

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A EXPRESSÃO DE FATORES MIOGÊNICOS NO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

TASSIANA GUTIERREZ DE PAULA

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

Orientadora: Dra. Maeli Dal Pai

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A EXPRESSÃO DE
FATORES MIOGÊNICOS NO MÚSCULO ESTRIADO
ESQUELÉTICO DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

TASSIANA GUTIERREZ DE PAULA

Orientadora: Dra. MAELI DAL PAI

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

Orientadora: Dra. Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Paula, Tassiana Gutierrez.

Efeito da temperatura sobre a expressão de fatores miogênicos no músculo estriado esquelético do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Tassiana Gutierrez Paula. - Botucatu, 2013

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

Orientador: Maeli Dal Pai

Capes: 20601000

1. Pacu (Peixe) – Criação. 2. Peixe – Efeito da temperatura da água. 3. Sistema musculoesquelético. 4. Produção animal.

Palavras-chave: Fatores regulatórios miogênicos; Músculo esquelético; MyoD; Produção animal; Temperatura de cultivo.

Dedicatória

Dedico este trabalho a uma pessoa que acreditou em mim e no meu potencial para a realização deste projeto antes mesmo que eu soubesse da capacidade de lutar com as minhas limitações. A você minha querida professora, educadora, orientadora e, principalmente amiga, Maeli Dal Pai, meu muito obrigada de coração. Poucos são privilegiados como eu por ter tido a sorte de conviver com uma pessoa tão generosa, dedicada, eficiente, objetiva e diligente como à senhora. Muito obrigada MESMO! Sua ajuda e incentivo a cada momento que titubiei e pensei que não teria mais forças para continuar foram de extrema importância para o meu crescimento profissional e pessoal. A senhora é um exemplo de pessoa que quero levar comigo para todo o sempre. OBRIGADA!

Aos meus pais, Miguel Donato de Paula e Kira Gutierrez, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

Aos meus irmãos, Miguel Ângelo (Mitio) e Alberto (Tucho), exemplos de dignidade, bondade e caráter.

Agradecimentos especiais

As Fernandas (Losi e Carani), pessoas inesquecíveis que cruzaram o meu caminho e tiveram a paciência, a dedicação e humildade ao me ensinarem o "B"A"B"A" na bancada e fora dela. Vocês foram importantíssimas para o meu crescimento profissional e pessoal, agradeço todos os dias em tê-las conhecido, foram e sempre serão muito especiais para mim. Obrigada por TUDO mesmo!!!!

Ao meu querido amigo Marcelo Pereira de Barros (primeiro orientador) por todo incentivo, pela força, pela sua capacidade de fazer da pesquisa uma paixão e de me ensinar a ver este mundo desta maneira.

A minha meia irmã Juliana Giusti, pelo carinho, pelo apoio nos momentos de dificuldades, pelas palhaçadas que sempre me arrancaram sorrisos e por todos os bolos deliciosos feitos nos momentos inesperados.

Ao Rafael Bossano, um amigo que com o tempo passou ao cargo de irmão, pelo carinho que sempre demonstrou com pequenos gestos e palavras, pelos momentos compartilhados, pelo bom humor constante e pela vibração em cada uma das minhas conquistas.

Ao meu querido amigo Leonardo Nazario de Moraes, pelo carinho, pela paciência, pelos ensinamentos e parceria em todas as corridas realizadas no Lageado nos momentos de estresse. Valeuuu Leo!

Ao meu querido amigo Ivan Vechetti pelas alegrias, pelo carinho, pelos ensinamentos e por toda energia positiva que sempre dedica aos que estão a sua volta. Sua humildade me encanta Ivan!

A minha querida amiga Raquel Bertaglia, pelos sábios conselhos, pelo lindo sorriso que sempre oferece independente de como foi o seu dia e pelo companheirismo diário.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento desse projeto (Processo n° 2011/14538-7).

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (Carani, Bertaglia, Vechetti, Fanfas, Duran, Souza (balaqueiro), Jason, Canja, Flávia Fernandes, Edson Mareco, Rondi Salomão, Paula, Paulinha, Thiago Diniz), por serem a minha segunda família e por fazerem eu me sentir tão bem no laboratório. Obrigada pelos momentos de alegria compartilhados, pelo companheirismo, pelos agradáveis e inesquecíveis momentos de convivência.

Aos meus queridos amigos dos laboratórios vizinhos Doí, Joyce, Mari Antunes, Jaque Rinaldi, Lesma, e Pei por todos os momentos de alegria proporcionados dentro e forada UNESP, por serem sempre tão prestativos e profissionais.

Ao professor Dr. Robson Carvalho, pelo incentivo, profissionalismo e boa vontade em ajudar em todas as vezes que eu o procurei para sanar alguma dúvida.

Ao pesquisador Dr. Vander Bruno dos Santos por disponibilizar o seu laboratório para a realização da parte experimental deste projeto.

Ao colegas Mareco e Salomão pelo auxílio no trabalho de campo e pela paciência com o meu humor nos dias de calor durante o período experimental.

À Raquel Mareco, pela hospitalidade e atenção em sua casa durante o período experimental.

Aos funcionários do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu por serem prestativos e estarem sempre presentes.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, torceram por mim e contribuíram para a realização desta dissertação. Como fala Vinícius de Moraes: 'Você não faz amigos, você os reconhece'. A todos esses amigos e amigas meu muito obrigada de coração.

CERTEZA...

"De tudo ficaram 3 coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

*A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar...*

Portanto devemos:

Fazer da interrupção... um novo caminho...

Da queda... um passo de dança...

Do medo... uma escada...

Do sonho... uma ponte...

Da procura... um encontro..."

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

ABSTRACT	Erro! Indicador não
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Organização da musculatura estriada esquelética nos peixes.....	9
1.2. Miogênese nos peixes	11
1.3. Controle molecular da miogênese	14
1.4. Crescimento muscular pós-embrionário em peixes.....	17
1.5. Controle molecular do crescimento muscular	21
1.6. Fatores de regulação miogênica (MRFs).....	21
1.7. Miostatina	22
1.8. Fatores que afetam o crescimento muscular	26
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Cultivo do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	34
3.2. Processamento das amostras:	35
3.3. Extração do RNA total	36
3.4. Tratamento do RNA com DNase.....	37
3.5. Transcrição Reversa (RT) do RNA total	37
3.6. Expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e miostatina	37
4. BIBLIOGRAFIA	40
CAPÍTULO 1	52

