml de clorofórmio para cada 1ml de TRIzol e a solução foi incubada por 3 minutos à temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ . O material foi centrifugado a 12000rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e a fase aquosa formada foi separada. O RNA foi precipitado com 0,5 ml de álcool isopropílico por 10 minutos à temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, centrifugado a 12000rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O “pellet” de RNA

formado foi lavado com 1 ml de etanol 75 %, centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante removido cuidadosamente. O pellet de RNA foi seco em temperatura de 28°C durante 25 minutos, seguido de ressuspensão em água ultrapura e, finalmente, armazenado à -80 °C. O RNA foi quantificado e também foi determinada a razão entre as absorvâncias a 260/280 e 230/260nm, o que forneceu uma estimativa da qualidade da extração (razão ~ 2.0) (Tabela 1).

Tabela 1. Razões de absorvância e concentração do RNA total extraído das amostras de músculo branco de exemplares de alevinos de tilápias do Nilo.

Amostra	Concentração (µg/µL)	Razão (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	Razão (A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub> )
1	1196	1,95	1,71
2	1538	2,15	1,87
3	1223	2,06	1,71
4	1196	2,28	1,68
5	1251	1,92	1,77
6	846,4	2,00	1,88
7	1147	2,00	1,62
8	1085	2,03	1,74
9	1063	1,96	1,73
10	1192	1,97	1,63

A qualidade (integridade) do RNA total extraído foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 1µg de RNA em gel de agarose corado de acordo com instruções do fabricante.

#### 4.6. Tratamento do RNA com DNase

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 1 µg do RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, onde foram adicionados 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 1µL de DNase I Amp Grade (1U/µL) e água-DEPC (tratada com Dietilpirocarbonato-DEPC 0,01% - SIGMA) na quantidade suficiente para completar 10 µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi adicionado de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubado a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima DNase I.

#### 4.7. Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o Kit High Capacity *cDNA Archive Kit* (Life Technologies - EUA). A cada 2 µg de RNA total obtido do músculo esquelético foram acrescentados de 10 µl de tampão de transcriptase reversa (10X RT buffer), 4 µL de dNTPs (25X), 10 µL de Randon Primers (10X), 2.5 µL de enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50 unidades/µl), 2.5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT (40 unidades/µL) (Invitrogen Life Technologies, 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 a 55° C e extensão à 72° C por uma hora. Em seguida, os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C.

#### 4.8. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Foram desenhados primers para os genes Miostatina, MyoD e Miogenina e para os genes de referência βACT, EF1a e RPL13, a partir de sequências publicadas no GenBank (Tabela 2). 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). A partir das sequências obtidas do sequenciamento, e com o objetivo de confirmar se os fragmentos amplificados eram realmente referentes os genes estudados, realizou-se um alinhamento das sequências obtidas com as sequências publicadas de outros peixes. Após a confirmação das sequências obtidas, foram desenhados novos primers específicos para serem utilizados na PCR em tempo real (qPCR).

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs (MyoD e Miogenina), e da Miostatina foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real com a utilização do Kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, 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), 1,5 µL de primers “sense” e 1,5 µL de primer “anti-sense” e 7,5 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, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. Inicialmente foram amplificados os genes de referências  $\beta$ -actina, EF1 $\alpha$  e RPL13, porém somente a  $\beta$ -actina foi utilizada como gene de referência para a normalização dos resultados de expressão dos genes-alvo por apresentar maior estabilidade, e ao término de cada PCR foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

Tabela 2. Descrição do gene, sequência do primer, tamanho e eficiência da amplificação.

Identificação do Gene	Sequência do Primer	Tamanho (bp)	Eficiência Amplificação
MyoD 1 (GU246722)*	5' CATCCAGCCCCCGCTCCAAC 3' 5' GTCTGACAGGTGGGGCCGTT 3'	64	1.835
MyoG (GU246725)*	5' CTCAACCAGCAGGACACTGA 3' 5' ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT 3'	171	1.745
MSTN 1 (FJ972683)*	5' CGCAACCACGGAGACAATT 3' 5' CACCTGGACAGCGGAATCA 3'	58	1.846
bACT (EU887951)*	5' ACCTTCAACACCCCGCCAT 3' 5' ACAGGGACAGCACAGCCTGGAT3'	52	1.85
EF1 $\alpha$ (AB075952)*	5' CCAGAACGACGGTCGATCTT 3' 5' GCCCACATCGCTTGCAA 3'	56	1.76
RPL13**	5' AGATAACCCTGGCCTTCTCCTT 3' 5' GCTCGCTGGTCCAGTCATG 3'	62	1.913

\* Número de acesso GenBank.

\*\* Sequência obtida através do alinhamento de varias sequência publicadas de espécies de peixes.

#### 4.9. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis One Way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla Dunn para diferenças entre linhagens e teste t entre os tratamentos. O nível de significância foi de 5% para todas as análises.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Condições experimentais

Conforme mostra a Figura 15, pode-se observar que após 30 dias, quando os peixes do tratamento 1 (T1) foram colocados na temperatura de 28°C, esta oscilou cerca de 1°C, ficando dentro dos limites considerados ideais para o cultivo da espécie. A faixa de temperatura considerada ideal para o desenvolvimento normal, reprodução e crescimento da tilápia é de cerca de 25° a 32°C, porém tilápias cultivadas a 28°C normalmente apresentam crescimento superior (El-Sayed et al., 2008). Embora a espécie seja tolerante a baixas temperaturas, se submetida a temperaturas menores que 25°C o crescimento é inferior (Sifa et al., 2002).

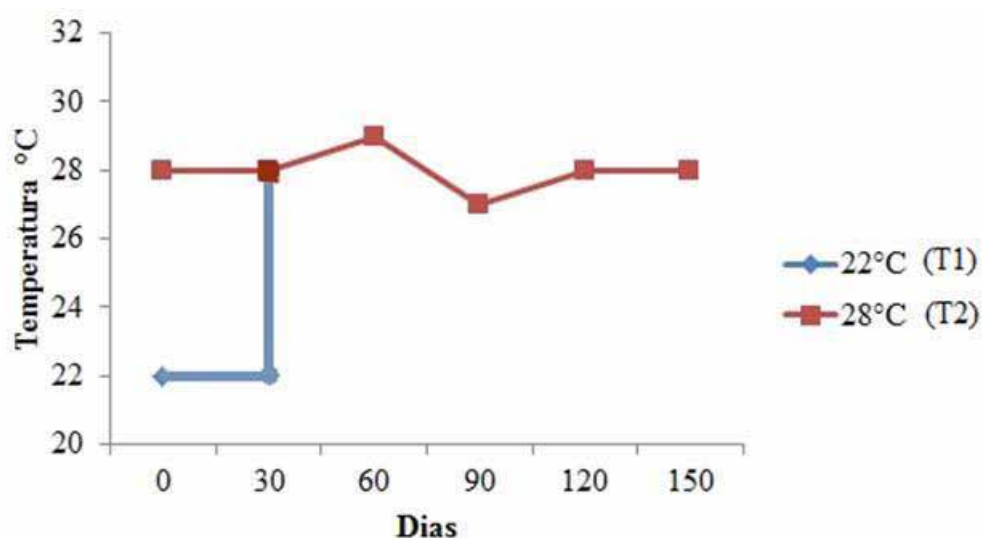


FIGURA 15. Monitoramento das temperaturas nos diferentes tratamentos: T1 (22°C) e T2 (28 °C).

Os parâmetros limnológicos médios de oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade, dureza, concentrações máximas de amônia, nitrito e nitrato da água, observados durante o experimento estão representadas na Tabela 3.



Tabela 3. Valores médios de oxigênio dissolvido (mg/L), pH, alcalinidade (mg/L), dureza (mg/L) e concentrações máximas de amônia (mg/L), nitrito (mg/L) e nitrato (mg/L) da água de cultivo dos peixes nos tratamentos T1 e T2.