Abstract

Muscle growth in teleost fish involves the balance between the recruitment (hyperplasia) and the enlargement (hypertrophy) of muscle fibers, mechanisms that are controlled by many transcription factors, as the MyoD family and growth factors as myostatin. Several environmental factors such as temperature can influence the muscle fiber cellularity, and the expression of genes related with muscle development and growth, affecting the growth rate pattern in fish. Pacu is a fast growing fish extensively used in Brazilian aquaculture programs and shows a wide range of thermal tolerance. As temperature is an environmental factor that influences the fish growth rate, parameter directly related with muscle plasticity and growth, we hypothesized that different rearing temperatures in juvenile of pacu, which presents an intense muscle growth by hyperplasia, can potentially alter the muscle cellularity that could influence the muscle growth patterns in this species. The aim of this study is to analyze the muscle growth characteristics and the expression of Myogenic Regulatory Factors, MyoD and myogenin, and the growth factor myostatin in juvenile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to the different rearing temperatures. Juvenile fish (1.5 g weight) were distributed in tanks containing water and maintained at 24 (G24), 28 (G28) and 32 (G32)°C (three replicates for each group) during 60 days. At days 30 and 60, fish were anesthetized, euthanized and muscle samples (n=12) were collected for morphological, morphometric and gene expression analyses. At days 30, the body weight and the standard length were lower in fish reared at 24 °C. Muscle fiber frequency in the class <25µm was significantly higher in fish reared at 24 °C, compared to the fish reared at 28 and 32 °C. Considering the frequency distribution of muscle fiber diameter in the class >50 µm, fish reared at 28 and 32 °C showed similar results and these was higher than that observed in fish reared at 24 °C. MyoD gene expression was higher in fish reared at 24 °C compared to that reared at 28 and 32 °C. Myogenin and myostatin mRNA levels were higher in fish reared at 24 °C compared to that reared in the temperature of 28 °C. At 60 days, body weight and standard length were higher in G32. At the same way, the G28 had an increase in body weight and standard length compared to the G24. The frequency distribution of muscle fiber diameter in the class <25µm was higher in G24 comparing to G28 and G32. In the class >50 µm, fish from G32 showed a higher percentage compared to G24. MyoD mRNA levels were similar in G24 and G32, and were higher in comparison to the expression levels observed in G28; myogenin mRNA levels were similar between G24 and G28, and G24 and G32, but were higher in G28 compared to G32. Myostatin mRNA levels were similar between the temperatures studied. According to our results, we can conclude that low rearing temperature was able to change the expression of muscle growth-related genes in juvenile of pacu. Our study provides a clear example of thermally induced phenotypic plasticity in fish and shows that changing the rearing temperature during the juvenile stage of pacu can affect gene expression and muscle growth in this species.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*, Rearing temperature, Skeletal muscle growth, Myogenic Regulatory Factors, *Myostatin*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Organização da musculatura estriada esquelética nos peixes

Nos peixes, a maior parte da massa corporal é representada pelo tecido muscular estriado esquelético que constitui de 40 a 60% do peso total do animal. Essa abundante massa muscular não representa apenas um mecanismo específico para a adaptação desses animais ao meio aquático (Bone, 1978), mas também serve como principal estoque de proteínas a serem utilizadas em atividades que requerem grande demanda de energia (Weatherley e Gill, 1985).

Os principais músculos locomotores, nos peixes, são representados pelos músculos esqueléticos miotomais laterais. Na maioria das espécies, a musculatura miotomal está organizada em unidades morfofuncionais, os miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal, e são separados por bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos (Alexander, 1969) (Figura 1A). Os miosseptos transmitem, através dos tendões, a força de contração das fibras musculares para o esqueleto axial e a nadadeira caudal, resultando na ondulação e propulsão do corpo (Sänger e Stoiber, 2001). Esse padrão de organização anatômica da musculatura maximiza a eficiência mecânica dos músculos em relação à limitada capacidade de flexões do corpo no plano lateral (Patruno et al., 1998).

Os miômeros apresentam formato em “W” 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, e uma região mais profunda, com as fibras musculares apresentando uma disposição em hélice, formando ângulos maiores que 40° em relação ao eixo corporal (Figura 1B). Esse padrão peculiar de orientação das fibras musculares está relacionado com a necessidade de todas as fibras contraírem a uma mesma velocidade, qualquer que seja a sua posição dentro dos miômeros, para resultar na flexão do corpo (Alexander, 1969; Patruno et al., 1998; Sänger e Stoiber, 2001).

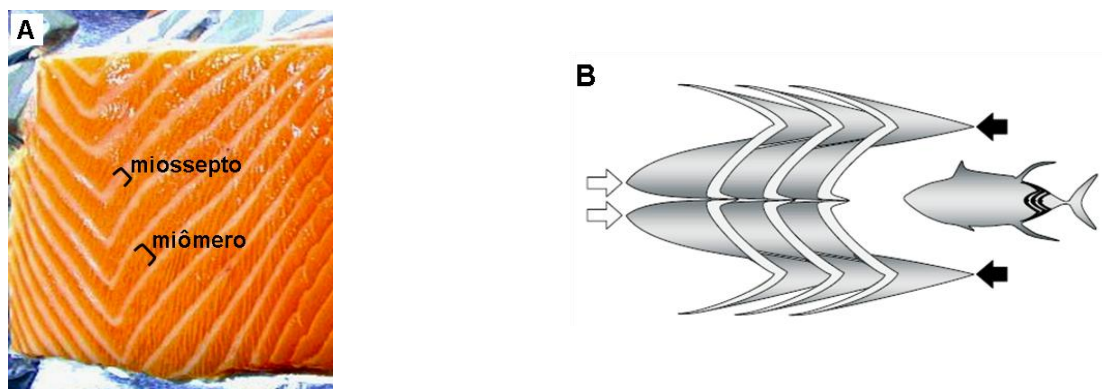


Figura 1.(A) Organização anatômica da musculatura estriada esquelética miotomal em miômeros, separados pelos miosseptos (imagem adaptada de <http://www.earthlife.net/fish/muscles.html>.) (B) Detalhe de três miômeros isolados, com formato em “W”, cada um apresentando uma região superficial (setas brancas) e profunda (setas em preto) (Katz, 2002).

Nos peixes, a extensão da força de contração da musculatura estriada esquelética é variável, dependendo do tipo de movimento executado, como movimentos sustentados ou de alta velocidade. Devido a essa capacidade funcional do sistema muscular, a musculatura estriada esquelética apresenta-se organizada em compartimentos ou camadas, contendo diferentes tipos de fibras musculares que possuem diferentes velocidades de contração (Rome et al., 1988; Sãnger e Stoiber, 2001). Os diferentes tipos de fibras musculares são evidenciados por técnicas histológicas e histoquímicas e apresentam-se organizados nos compartimentos vermelho (superficial), intermediário e branco (profundo) (van Raamsdonk et al., 1978, 1980; Johnston, 1981) (Figura 2).