Parâmetros	Tratamento	
	T1	T2
Oxigênio (mg/L)	5,24	4,71
pH	7,05	7,08
Alcalinidade (mg/L)	114,56	110,98
Dureza (mg/L)	229,12	297,14
Amônia (mg/L)	0,03	0,05
Nitrito (mg/L)	1,3	2,75
Nitrato (mg/L)	50	68,5

Embora para o cultivo de peixes, em geral, seja recomendado valores de oxigênio dissolvido maiores que 5mg/L, segundo Popma e Masser (1999) não ocorre melhoria no crescimento quando as tilápias são cultivadas em concentrações de oxigênio acima de 2,0 a 2,5mg/L. Os autores relatam que tilápias suportam pH de 5 a 10, mas a amplitude de 6 a 9 é considerada mais segura. Os níveis de alcalinidade estão dentro do padrão de limite para garantir a produtividade que é de 50-200 mg/L para peixes de água doce, já a dureza se encontra em nível moderado para o cultivo de peixes, sendo que valores entre 50-200 mg/L são mais indicados (Hajek e Boyd, 1994). Concentrações letais de amônia estão em torno de 0,24mg/L sendo desejável manter níveis inferiores a 0,1mg/L (El-Sayed, 2006). Nitrato geralmente não é tóxico para tilápia, mas a concentração de nitrito deve ser mantida abaixo de 27mg/L para o cultivo de peixes de água doce em geral, embora as tilápias sejam mais tolerantes do que a maioria das espécies (Popma e Masser, 1999). No nosso experimento, os valores dos parâmetros limnológicos estiveram dentro das condições adequadas para o cultivo da tilápia.

## 5.2. Desempenho e avaliação do crescimento

Aos 30 dias, os peixes que foram submetidos à temperatura de 22°C (T1), obtiveram menor peso quando comparados àqueles cultivados em temperatura de 28°C (T2). Não foram observadas diferenças entre as linhagens dentro do mesmo tratamento (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio padrão do peso corporal (g) das linhagens de tilápia do Nilo dos tratamentos T1 e T2 aos 30 dias do experimento.

Linhagem	Tratamento	
	T1	T2
Vermelha	4,46 (0,24) Ba	18,29 (1,62) Aa
GIFT	7,52 (1,39) Ba	17,66 (1,73) Aa
Supreme	6,10 (0,68) Ba	18,42 (1,25) Aa

T1: Tilápias cultivadas por 30 dias à temperatura de 22 °C;

T2: Tilápias cultivadas por 30 dias à temperatura de 28°C;

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha não são iguais a 5 %;

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna não são iguais a 5 %.

O peso médio dos peixes ao final do experimento (150 dias de cultivo) está apresentado na Tabela 5. Pode-se observar que a linhagem Supreme obteve peso final superior ao das linhagens Vermelha e GIFT, independentemente dos tratamentos ao qual foram submetidas. As tilápias da linhagem Vermelha e Supreme cultivadas previamente em temperatura de 22°C apresentaram peso inferior (151,60 e 268,30 g, respectivamente) àquelas cultivadas em temperatura de 28°C (225,15 e 312,95 g) ao final de 150 dias. Por outro lado, os peixes da linhagem GIFT cultivados por 30 dias em temperatura de 22°C e 120 dias em temperatura de 28°C apresentaram peso superior àqueles da mesma linhagem que foram cultivados por 150 dias na temperatura de 28°C.

Workagegn (2012), descreve que a temperatura da água influencia a taxa de crescimento bem como o peso corporal em juvenis de tilápia do Nilo e relata que as tilápias cultivadas em temperaturas mais elevadas (30 °C e 32 °C) apresentam um desempenho melhor comparado àquelas cultivadas em temperaturas resfriadas (24 °C). Santos et al (2013), observaram que as taxas de crescimento das linhagens Vermelha, GIFT e Supreme cultivadas a 28°C por 220 dias foram superiores (0,0416; 0,039 e 0,0419 g/dia respectivamente) àquelas que foram cultivadas durante todo o experimento a 22°C (0,0259; 0,0285 e 0,0284 g/dia respectivamente), sendo semelhantes às cultivadas a 30°C (0,0374; 0,0431 e 0,0419 g/dia respectivamente).

Os achados dos autores acima descritos podem explicar os resultados obtidos no nosso estudo para as linhagens Vermelha e Supreme em relação ao peso menor ao final de 150 dias de cultivo, quando comparados aos peixes cultivados em temperatura de 28°C. A linhagem GIFT respondeu melhor à baixa temperatura, obtendo sobre-compensação no crescimento no final do

experimento. Kubitzka (2006), descreve que o crescimento da tilápia da linhagem GIFT é mais acelerado no início do cultivo e diminui quando o animal atinge cerca de 200 a 300g, no nosso experimento, podemos inferir que a temperatura de 22°C foi benéfica para o crescimento, conforme demonstrado pelo peso corporal aos 30 dias.

Tabela 5. Médias e desvio padrão do peso corporal das linhagens de tilápias do Nilo aos 150 dias, inicialmente submetidas ou não a temperatura de 22°C por 30 dias.

Linhagem	Tratamento	
	T1	T2
Vermelha	151,60 (11,00) Bc	225,15 (19,55) Ab
GIFT	204,93 (3,36) Ab	169,03 (0,23) Bc
Supreme	268,30 (15,61) Ba	312,95 (12,91) Aa

T1: Tilápias submetidas por 30 dias a temperatura de 22°C (22 °C) e 120 dias subsequentes em temperatura de 28°C (28 °C);

T2: Tilápias cultivadas por 150 dias em temperatura de 28°C (28°);

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na linha não são iguais a 5 %;

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna não são iguais a 5 %.

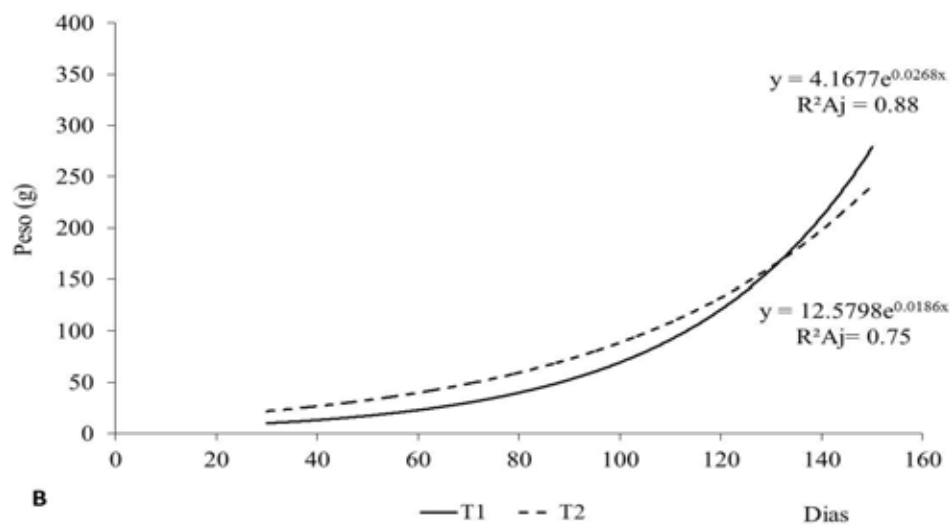
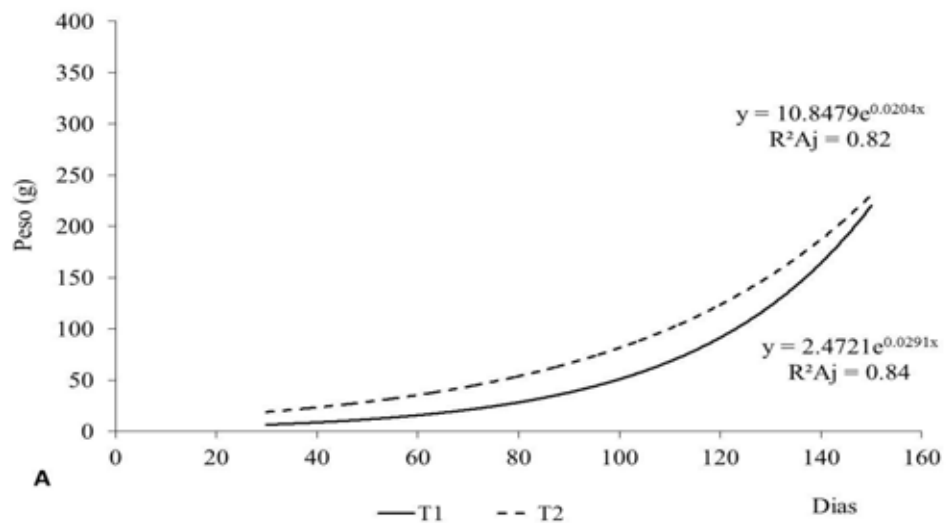
Para descrever o crescimento, geralmente utilizam-se diferentes modelos matemáticos de peso em função da idade, que são ferramentas usadas em programas de melhoramento genético, seleção de espécies e ou linhagens a serem cultivadas. As curvas de crescimento que relacionam o peso de um animal com sua idade são importantes para pesquisas e recomendações sobre eficiência de produção (Fitzhugh, 1976), contribuindo, assim, para aumentar o lucro do produtor.

No nosso estudo, as estimativas dos pesos aos 30 dias em T1 foram inferiores àquelas dos peixes em T2 nas linhagens Vermelha, GIFT e Supreme. Pode-se observar que as taxas de crescimento dos peixes submetidos à temperatura de 22°C por 30 dias foi superior a aquela dos peixes cultivados à temperatura de 28°C e isso ocorreu nas três linhagens de tilápias estudadas (Figura 16).

A linhagem Vermelha apresentou taxa de crescimento de 29,1 mg/dia no tratamento 1 (T1) e 20,3 mg/dia no tratamento 2 (T2). Já na linhagem GIFT esses valores foram 26,8 e 18,6 mg/dia em T1 e T2, respectivamente; na linhagem Supreme, a taxa de crescimento foi de 31,9 e 24,5 mg/dia em T1 e T2, respectivamente (Figura 16). O aumento na taxa de crescimento das linhagens

Vermelha, GIFT e Supreme devido a compensação foram 71,7%, 72,0% e 65,1%, respectivamente, indicando a sobre-compensação da linhagem GIFT que apresentou uma taxa de crescimento superior, e maior peso final (Figura 16B);

Santos et al (2008), ajustaram o modelo exponencial de crescimento para as linhagens Comercial (derivada do programa GIFT) e Tailandesa e encontraram taxas de 0,0251 e 0,0170 g/dia, respectivamente, mostrando que a linhagem Comercial (GIFT) apresentou desempenho superior. Além disso, esses mesmos autores compararam os resultados de ajuste de curvas exponenciais de crescimento de modelo não-ponderado e ponderado pelo inverso das variâncias dos pesos. Constataram que a ponderação melhorou a qualidade dos ajustes, as estimativas e a confiabilidade dos parâmetros.



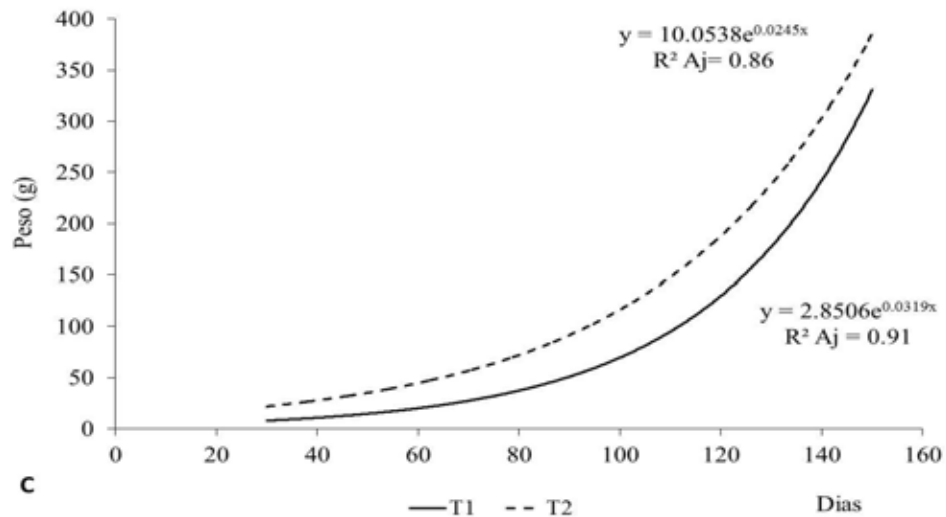


FIGURA 16. Gráficos de curvas de crescimento das linhagens de tilápias do Nilo. (A) Linhagem Vermelha, (B) Linhagem GIFT, (C) Linhagem Supreme. T1: Tilápias submetidas por 30 dias a temperatura de 22°C (22 °C) e 120 dias subsequentes em temperatura de 28°C; T2: Tilápias cultivadas por 150 dias em temperatura de 28°C.

### 5.3. Análise morfológica do crescimento muscular

A Figura 17 ilustra seções transversais do músculo branco de tilápias aos 30 e 150 dias de cultivo. A Hematoxilina e Eosina foram eficazes na coloração do músculo esquelético branco nas diferentes linhagens de tilápia do Nilo, deixando evidentes as fibras musculares (f) e os seus respectivos núcleos (n). As características morfológicas das fibras musculares são semelhantes em todos os peixes, sendo distribuídas em mosaico caracterizadas por fibras de diferentes formatos e tamanhos.

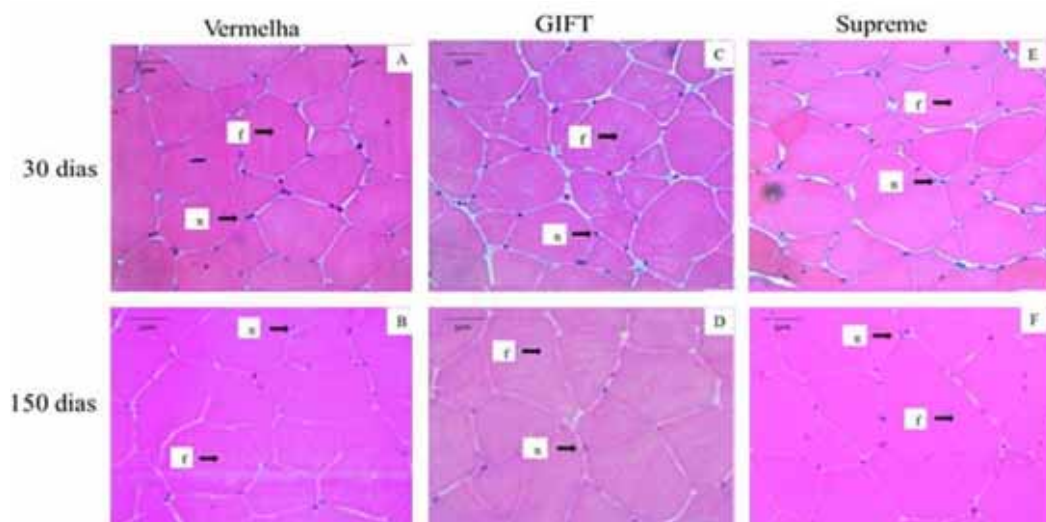


FIGURA 17. Seções transversais do músculo branco de tilápias do Nilo das diferentes linhagens Vermelha (A e B), GIFT (C e D) e Supreme (E e F), cultivadas em temperatura de 28°C, nos períodos de coleta (30 e 150 dias). Fibra muscular (f), núcleo (n). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento: 30 dias (40x); 150 dias (10x). Barra: 5 µm.

A distribuição das fibras musculares em diferentes classes de diâmetros ou área é uma técnica padronizada em várias espécies, sendo utilizada como uma medida para determinar o recrutamento (hiperplasia) e hipertrofia de fibras musculares (Rowlerson e Veggetti, 2001). A Figura 18 mostra os dados referentes à distribuição dos diâmetros das fibras musculares nas classes estudadas, aos 30 dias de cultivo em T1 e T2. Em T1, a frequência de fibras na classe <20 µm foi maior para as linhagens Vermelha e Supreme. Na linhagem GIFT observou-se maior frequência na classe 20-50 µm quando comparada com as linhagens Vermelha e Supreme.