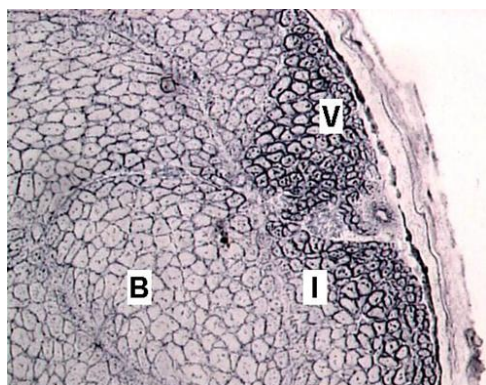


Figura 2. Corte transversal da musculatura estriada esquelética da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Compartimento vermelho superficial (V), compartimento intermediário (I) e compartimento branco profundo (B). Reação NADH-TR (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido-tetrazólio-redutase) (Aguiar et al., 2005).

O compartimento vermelho, normalmente, corresponde a menos de 10% e nunca excede 30% de toda a musculatura miotomal (Greer-Walker e Pull, 1975; Sãnger e Stoiber, 2001). Pode estar localizado na região subdermal, como uma camada fina e uniforme ao longo de todo o corpo do animal (Egginton e Johnston, 1982; Dal Pai-Silva

et al., 1995) ou apresentar uma distribuição mais localizada, aparecendo somente na região do nervo da linha lateral, onde assume um aspecto triangular (Hoyle et al., 1986; Sanger e Stoiber, 2001). Esse compartimento  constituido por fibras musculares vermelhas, de contração lenta e metabolismo oxidativo. As fibras vermelhas apresentam pequeno diâmetro (entre 25 e 45 μm), excelente suprimento de capilares sanguíneos, grande concentração de mioglobina, grande quantidade de mitocôndrias (na região subsarcolemal e entre as miofibrilas) e muitas gotículas de lipídios (Bone, 1978; Johnston, 1981; Sanger e Stoiber, 2001). As fibras vermelhas são recrutadas durante a realização de movimentos lentos e de sustentação, como a migração (Johnston et al., 1977; Bone, 1978).

O compartimento branco corresponde de 70 a 90% do volume total do tecido muscular (Weatherley e Gill, 1989; Kilarski, 1990). É formado por fibras musculares brancas, de contração rápida e metabolismo glicolítico (Driedzic e Hochachka, 1976). Quando comparadas às fibras vermelhas, as fibras brancas apresentam maiores diâmetros (entre 50 e 100 μm), menor suprimento de capilares sanguíneos, baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias e poucas gotículas de lipídios (Driedzic e Hochachka, 1976; Bone, 1978; Sanger e Stoiber, 2001). Esse tipo de musculatura  recrutada nos movimentos bruscos de natação, como a captura de alimento e fuga de predadores (Johnston et al., 1977; Bone, 1978). Esse compartimento apresenta importância na auicultura, constituindo a principal parte comestível dos peixes (Zhang et al., 1996). O aumento no tamanho corporal desses animais ocorre, principalmente, devido ao crescimento das fibras musculares brancas (Zimmerman e Lowery, 1999).

Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento intermediário (musculatura intermediária), com fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias entre as das fibras musculares brancas e vermelhas, como contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (Johnston et al., 1977; Sanger e Stoiber, 2001).

1.2. Miogênese nos peixes

Nos peixes, a formação das primeiras fibras musculares ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. O tecido muscular estriado esquelético origina-se do mesoderma paraxial que sofre segmentação, na direção rostro-caudal do embrião, formando blocos pareados de células mesodérmicas, os somitos, localizados

lateralmente à notocorda e ao tubo neural. Cada somito é subdividido nas regiões esclerótomo, miótomo e dermótomo, cada uma contendo tipos celulares específicos (Devoto et al., 1996; Currie e Ingham, 2001). A porção ventromedial do somito, o esclerótomo, dará origem ao esqueleto axial do embrião. O dermótomo, de localização dorsal, formará a derme, enquanto o miótomo, originará os músculos do tronco e da cauda (Devoto et al., 1996; Currie e Ingham, 2001). Nos peixes, o esclerótomo é altamente reduzido, pois, no ambiente aquático, o animal apresenta maior facilidade em sustentar o peso do corpo. Dessa forma, a maior parte do somito é constituída pelo miótomo (Bone, 1966; Currie e Ingham, 2001).

Nos miótomos, uma população de células mesodérmicas dispõe-se em uma única camada que flanqueia ambos os lados da notocorda. Pela morfologia e padrão de expressão gênica, essas células são denominadas células adaxiais, células musculares não-pioneiras do músculo *slow* ou mioblastos *slow* (Devoto et al., 1996; Currie e Ingham, 2001). Sob o estímulo de glicoproteínas secretadas pela notocorda e pelo tubo neural (Blagden et al., 1997), essas células sofrem alongamento e migram radialmente em direção à superfície do miótomo, formando uma monocamada de células musculares localizadas logo abaixo da epiderme. As células adaxiais fundem-se umas às outras, formando miotubos que se diferenciam em fibras musculares vermelhas, originando a musculatura vermelha do embrião. Uma subpopulação de células adaxiais, denominadas células musculares pioneiras do músculo *slow*, emite processos citoplasmáticos que as mantêm conectadas à notocorda, possivelmente para orientar a migração das demais células adaxiais em direção à superfície do miótomo (Devoto et al., 1996; Du et al., 1997; Currie e Ingham, 2001). Nessa região medial, forma-se uma estrutura especializada, o miossepto horizontal, que divide o miótomo nas regiões ventral (hipoaxial) e dorsal (epiaxial) (Bone, 1989). As demais células do miótomo, conhecidas como células laterais pré-somíticas ou mioblastos *fast*, fundem-se para formar miotubos, dando origem ao compartimento de músculo dorsal (epiaxial) (Bone, 1989). As demais células do miótomo, conhecidas como células laterais pré-somíticas ou mioblastos *fast*, fundem-se para formar miotubos, dando origem ao compartimento de músculo branco do embrião (Devoto et al., 1996; Du et al., 1997; Currie e Ingham, 2001) (Figura 3).

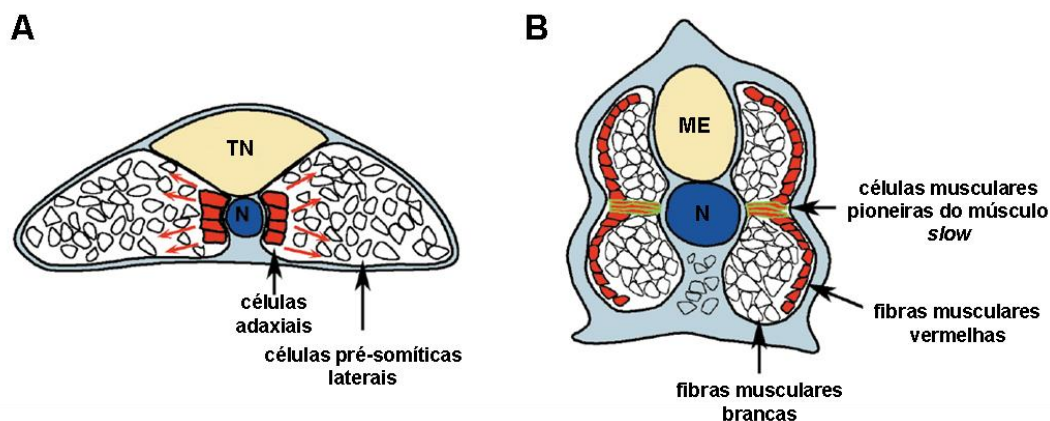


Figura 3. Esquemas de secções transversais do embrião de *zebrafish* durante a miogênese. (A) Células adaxiais flanqueiam a notocorda (N) e células pré-somíticas laterais apresentam disposição lateral em relação às células adaxiais. As setas vermelhas indicam que as células adaxiais migrarão, entre as células laterais pré-somíticas, em direção à superfície do miótomo. (B) Embrião de 24 horas. As células adaxiais, localizadas na periferia do miótomo, dão origem às fibras musculares vermelhas. As células musculares pioneiras do músculo *slow* adquiriram um formato achatado durante o contato com a notocorda e a superfície lateral do miótomo. Nessa região, será formado o miossepto horizontal, dividindo o miótomo nas regiões hipo (ventral) e epiaxial (dorsal). As fibras musculares brancas estão localizadas mais profundamente no miótomo. TN: tubo neural, N: notocorda, ME: medula espinhal (Du et al, 1997).

Durante a miogênese, os mioblastos mononucleados fundem-se uns aos outros, formando miotubos. Esses miotubos possuem um ou mais núcleos em posição central, miofibrilas em posição periférica e características morfológicas e fisiológicas próprias (Johnston et al., 1995; Johnston, 1999). Nos miotubos, ocorre a organização das proteínas que irão constituir a unidade contrátil do músculo, o sarcômero (Huxley, 1969). O sarcômero é constituído, principalmente, pelos filamentos grossos, formados pelas cadeias de miosina, e pelos filamentos finos, compostos pelas proteínas actina, troponina e tropomiosina. A contração muscular depende do deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos (Huxley, 1969, 1971).

Durante a diferenciação dos miotubos, ocorre a organização dos sarcômeros da periferia em direção ao centro desse miotubo, enquanto os núcleos migram do centro para a periferia e as miofibrilas passam a ocupar quase todo o sarcoplasma (Sänger et al., 1990, Sänger, 1992). Paralelamente, ocorre o desenvolvimento do sistema de membranas constituído por túbulos T e retículo sarcoplasmático, ambos envolvidos no processo de contração muscular. Ao final desses processos, o miotubo passa a ser chamado de fibra muscular adulta (Schiaffino e Margreth, 1969; Kelly, 1971; Flutcher et al., 1992).

A miogênese nos peixes difere significativamente da miogênese dos mamíferos. Nos mamíferos, alguns mioblastos fundem-se para formar miotubos primários. Esses

miotubos primários constituem um suporte para a fusão de outros mioblastos, os quais formam miotubos secundários (Ontell e Kozeka, 1984; Ashby et al., 1993). O padrão de inervação das fibras musculares em um músculo influencia o tipo de fibra muscular a ser formada (Harris, 1988). Contrariamente, nos peixes, os diferentes tipos de fibras desenvolvem-se a partir de distintas zonas de proliferação de mioblastos e a formação de cada tipo de fibra é espacial e temporalmente separada (Koumans e Akster, 1995; Rowleron et al., 1995).

1.3. Controle molecular da miogênese

Todos os eventos da miogênese são iniciados e controlados pela expressão diferencial de fatores transcricionais conhecidos como fatores de regulação miogênica (*myogenic regulatory factors* ou MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Weintraub, 1993; Watabe, 1999, 2001). Os MRFs compartilham um domínio altamente conservado, conhecido como *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH), que apresenta 80% de similaridade na sua seqüência de aminoácidos (Edmonson e Olson, 1993). A região *Helix-Loop-Helix* é caracterizada por duas α -hélices separadas por um *loop*. A região básica (*basic*) compreende uma extensão de uma das α -hélices da região HLH (Cole et al, 2004) (Figura 4).

Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico, uma seqüência consenso no DNA conhecida como E-box (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989; Blackwell e Weintraub 1990). A região *Helix-Loop-Helix* dos MRFs constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47 (Murre et al., 1989). A ligação do heterodímero MRF-proteína E ou de homodímeros dos MRFs à seqüência E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, levando à sua expressão (Murre et al., 1989, 1994; Lassar et al., 1991).

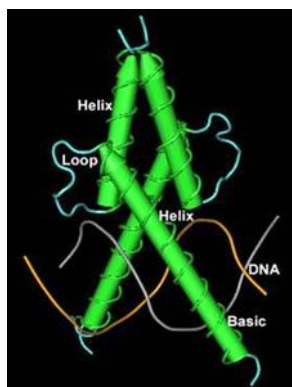


Figura 4. Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo dímero do fator transcricional da família *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) MyoD (Ma *et al.*, 1994).

Em várias espécies de peixes, muitos estudos têm caracterizado as sequências codificantes completas dos RNAs mensageiros (RNAm) referentes à MyoD e à miogenina. Essas sequências apresentam alta similaridade com as mesmas sequências descritas em outras espécies de vertebrados, principalmente em relação ao domínio de ligação ao DNA bHLH. Na carpa, a sequência nucleotídica completa da MyoD apresenta 93, 81, 73 e 71% de similaridade com a MyoD de *zebrafish* (Weinberg *et al.*, 1996), truta arco-íris (Rescan *et al.*, 1994), sapo (Hopwood *et al.*, 1989) e galinha (Lin *et al.*, 1989), respectivamente. A sequência nucleotídica completa da miogenina apresenta 69, 55 e 51% de similaridade com a miogenina da truta arco-íris (Rescan *et al.*, 1995), galinha (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1990) e camundongo (Edmondson *et al.*, 1994), respectivamente. A comparação da sequência de aminoácidos dos MRFs da carpa 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). No Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), do Departamento de Morfologia, da UNESP-Botucatu, foram obtidas as sequências nucleotídicas parciais referentes à MyoD e miogenina, expressas no músculo estriado esquelético do pacu (números de acesso do Genbank – MyoD: FJ686692; miogenina: FJ810421). Essas sequências apresentaram alta similaridade com as mesmas sequências descritas em outras espécies de vertebrados, incluindo teleósteos.