Em T2, não foram encontradas diferenças na distribuição de fibras entre as linhagens de tilápia nas classes estudadas. Comparando T1 e T2, observamos que as linhagens Vermelha e Supreme em T1 apresentaram maior frequência de fibras na classe <20 µm e menor na classe 20-50 µm. Porém, para a linhagem GIFT, a baixa temperatura não impediu o desenvolvimento e crescimento muscular, tendo em vista a maior porcentagem de fibras na classe 20-50 µm. Essa linhagem também apresentou maior peso corporal, embora não significativo.

Entre os fatores extrínsecos que influenciam o desempenho nos peixes, estudos tem demonstrado que a variação da temperatura pode comprometer o metabolismo, a reprodução, a taxa de alimentação e o crescimento (Fry, 1971), sendo que temperaturas mais altas aceleram o crescimento (Kieffer et al., 2013). Esse fato pode explicar o maior peso obtido pelas 3 linhagens em T2, aos 30 dias, que foram cultivadas na temperatura de 28°C. Macqueen et al., 2008 também observaram que baixas temperaturas (2°C) comprometeram o ganho de peso, o desenvolvimento e crescimento muscular em juvenis de salmão (*Salmo salar*).

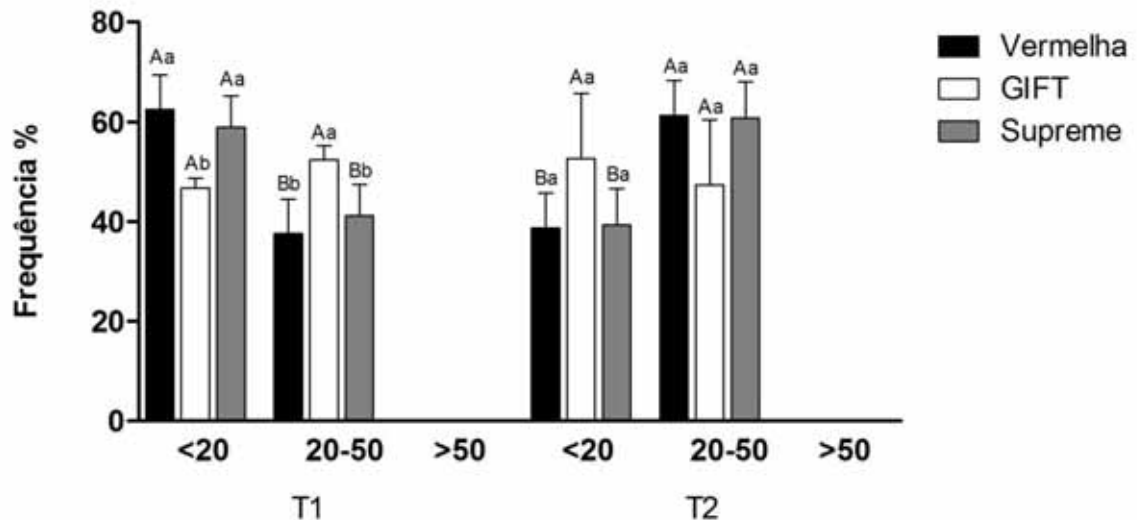


FIGURA 18. Gráficos de distribuição de frequência (%) das classes de diâmetros das fibras brancas aos 30 dias, nas linhagens Vermelha, GIFT e Supreme. (A): Tratamento 1 (cultivo na temperatura de 22°C com pós cultivo na temperatura de 28°C); (B): Tratamento 2 (temperatura de 28°C). Letras maiúsculas comparam as classes entre os tratamentos e minúsculas comparam as linhagens dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.

O crescimento muscular nos peixes envolve uma população de células miogênicas (células satélites) que quando ativadas, proliferam e fornecem núcleos que são responsáveis pelo crescimento muscular que ocorre por dois mecanismos: a hiperplasia (recrutamento de novas fibras musculares) e hipertrofia (aumento do diâmetro/área das fibras musculares) (Koumans e Akster de 1995; Zimmerman and Lowery, 1999; Johnston et al., 2011). No nosso estudo, considerando-se as três linhagens aos 30 dias, podemos inferir que para a linhagem GIFT, a maior porcentagem de fibras na classe 20-50 μm é um indicativo que a temperatura de 22°C acelerou o crescimento muscular pelo mecanismo de hipertrofia das fibras. Já, para as linhagens Vermelha e Supreme, a temperatura de 22°C pode ter impedido o processo de crescimento muscular hipertrófico.

As alterações no crescimento e celularidade muscular dependentes do efeito da temperatura de cultivo em teleósteos têm mostrado ser altamente dependente da espécie (Campos et al. 2013). Esses mesmos autores observaram que larvas de *Solea senegalensis* incubadas por 30 dias na temperatura de 15°C apresentaram a maioria das fibras com diâmetro pequeno e o número total de fibras menor quando comparadas com larvas mantidas em temperaturas maiores (18 e 21°C). Juvenis de robalo (*Centropomus parallelus*) cultivados em

temperaturas mais baixas mostraram maior capacidade de recrutar novas fibras (hiperplasia) do que os juvenis de temperaturas mais altas (Alami-Durante et al., 2007). Dados obtidos no nosso laboratório demonstraram que baixas temperaturas (24°C) para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) promoveram um retardo no crescimento muscular aos 60 dias de cultivo (Gutierrez de Paula et al., 2013), fato também observado no presente experimento, aos 30 dias de cultivo, para as linhagens Vermelha e Supreme na temperatura de 22°C.

Aos 150 dias de cultivo observou-se o aparecimento da classe de diâmetros de fibras >50 µm e uma diminuição na frequência de fibras na menor classe de diâmetro, indicando a ocorrência de crescimento muscular por hipertrofia nos dois tratamentos (Figura 19). Não houve diferença entre as linhagens na distribuição de frequência das fibras nas classes de diâmetros nos dois tratamentos. Entretanto, T1 apresentou maior frequência de fibras na classe <20 µm nas linhagens Vermelha e GIFT em relação à T2. A linhagem Vermelha apresentou maior frequência de fibras na classe de 20-50 µm em T1 comparado com T2.

Os resultados observados no nosso estudo demonstram que, o cultivo das 3 linhagens de tilápia por 30 dias em temperatura mais baixa (22°C), não prejudicou o crescimento muscular quando os peixes foram pós cultivados em temperatura mais elevada (28°C), temperatura considerada dentro da faixa ideal de cultivo da espécie (El-Sayed et al., 2008), caracterizando o crescimento compensatório. É possível que a maior frequência de fibras com diâmetro <20 µm nas linhagens estudadas em T1 esteja relacionada com o recrutamento mais tardio de fibras para o crescimento muscular, e pode explicar, em parte, a sobrecompensação observada na linhagem GIFT.



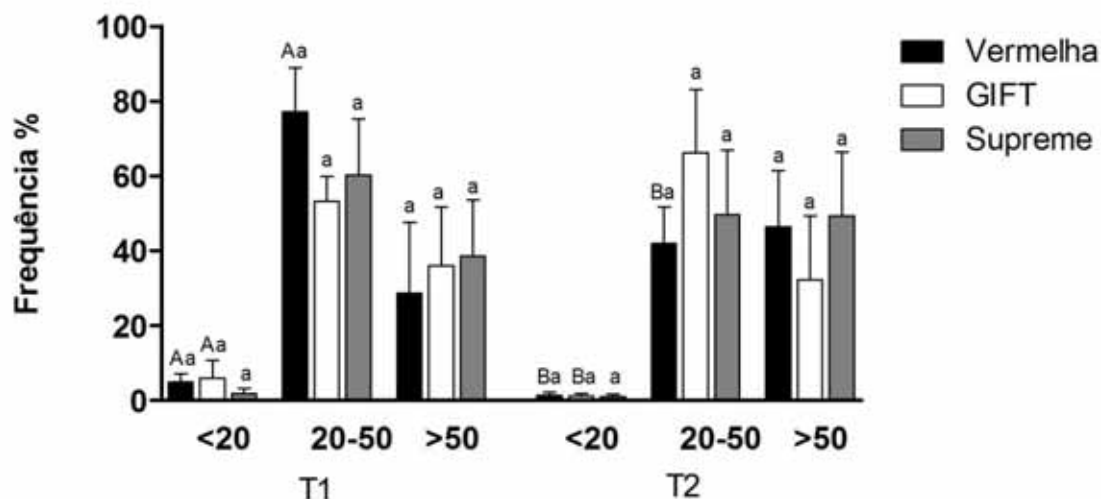


FIGURA 19. Gráficos de distribuição de frequência (%) das classes de diâmetros das fibras brancas aos 150 dias, nas linhagens Vermelha, GIFT e Supreme. (A): Tratamento 1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28°C); (B): Tratamento 2 (temperatura de 28 °C). Letras maiúsculas comparam as classes entre os tratamentos e minúsculas comparam as linhagens dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.