Durante a miogênese, o programa miogênico é sinalizado pela expressão dos MRFs (Currie e Ingham, 2001). A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos na fase de proliferação dos mioblastos, enquanto os fatores secundários, miogenina e MRF4, são expressos em mioblastos nas fases de fusão e

diferenciação em fibras musculares maduras (Megeney e Rudnicki, 1995; Rudnicki e Jaenisch, 1995; Watabe, 1999) (Figura 5).

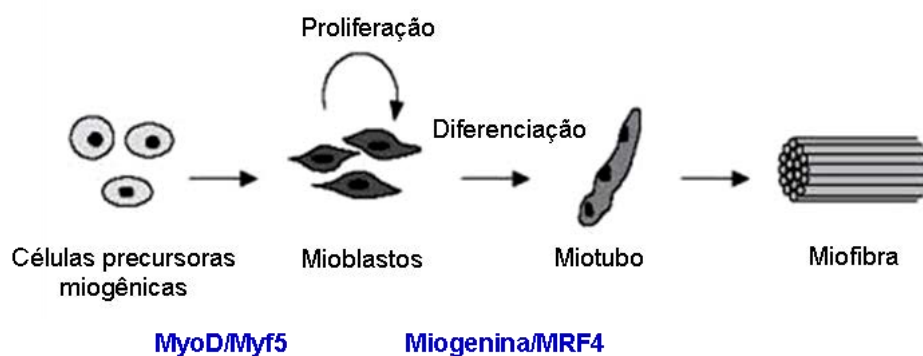


Figura 5. Esquema mostrando a formação de uma fibra muscular (miofibrila) durante a miogênese, sob o controle dos fatores de regulação miogênica. Células precursoras miogênicas, presentes nos somitos, tornam-se mioblastos, que iniciam a proliferação. Esses eventos são controlados pela expressão dos MRFs 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).

Durante o desenvolvimento embrionário, o padrão de expressão dos MRFs, nas células precursoras miogênicas do músculo estriado esquelético, é variável de acordo com a espécie considerada (Watabe, 2001). Por exemplo, em camundongos (*Mus musculus*), o primeiro MRF a ser expresso é o Myf-5, seguido pela expressão sequencial da miogenina, MyoD e MRF4 (Ott et al., 1991). Na codorna (*Coturnix* sp.), o primeiro MRF a ser expresso é a MyoD, seguido pela expressão de Myf-5 e, por último, de miogenina (Pownall e Emerson, 1992). No *zebrafish* (*Danio rerio*), diferentemente do observado em camundongos, a expressão de MyoD antecede a de miogenina (Ticho et al., 1996). Na carpa, o padrão de expressão dos MRFs é semelhante ao descrito em *zebrafish* e codornas (Kobiyama et al., 1998).

Durante a miogênese, alguns mioblastos não se fundem, permanecendo como células indiferenciadas no tecido muscular. Esse tipo celular é referido como mioblasto adulto ou célula satélite (Mauro, 1961). Essas células são quiescentes e estão localizadas na periferia da fibra muscular, entre a lâmina basal e o sarcolema (Campion, 1984). Apresentam pequeno tamanho (menores que 5 μm), com citoplasma reduzido e núcleo contendo grande quantidade de heterocromatina (Campion, 1984) (Figura 6).

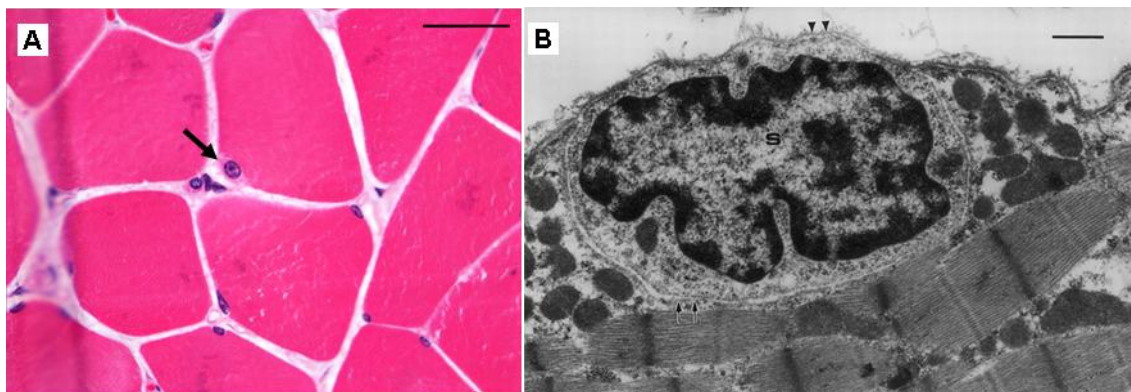


Figura 6. (A) Secção transversal de músculo estriado esquelético de rato, mostrando uma célula satélite (seta), na periferia da fibra muscular. Coloração: hematoxilina-eosina. Barra: 50 μm (Fonte: coleção didática do Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu/SP). **(B)** Eletromicrografia de uma célula satélite (S) associada a uma fibra muscular estriada esquelética. Notar a grande quantidade de heterocromatina no núcleo da célula satélite, indicando sua quiescência. A célula satélite está localizada entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular. Barra: 1 μm (eletromicrografia obtida de Sinha-Hikim et al., 2003).

Nos mamíferos, as células satélites estão uniformemente distribuídas ao longo da fibra muscular (Campion, 1984), enquanto, nos peixes, geralmente estão concentradas em múltiplos locais da fibra muscular (Koumans et al, 1991; Fauconneau e Paboeuf, 2001). Em algumas espécies de peixes, durante as fases de crescimento larval e juvenil, as células satélites também podem ser observadas no tecido conjuntivo do endomísio, entre as fibras musculares já diferenciadas (Veggetti et al., 1990; Koumans e Akster, 1995; Stoiber e Sanger, 1996; Fauconneau e Paboeuf, 2001).

1.4. Crescimento muscular pós-embrionário em peixes

Nos peixes, o crescimento pós-embrionário da musculatura estriada esquelética é dependente da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites, que são responsáveis pelos mecanismos de crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans e Akster, 1995). Na hiperplasia, a fusão entre células satélites ativadas resulta na formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em novas fibras musculares. Na hipertrofia, as células satélites ativadas fundem-se com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, levando ao aumento na área da fibra muscular (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowlerson e Veggetti, 2001) (Figura 7).