#### 5.4. Análise da expressão gênica: MyoD, Miogenina e Miostatina

Neste estudo, os níveis de MyoD não apresentaram diferença estatística entre as linhagens Vermelha, GIFT e Supreme e entre os tratamentos T1 e T2 aos 30 dias de cultivo (Figura 20A). Entretanto, após 150 dias de cultivo, a linhagem Supreme em T1 apresentou níveis de expressão superiores aos da linhagem Vermelha, que foi semelhante à linhagem GIFT (Figura 20B).

Vários estudos demonstram que a temperatura da água de cultivo pode influenciar a expressão dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs), os quais controlam o desenvolvimento e crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico da musculatura. São descritos quatro MRFs: MyoD e Myf5, envolvidos com a proliferação, Miogenina e MRF4, envolvidos com a diferenciação das células miogênicas (Rescan, 2001; Johansen e Overturf, 2005).

Wilkes et al., (2001), observou que as larvas de trutas que foram incubadas em temperaturas mais frias (4°C), apresentaram níveis de MyoD e Miogenina mais elevados do que aquelas larvas que foram incubadas em temperaturas mais elevadas 8° e 12°C. Porém, isso pode ser uma característica inerente da espécie, podendo ocorrer diferentemente em espécies de clima temperados e tropicais. Gutierrez de Paula et al. (2013), demonstraram que juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), cultivados em temperatura de 24°C apresentaram maior

expressão de MyoD, quando comparados àqueles cultivados na temperatura de 28°C, aos 30 e 60 dias de cultivo, fato que foi associado com a proliferação de células satélites musculares envolvidas com o recrutamento de novas fibras musculares, demonstrado pela maior proporção de fibras musculares pequenas.

Apesar de aos 30 dias de cultivo os níveis de expressão da MyoD não apresentarem diferenças entre T1 e T2, esses foram suficientes para promover o desenvolvimento e crescimento das fibras musculares. Adicionalmente, aos 150 dias, a linhagem Vermelha apresentou diferença na expressão entre T1 e T2 (Figura 20B), sendo maior em T2, e isto pode estar relacionado com a hipertrofia muscular que está ocorrendo nesse período.

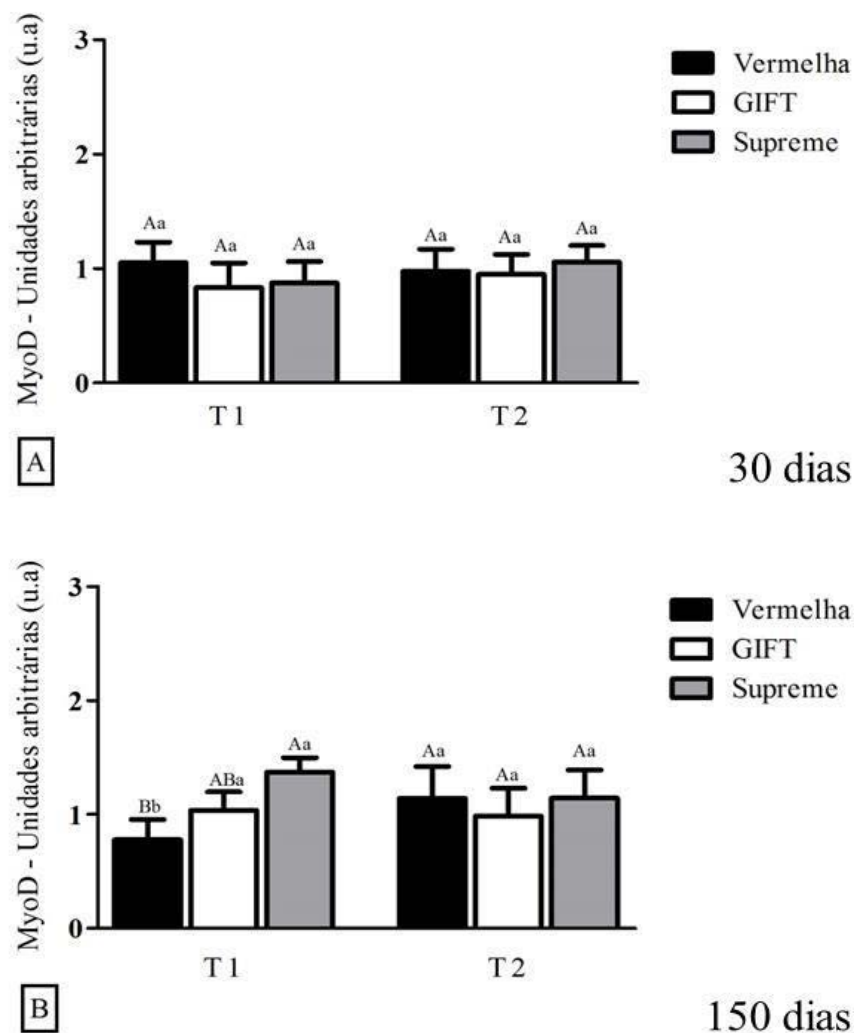


FIGURA 20. Expressão gênica da MyoD nas linhagens de tilápia do Nilo durante o experimento. (A) tilápias cultivadas nas temperaturas de 22°C (T1) e 28°C (T2), por 30 dias. (B) tilápias cultivadas na temperatura de 28°C por 150 dias. T1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28 °C); T2 (temperatura de 28 °C). Letras maiúsculas comparam linhagens no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam a mesma linhagem entre os diferentes tratamentos. Letras maiúsculas e minúsculas não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.

Aos 30 dias do experimento, a expressão da Miogenina em T1 foi menor na musculatura dos peixes da linhagem GIFT comparada com a expressão nas linhagens Vermelha e Supreme, que foram semelhantes. Adicionalmente a linhagem GIFT apresentou menores níveis de expressão em T1 quando comparada com a expressão em T2. Não foram observadas diferenças na expressão entre as linhagens em T2 (Figura 21A).

Aos 150 dias do experimento, a expressão da Miogenina em T1 foi menor na musculatura dos peixes da linhagem GIFT comparada com a expressão nas linhagens Vermelha e Supreme, que foi semelhante. Não foram observadas diferenças na expressão entre as linhagens em T2 e entre os tratamentos. (Figura 21B).