O crescimento muscular hiperplásico ocorre em duas fases sucessivas. A primeira fase, denominada hiperplasia estratificada, é uma continuação da miogênese

embrionária e ocorre no final do desenvolvimento embrionário e durante todo o período larval da maioria das espécies de peixes. Esse tipo de hiperplasia inicia-se com a formação de novas fibras musculares em zonas de proliferação de mioblastos, localizadas imediatamente abaixo da monocamada de fibras vermelhas e estendendo-se dorsalmente do septo horizontal até o ápice do miótomo (Figura 8A). A hiperplasia estratificada resulta no espessamento dos três compartimentos musculares (Rowlerson e Veggetti, 2001).

Após o período larval, inicia-se a segunda fase de hiperplasia, denominada hiperplasia em mosaico, onde a formação de novas fibras musculares não é mais restrita às zonas de proliferação de mioblastos, mas ocorre por toda a extensão do miótomo a partir da proliferação, fusão e diferenciação das células satélites. Quando esse tipo de hiperplasia está ocorrendo, observa-se, em cortes transversais do músculo esquelético, um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação, melhor observado na musculatura branca (Johnston, 1999; Rowlerson e Veggetti, 2001) (Figura 8B). A hiperplasia em mosaico ocorre, principalmente, durante o período juvenil e contribui para o crescimento muscular de espécies de peixes de interesse comercial na aquicultura, como aquelas que atingem um grande tamanho final (Rowlerson e Veggetti, 2001).

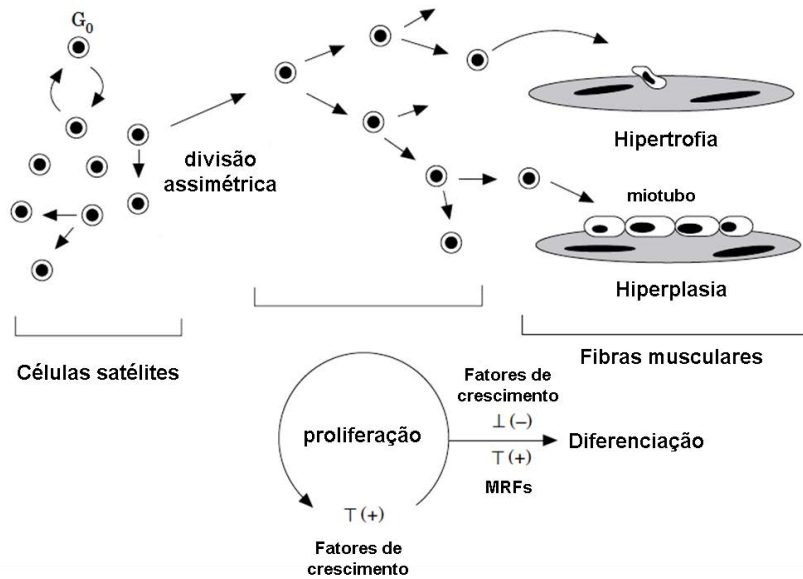


Figura 7. Esquema mostrando o crescimento pós-embriônico hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares, em peixes, a partir das células satélites. As células satélites são quiescentes e indiferenciadas, permanecendo na fase G_0 do ciclo celular. Quando ativadas, sofrem divisão celular assimétrica, onde uma célula-filha continua indiferenciada para manter constante o número de células satélites quiescentes na fibra muscular e, a outra célula-filha, torna-se comprometida com a diferenciação e o crescimento muscular. As células satélites ativadas podem sofrer fusão a uma fibra muscular existente, caracterizando a hipertrofia, ou podem fundir-se a outras células satélites, na superfície da fibra muscular, formando um miotubo que se diferencia em uma nova fibra muscular, caracterizando a hiperplasia. A proliferação e diferenciação das células satélites ocorrem sob o controle da expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e de fatores de crescimento (adaptado de Johnston, 1999).

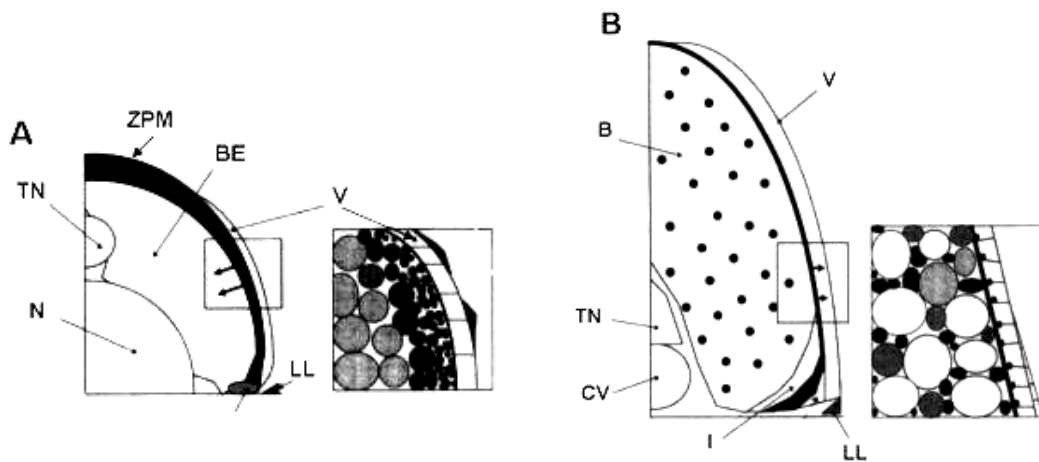


Figura 8. Representação esquemática da hiperplasia estratificada (A) e hiperplasia em mosaico (B) durante o crescimento da musculatura estriada esquelética. (A) Na hiperplasia estratificada, novas fibras musculares são formadas a partir das zonas de proliferação de mioblastos (ZPM), resultando no espessamento dos compartimentos musculares (detalhe à direita). (B) Na hiperplasia em mosaico, novas fibras musculares originam-se por todo o miótomo, a partir das células satélites, resultando em um mosaico de fibras de diferentes tamanhos (detalhe à direita). Abreviações: TN = Tubo neural, N = notocorda, BE = fibras musculares brancas embrionárias, V = monocamada de fibras musculares vermelhas, LL = linha lateral, CV = Coluna vertebral, B = fibras musculares brancas, I = fibras musculares intermediárias (Rowlerson e Veggetti, 2001).

Entre todos os vertebrados, os peixes apresentam uma característica peculiar, principalmente em relação ao crescimento muscular. Com poucas exceções, muitas espécies de peixes tendem a apresentar crescimento indeterminado, pois a hiperplasia e a hipertrofia contribuem por todo o período de crescimento pós-embrionário da musculatura estriada esquelética (Mommsen, 2001). Diferentemente, na maioria dos outros vertebrados, o crescimento muscular pós-natal ocorre exclusivamente por hipertrofia. Nos mamíferos, por exemplo, a hiperplasia cessa em um curto período após o desenvolvimento embrionário (Mommsen, 2001; Rowleron e Veggetti, 2001).