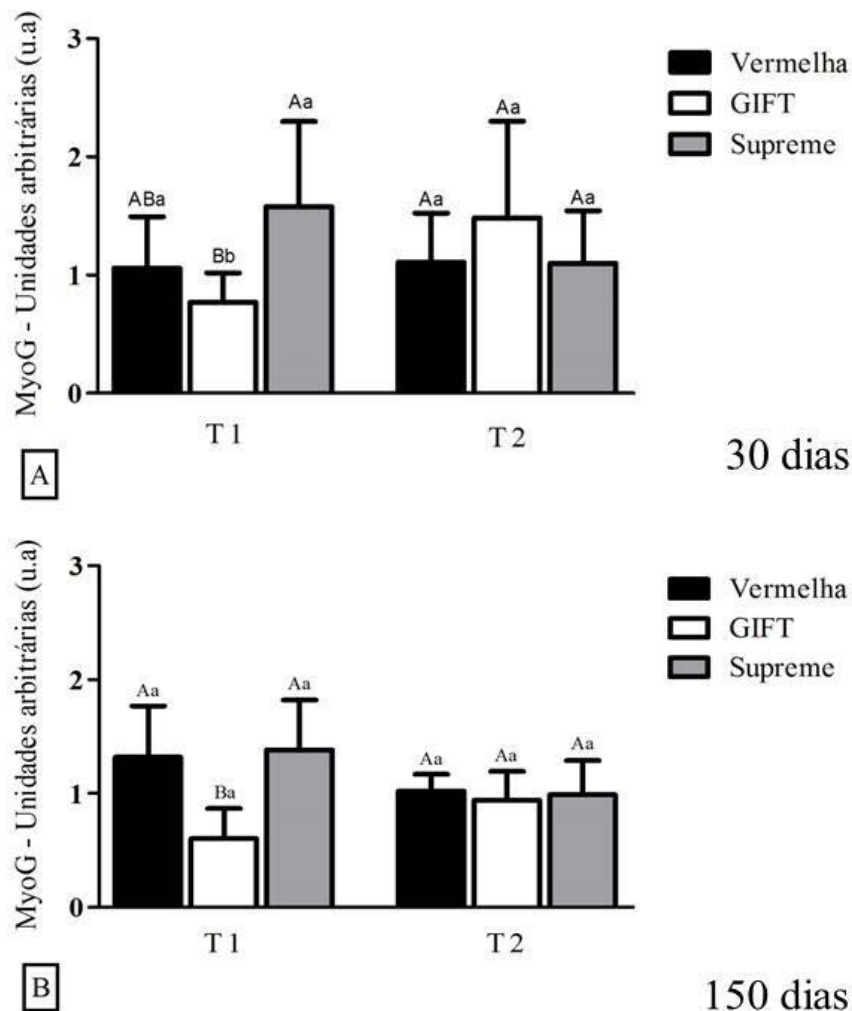


FIGURA 21. Expressão gênica da Miogenina (MyoG) nas linhagens de tilápia do Nilo durante o experimento. (A) tilápias cultivadas nas temperaturas de 22°C (T1) e 28°C (T2), por 30 dias. (B) tilápias cultivadas na temperatura de 28°C por 150 dias. T1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28 °C); T2 (temperatura de 28 °C). Letras maiúsculas comparam linhagens no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam a mesma linhagem entre os

diferentes tratamentos. Letras maiúsculas e minúsculas não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.

A Miogenina (MyoG) tem um importante papel no desenvolvimento e crescimento muscular, pois ela é expressa em células na fase de fusão e diferenciação dos mioblastos, contribuindo assim, com a hiperplasia e hipertrofia muscular (Watabe, 1999). Wilkes et al., 2001, observaram aumento na expressão de MyoD e Miogenina em larvas de truta cultivadas em temperatura de 4°C comparada com aquelas cultivadas em temperatura de 8°C. Gutierrez de Paula et al. (2013), observaram no pacu, cultivado por 60 dias na temperatura de 28°C maior expressão da Miogenina comparado com aqueles cultivados em temperatura de 32°C. No nosso estudo, para as linhagens Vermelha e Supreme, a temperatura baixa por 30 dias e o pós cultivo em temperatura mais elevada não alterou a expressão da Miogenina, cujos níveis foram semelhantes ao T2 e possibilitaram o crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico. Para a Linhagem GIFT, a diminuição da expressão da Miogenina em T1 aos 30 dias de cultivo, é um indicativo que a baixa temperatura alterou o processo de diferenciação das fibras musculares, fato que pode explicar a maior frequência de fibras na menor classe de diâmetro nessa linhagem. Adicionalmente durante o mesmo período de cultivo, o aumento na expressão da Miogenina em T2 pode estar relacionado com a maior diferenciação das fibras pelo processo de hiperplasia, conforme indica a frequência de fibras na classe <20 µm. Já, a baixa expressão da Miogenina na linhagem GIFT em T1 ao final do experimento não alterou o processo de diferenciação das fibras, que foi similar entre as linhagens.

Os níveis de Miostatina aos 30 dias de cultivo foram semelhantes entre as diferentes linhagens e entre os diferentes tratamentos não apresentando diferenças significativas entre os mesmos (Figura 22A). Já, aos 150 dias de cultivo a linhagem Supreme apresentou maior nível de expressão comparada à Linhagem GIFT. Adicionalmente, a linhagem Supreme em T1 apresentou maior nível de expressão em relação aos peixes da mesma linhagem em T2.

A Miostatina é um membro da superfamília dos TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor -  $\beta$* ), e é considerado um fator de crescimento essencial por promover a regulação do crescimento do músculo estriado esquelético (McPherron et al., 1997). Alguns trabalhos sugerem que a Miostatina inibe a

proliferação e a diferenciação das células precursoras miogênicas, ativando proteínas que inibem o ciclo celular (Thomas et al., 2000), sendo também expressa pelas células miogênicas quiescentes (McCroskery et al., 2003).

Embora alguns estudos tenham mostrado um crescimento muscular mais acentuado após a inibição da Miostatina (Lee et al., 2009; Medeiros et al., 2009), outros não observaram essa correlação (Acosta et al., 2005; Sawatari et al., 2010). Por outro lado, os trabalhos têm mostrado resultados contraditórios em relação ao papel da Miostatina no crescimento muscular em peixes. Segundo Rios et al. (2002), a Miostatina inibe a expressão dos MRFs, em peixes. Já, Seilliez et al. (2012), observaram que células satélites tratadas com Miostatina em cultura não alteraram a expressão dos MRFs (MyoD e Miogenina). Conforme relatado por Campos et al. (2013) e Gutierrez de Paula et al. (2013), pode haver uma relação direta entre expressão dos MRFs (MyoD e Miogenina) e de Miostatina, demonstrando que a sua ação em algumas condições pode ser limitada. Isso foi também observado no presente estudo, onde os níveis de Miostatina não apresentaram diferenças aos 30 dias de cultivo entre as linhagens dentro do mesmo tratamento e entre T1 e T2.

Já, aos 150 dias de cultivo em T1, a linhagem Supreme apresentou maior nível de expressão comparada à Linhagem GIFT, e maior nível de expressão em relação aos peixes da mesma linhagem em T2. A menor expressão de Miostatina na linhagem Supreme em T2 comparada com T1 aos 150 dias, pode ter influenciado o crescimento muscular nesse período, independente do aumento na expressão dos MRFs, fato que poderia explicar o maior peso da linhagem no final do experimento. Não foram observadas diferenças entre as linhagens em T2.

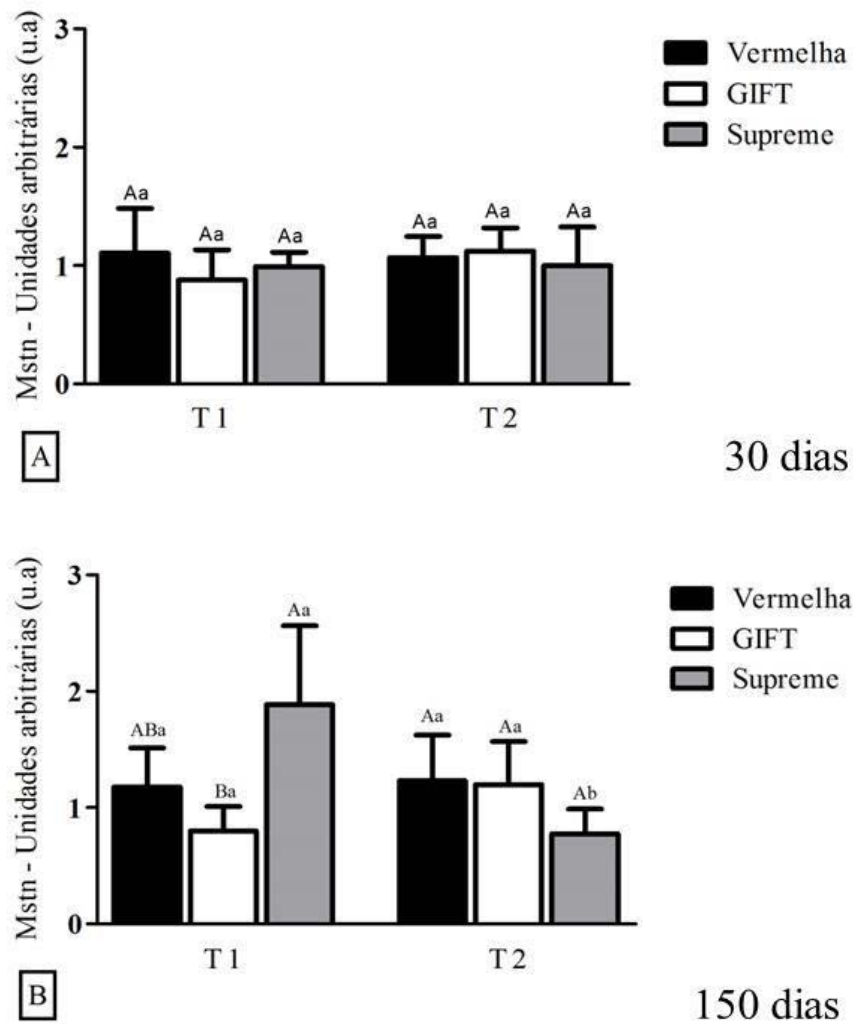


FIGURA 22. Expressão gênica da Miostatina (Mstn) nas linhagens de tilápia do Nilo durante o experimento. (A) tilápias cultivadas nas temperaturas de 22°C (T1) e 28°C (T2), por 30 dias. (B) tilápias cultivadas na temperatura de 28°C por 150 dias. T1 (cultivo na temperatura de 22 °C com pós cultivo na temperatura de 28°C); T2 (temperatura de 28 °C). Letras maiúsculas comparam linhagens no mesmo tratamento e letras minúsculas comparam a mesma linhagem entre os diferentes tratamentos. Letras maiúsculas e minúsculas não são iguais segundo os testes estatísticos adotados.

## 6. CONCLUSÃO

Nas três linhagens de tilápia de Nilo estudadas, a baixa temperatura de cultivo (22°C), por curto período de tempo (30 dias), promoveu o crescimento compensatório, alterou a expressão dos genes Miogenina e Miostatina, alterando a hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares. Esses dados podem ser utilizados como uma ferramenta tecnológica para a obtenção de melhores ganhos na produção

## 7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro concedido e pela bolsa de mestrado processo nº 2011/16076-0.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, J., CARPIO, Y., BORROTO, I., GONZÁLEZ, O., ESTRADA, M.P. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. **J. Biotechnol.** 119, 324–331. 2005.

AGUIAR, D. H., BARROS, M. M., PADOVANI, C. R., PEZZATO, L. E. AND DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal of Fish Biology** 67, 1287–1298. 2005.

ALAMI-DURANTE, H.; FAUCONNEAU, B.; ROUEL, M.; ESCAFFRE, A. M.; BERGOT, P. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate. **Journal of Fish Biology** 50, 1285-1302. 1997.

ALEXANDER, R. "The orientation of muscle in the myomeres of fishes." **J. Mar. Biol. Asso. UK**, Cambridge. 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**, 4:147-190; 2003.

ALMEIDA, F. L. A.; CARVALHO, R. F.; PINHAL, D. ET AL. 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 - 11. 2008.

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

AYALA, M.D.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; GIL, F. Crecimiento muscular en larvas de lubina atlántica, *Dicentrarchus labrax* L., cultivadas a diferentes temperaturas. **An. vet (murcia)**. Vol 17, p. 81-89. 2001.

ALTRINGHAM, J. D., AND I.A. JOHNSTON. "Quantitative histochemical studies of the peripheral innervation of cod (*Gadus morhua*) fast myotomal muscle fibres." **Journal of Comparative Physiology A** 143(1): 123-127, 1981.

ALTRINGHAM, J. D., AND D J ELLERBY. "Fish swimming: patterns in muscle function." **The Journal of experimental biology** 202(Pt 23): 3397-403 1999.

BENTSEN, H.B., A.E. EKNATH, M.S. PALADA DE VERA, J.C. DANTING, H.L. BOLIVAR, R.A. REYES, E.E. DIONISIO, F.M. LONGALONG, A.V. CIRCA, M.M. TAYMEN, AND B. GJERDE. "Genetic improvement of farmed tilápias: growth performance in a complete diallel cross experimente with eight strain of *Oreochromis niloticus*" . **Aquaculture** 160: 145:173. 1998.

BUCKINGHAM, M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. **Comptes Rendus Biologies**. 330(6-7): 530-3. 2007.

CAMPOS, C., VALENTE, L.M.P., CONCEIÇÃO, L.E.C., ENGROLA, S., SOUSA, V., ROCHA, E., FERNANDES, J.M.O. Incubation temperature induces changes in muscle cellularity and gene expression in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Gene**. 516, 209–217. 2013.

CHARGÉ, S.B.P. AND RUDNICKI, M.A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. **Physiol Rev**. 84: 209-238. 2004.

CHRIST, B., ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anat. Embryol**. 191, 381-396. 1995.

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

DEVOTO, S.H., MELANÇON, E., EISEN, J.S., WESTERFIELD, M. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. **Development**. 122, 3371-3380. 1996.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3th ed. New York: Wiley. 1998.

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.

EL-SAYED, A.F.M. Tilapia culture. **Aquaculture**. King's Lynn: Cabi. pp. 2-293. 2006.



EL-SAYED, A.F.M.; AND KAWANNA, M. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. **Aquaculture Research**. 39: 670-672. 2008.

FAUCONNEAU, B.; ANDRÉ, S.; CHMITILLY, J.; LEBAIL, P. Y.; KRIEG, F.; KAUSHIK, S. J. Control of skeletal muscle fibres and adipose cells size in the flesh of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**. 50, 296-314. 1997.

FITZHUGH Jr., H. A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shapes. *Journal of Animal Science*, Champaign, 42 (4), 717-725, 1976.  
FRY, F.E.J. The effect of environmental factors on the physiology on fish. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), **Fish physiology**, vol VI. Academic Press, New York, pp. 1–98. 1971.

GALLOWAY, T. F.; KJØRSVIK, E.; KRYVI, H. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. **Journal of Experimental Biology** 202, 2111-2120. 1999.

GEMBALLA, S. E VOGEL, F. Spatial arrangement of white muscle fibers and myoseptal tendons in fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 133(A): 1013.1037. 2002.

HAJEK, B. F.; BOYD, C. E. Rating soil and water information for aquaculture. **Aquacultural Engineering**. 13, 115-128. 1994.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas – uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, jan./jun. 1995.

GUTIERREZ DE PAULA, T., Almeida, F. L. A., CARANI, F.R., VECHETTI-JUNIOR, I.J., PADOVANI, C.R., SALOMÃO, R. A. S., MARECO, E. A., SANTOS, V. B., DAL-PAI SILVA, M. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. 169 (2014) 31–37. 2013.

JI, S.Q., LOSINSKI, R.L., CORNELIUS, S.G., FRANK, G.L., WILLIS, G.M., GERRARD, D.E., DEPREUX, F.F.S., SPURLOCK, M.E. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 44, 1265-1273. 1998.

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. 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., MCLAY, H. A. Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Canadian Journal of Zoology** 75, 64-74. 1997.

JOHNSTON, I. A.; COLE, N. J.; ABERCROMBY, M.; VIEIRA, V. L. A. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. **J. Exp. Biol.** 201, 623-686. 1998.

JOHNSTON, I. A., STRUGNELL, G., MCCRACKEN, M. C., JOHNSTONE, R. Muscle growth and development in normal-sex ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. **Journal of Experimental Biology** 202, 1991-2016. 1999.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. **Aquaculture**. Vol 177, p. 99-115, 1999.