Nos peixes, as contribuições da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular são variáveis, dependendo da fase de crescimento e da espécie considerada. Nas espécies que atingem um tamanho final de poucos centímetros, o crescimento muscular envolve principalmente a hipertrofia de fibras formadas nas fases iniciais da embriogênese e o período de crescimento hiperplásico é mais curto. Nas espécies que atingem um tamanho final maior, como aquelas de interesse para a aquicultura, novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento (Weatherley et al., 1988; Alami-Durante et al., 1997; Rowleron e Veggetti, 2001).

Muitos trabalhos têm mostrado que a contribuição da hiperplasia para o crescimento muscular diminui com a idade (Alfei et al., 1994; Almeida et al., 2008, 2010). Alguns estudos sugerem que a hiperplasia cessa quando o animal atinge 44% do seu tamanho final, podendo variar de acordo com a espécie; a partir desse período, o crescimento muscular ocorre por hipertrofia das fibras musculares (Johnston et al., 2003; Weatherley et al., 1988; Zimmerman e Lowery, 1999). Entretanto, em termos comerciais, para a maioria das espécies na aquicultura, não há um tamanho final fixo e determinado. Alguns trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), do Departamento de Morfologia, da UNESP-Botucatu/SP, têm caracterizado as contribuições da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular do pacu. Nessa espécie, a hiperplasia e a hipertrofia são observadas durante todo o período de crescimento, com a hiperplasia sendo mais intensa na fase juvenil e a hipertrofia, na fase adulta (Dal Pai., 2000; Dal Pai Silva et al., 2003; Almeida et al., 2008, 2010).

1.5. Controle molecular do crescimento muscular

O crescimento muscular é controlado pela ação coordenada de diferentes substâncias, entre as quais, hormônios, fatores de transcrição e de crescimento e citocinas (Funkenstein et al., 2006). Embora existam diferenças entre as espécies, a participação desses fatores e seus mecanismos de ação são, geralmente, bem conservados entre os vertebrados (Nicoll et al., 1999).

Durante o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura, é observada a retomada dos eventos ocorridos durante a miogênese. O crescimento muscular é controlado positiva e negativamente por uma série de fatores transcricionais e de crescimento, que controlam a proliferação e diferenciação das células satélites. Entre esses fatores estão os MRFs, a miostatina e o IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*).

1.6. Fatores de regulação miogênica (MRFs)

Os MRFs são fatores de transcrição, dos quais fazem parte a MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4, que compartilham um domínio altamente conservado, conhecido como “basic helix-loop-helix” (bHLH). Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico, uma sequência consenso no DNA conhecida como E-box (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989; Blackwell e Weintraub, 1990). A região HLH dos MRFs constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47 (Murre et al., 1989). A ligação do heterodímero MRF-proteína E ou de homodímeros dos MRFs à sequência E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, levando à sua expressão (Murre et al., 1989, 1994; Lassar et al., 1991).

Durante o crescimento muscular, as células satélites quiescentes são ativadas e os MRFs primários, MyoD e Myf5, determinam a sua proliferação, enquanto a expressão dos fatores secundários, miogenina e MRF4, estão relacionados com os processos de diferenciação das células satélites em fibras musculares maduras (Megenev e Rudnicki, 1995; Rudnicki e Jaenisch, 1995; Watabe, 1999, 2001).

Estudos realizados no laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), UNESP, Botucatu/SP mostraram que a MyoD está envolvida com o controle da proliferação de células satélites, as quais poderiam contribuir para a hiperplasia e/ou hipertrofia no músculo esquelético do pacu, dependendo da fase de crescimento considerada. Já a miogenina está relacionada com a diferenciação das células satélites que seriam incorporadas a uma fibra muscular existente na hipertrofia ou que sofreriam

fusão para formar uma nova fibra muscular na hiperplasia, dependendo da fase de crescimento (Almeida et al., 2010).

1.7. Miostatina

A miostatina, também conhecida como GDF-8 (*Growth and Differentiation Factor-8*), é um membro da superfamília dos fatores de crescimento TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) (McPherron et al., 1997) e está envolvida com a regulação do crescimento do músculo estriado esquelético nos vertebrados (McPherron et al., 1997; Joulia e Cabello, 2007; Funkestein e Rebhan, 2007; Patruno et al., 2007).

Semelhantemente a outros membros da família dos TGF- β , a miostatina é sintetizada como uma proteína precursora (prepropeptídeo), contendo três regiões distintas: (1) uma sequência sinal na região N-terminal; (2) um propeptídeo ou peptídeo associado à latência (LAP: *latency associated peptide*) e (3) um fragmento contendo a região C-terminal que corresponde à porção madura e biologicamente ativa da proteína (McPherron et al., 1997). A proteína precursora passa por duas etapas de clivagem proteolítica para gerar a proteína ativa (McPherron et al., 1997). A primeira clivagem remove o peptídeo sinal e, a segunda, ocorre numa região da proteína contendo a sequência de aminoácidos RXXR (arginina-XX-arginina), separando o LAP da porção madura C-terminal (Lee e McPherron, 2001; Lee, 2004). Essa porção madura sofre dimerização e corresponde à proteína biologicamente ativa, que se liga aos receptores de membrana específicos na célula-alvo (Thomas et al., 2000). O LAP tem a capacidade de ligar-se a esse dímero, inibindo sua atividade biológica por impedir a sua ligação aos receptores de membrana (Lee e McPherron, 2001). A clivagem proteolítica do LAP ativa o dímero C-terminal latente (Wolfman et al., 2003) (Figura 9).

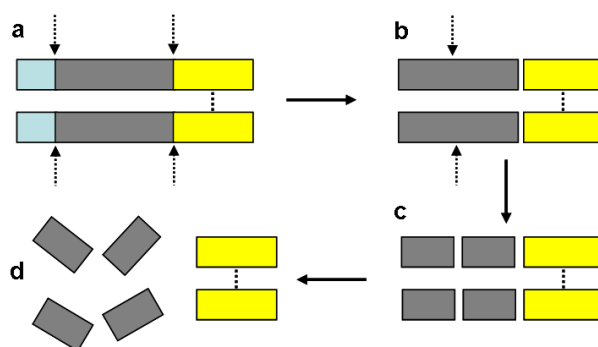


Figura 9. Esquema mostrando o processamento da proteína miostatina. (a) A miostatina é sintetizada como uma proteína precursora contendo a sequência-sinal (em azul), a porção N-terminal ou propeptídeo (em cinza) e o fragmento C-terminal (em amarelo). A proteína precursora sofre dois eventos de clivagem proteolítica (setas); um remove a sequência-sinal e o segundo gera o fragmento C-terminal, que corresponde à porção ativa da proteína. (b) Após as clivagens proteolíticas, dois fragmentos C-terminais formam um dímero, através de pontes dissulfeto entre resíduos de aminoácidos cisteína, mas permanecem ligados não-covalentemente ao propeptídeo formando um complexo latente e inativo. (c) e (d) A ativação do complexo latente pode ocorrer por clivagem proteolítica do propeptídeo que causa a dissociação do complexo latente (Lee, 2004).