JOHNSTON, I.A.; ALDERSON, R.; SANDHAM, C.; MITCHELL, D.; SELKIRK, C.; DINGWALL, A.; NICKELL, D.; BAKER, R.; ROBERTSON, B.; WHYTE, D.; SPRINGATE, J. Patterns of muscle growth in early and late maturing populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**. Vol. 189, p. 307-333. 2000.

JOHNSTON, I.A.; HALL, T.E. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. **American Fisheries Society Symposium**. V.40: 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.; BOWER, N.I.; AND MACQUEEN, D.J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, 214(Pt 10), 1617-28. 2011.

KIESSLING, A.; STOREBAKKEN, T.; ÅSGÅRD, T.; KIESSLING, K. –H. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. **Aquaculture** 93, 335-356. 1991.

KIEFFER, J.D., PENNY, F.M., PAPADOPOULOS, V. Temperature has a reduced effect on routine metabolic rates of juvenile shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). **Fish Physiol. Biochem.** 013, 9865–9868. 2013.

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

KOUMANS, J.T.M.; ASKER, H.A. Myogenic cells in development and growth of fish. **Comparative Biochemistry and Physiology** Vol 110 A, p. 3-20. 1995.

KUBITZA, F. Sistemas de recirculação: Sistemas fechados com tratamento e reuso da água. **Panorama da Aquicultura**. V.16: 95, p. 15-22. 2006.

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.

LEE, CHIOU-YUEH ET AL. “Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish.” **Biochemical and biophysical research communications** 387(4): 766-71, 2009.

LÓPEZ-ALBORS, O.; AYALA, M.D.; GIL, F.; GARCIA-ALCÁZAR; ABELLÁN, E.; LATORRE, R.; RAMÍREZ-ZARZOSA, G.; VÁZQUEZ, J.M. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juvenile stages. **Aquaculture**. 220: 385-406. 2003.

MA, P.C., ROULD, M.A., WEINTRAUB, H., PABO, C.O. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. **Cell**. 77, 451-459. 1994.

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.

MCCROSKERY S, THOMAS M, MAXWELL L, SHARMA M, KAMBADUR R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **J Cell Biol**. Sep 15;162(6):1135-47. 2003.

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.

MACQUEEN, D.J., ROBB, D., JOHNSTON, I.A. Temperature until the ‘eyed stage’ of embryogenesis programmes the growth trajectory and muscle phenotype of adult Atlantic salmon. **Biol. Lett.** 4, 294–298. 2008.

MEDEIROS, E.F., PHELPS, M.P., FUENTES, F.D., BRADLEY, T.M. Over expression of follistatin in trout stimulates increased muscling. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 297, 235–242. 2009.

Ministério da Pesca e Aquicultura  
<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/producao>. 2010.

MÜLLER, U K ET AL. “How the body contributes to the wake in undulatory fish swimming: flow fields of a swimming eel (*Anguilla anguilla*).” **The Journal of experimental biology** 204(Pt 16): 2751-62, 2001.

NATHANAILIDES, C.; LOPEZ-ALBORS, O.; STICKLAND, N. C. Influence of pre-hatch temperature on the development of muscle cellularity in post-hatch Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Can. J. Fish Aquat. Sci.** 52, 675-680. 1995.

PELEGRI, F. The role of maternal factors in early zebrafish development. (C. Leong e K. Vanya, Eds.) in fish development and genetics the zebrafish and medaka models. **World Scientific Publishing**. 2nd ed., pp. 1-38. 2004.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia: life history and biology. Local: SRAC- Southern Regional Aquaculture Center, (Publication 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.

ROMANELLO, M.G.; SCAPOLO, P.A.; LUPRANO, S.; MASCARELLO, F. Post-larval growth in the lateral white muscle of the eel, *Anguilla anguilla*. **Journal of Fish Biology**. Vol 30, p. 161-172. 1987.

ROWLERSON, A.; MASCARELLO, F.; RADAELLI, G.; VEGGETTI, A. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**. 16, 223-236. 1995.

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.

SANTOS, V.B; YOSHIHARA, E.; FREITAS, R.T.F.; REIS NETO, R.V. Exponential growth model of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strain considering heteroscedastic variance. **Aquaculture**. V.274. n.1. p. 96-100. 2008.

SANTOS, V.B.; MARECO, E.A.; SILVA, M.D.P. Growth curves of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strain cultivated at different temperatures. **Acta Scientiarum**. V.35i3: 19443. 2013.

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.

SAWATARI, E., SEKI, R., ADACHI, T., HASHIMOTO, H., UJI, S., WAKAMATSU, Y., NAKATA, T., KINOSHITA, M. Over expression of the dominant-negative form of myostatin results in doubling of muscle-fiber number in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** 155, 183–189. 2010.

SEILIEZ, I., SABIN, N., GABILLARD, J.-C. Myostatin inhibits proliferation but not differentiation of trout myoblasts. **Mol. Cell. Endocrinol.** 351, 220–226. 2012.

SIFA, L.; CHENHONG, L.; AND DEY, M. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in China. **Science.** 213: 123-129. 2002.

STICKLAND, N. C., WHITE, R. N., MESSALL, P., CROOK, A. R., THORPE, J. E. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Anat. Embryol.** 178, 253-257. 1988.

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

USHER, M.L.; STICKLAND, N.C.; THORPE, J.E. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. **Journal of Fish Biology.** Vol 44, p. 953-964. 1994.

VALENTE, L. M.; 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**, 55, 675-691. 1999.

VAN LEEUWEN, JOHAN L. "A Mechanical Analysis of Myomere Shape in Fish." **Journal of Experimental Biology** 3414: 3405-3414, 1999.

VASYUTINA, E.; LENHARD, D.C. AND BIRCHMEIER, C. Notch function in myogenesis ND SC RIB. **Cell Cycle**, 1451-1454. 2007.

VEGGETTI, A.; MASCARELLO, F.; SCAPOLO, P. A. ROWKERSON, A. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.). An ultrastructural and morphometric study. **Anat. Embryol.** 182, 1-10. 1990.

VIEIRA, V. L. A., JOHNSTON, L. A. Influence of temperature on muscle-fibre development in larvae of the herring *Clupea harengus*. **Mar. Biology** 112, 333-341. 1992.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. **Journal of Fish Biology.** 55: 1-18. 1999.

WEATHERLEY, A.H.; GILL, H.S. Growth dynamics of white myotomal muscle fibres in the bluntnose minnow, *Pimephales notatus* Rafinesque, and comparison with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**. Vol. 25, p. 13-24. 1984.

WEATHERLEY, A.H.; GILL, H.S. Dynamics of increase in muscle fibres in relation to size and growth. **Experientia**. 41: 353-354. 1985.

WEATHERLEY, A.H.; GILL, H.S.; LOBO, A.F. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibres in teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. **Journal of Fish Biology**. Vol. 33, p. 851-859. 1988.

WILKES, D.; XIE, S. Q.; STICKLAND, N. C.; ALAMI-DURANTE, H.; KENTOURI, M.; STERIOTI, A.; KOUMOUNDOUROS, G.; FAUCONNEAU, B.; AND GOLDSPINK, G. Temperature and myogenic factor transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*dicentrarchus labrax*). **The Journal of Experimental Biology**. 204: 2763–2771. 2001.

WON, E.T. AND BORSKI, R. J. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. **Front. Endocrinology**. 4: 74. 2013.

WORKAGEGN, K.B. Evaluation of growth performance, feed utilization efficiency and survival rate of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at diferente water temperature. **International Journal of Aquaculture**. V.2: n.9 59-64. 2012.

ZHANG, G., D M SWANK, AND L C ROME. "Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenotomus chrysops*." **Journal of morphology** 229(1): 71-81, 1996.

ZHANG, S.; BHATTACHARYA, H. AND LI, H. Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Bony Fishes). **Nature**. 2001.

ZIMMERMAN, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aquicultura**. V.13: 76, p.69. 2003.

ZIMMERMAN, A.M., LOWERY, M.S. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). **J. Exp. Zool.** 284,299–308. 1999.