A cascata de sinalização iniciada pela ligação da miostatina ao seu receptor na célula-alvo é bem estabelecida nos mamíferos. A miostatina ativa liga-se a receptores específicos na membrana da célula-alvo, denominados receptores ativina do tipo II. O receptor tipo II, ligado à miostatina, fosforila e ativa um receptor do tipo I correspondente no interior da célula. O complexo tetramétrico de receptores ativado fosforila proteínas *Smads* ligadas ao receptor (*R-Smads*), promovendo a interação dessas *R-Smads* com outras *Smads*, como a *Smad4*. O complexo de proteínas *Smad* é translocado para o núcleo, onde interagem com proteínas da maquinaria de transcrição, regulando a transcrição de genes específicos (Kollias e McDermott, 2008), como os genes relacionados à proliferação e diferenciação de mioblastos e células satélites e à atrofia muscular (Otto e Patel, 2010) (Figura 10). Na literatura, são escassos os trabalhos que descrevem a via de sinalização e o modo de ação da miostatina nos teleósteos.

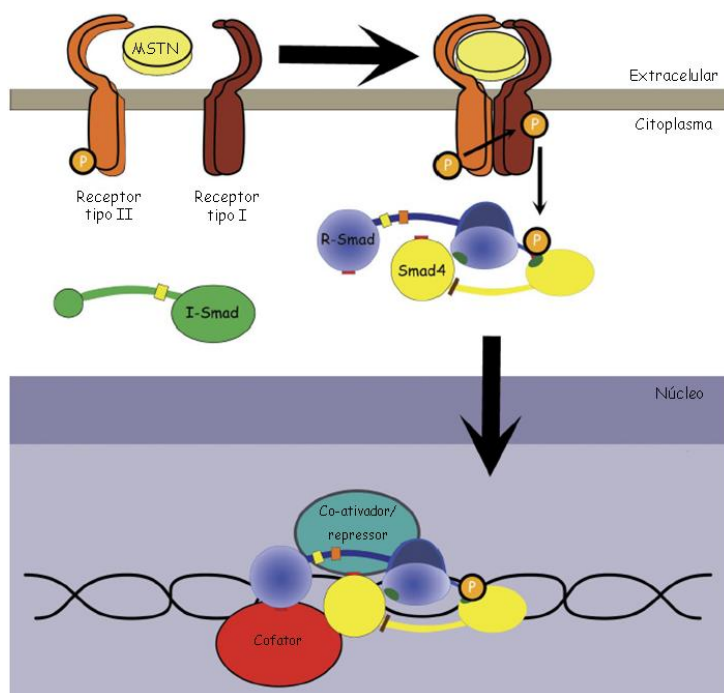


Figura 10. Esquema mostrando a via de sinalização da miostatina. O complexo formado inicialmente pela miostatina (MSTN) e seu receptor ativando o tipo II fosforila e ativa o receptor do tipo I correspondente. O complexo tetramétrico de receptores ativado fosforila proteínas *Smads* ligadas ao receptor (*R-Smads*) que interagem com outras *Smads*, por exemplo, a *Smad4*. O complexo de proteínas *Smad* é translocado para o núcleo, onde interagem com proteínas da maquinaria de transcrição e cofatores, regulando a transcrição de genes-específicos (Kollias e McDermott, 2008).

Nos mamíferos, a miostatina apresenta duas funções regulatórias distintas e bem estabelecidas. A primeira função é regular o número final de fibras a serem formadas durante a miogênese, através do controle da proliferação e/ou diferenciação dos mioblastos. O controle da proliferação dos mioblastos ocorre pela capacidade da miostatina em aumentar os níveis da proteína p21, diminuindo os níveis do complexo ciclina-Cdk2 e a fosforilação da proteína retinoblastoma, impedindo que os mioblastos iniciem o ciclo celular e sua proliferação (Thomas et al., 2000; Joulia et al., 2003). O controle da miostatina sobre a diferenciação dos mioblastos se dá pela *down-regulação* da expressão dos MRFs MyoD, miogenina e Myf-5 (Langley et al., 2002; Ríos et al., 2002; Joulia et al., 2003). A segunda função da miostatina é regular o crescimento pós-natal das fibras musculares através da inibição da proliferação e/ou diferenciação das células satélites durante a hipertrofia (Lee, 2004). Em condições normais, a miostatina é responsável por manter as células satélites no estado quiescente, até que, em circunstâncias nas quais o crescimento ou a regeneração são requeridos, a miostatina possa ser inibida, permitindo que as células satélites retornem ao ciclo celular (Lee, 2004) (Figura 11).

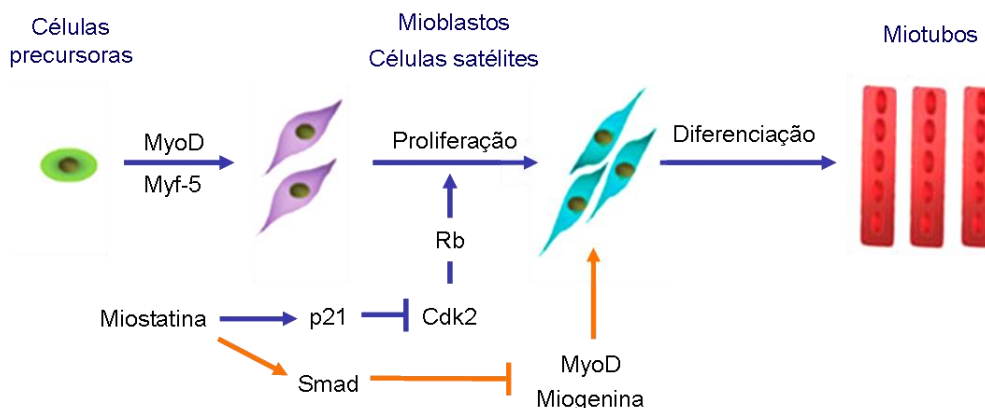


Figura 11. Representação esquemática simplificada dos mecanismos de ação da miostatina em mamíferos. O controle da miostatina sobre a proliferação de mioblastos, durante a miogênese, ou de células satélites, durante o crescimento pós-natal ou regeneração, ocorre pela capacidade da miostatina em aumentar os níveis da proteína regulatória p21, diminuir os níveis do complexo ciclina-Cdk2 e diminuir a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), impedindo que essas células iniciem o ciclo celular e sua proliferação. O controle da miostatina sobre a diferenciação dos mioblastos ou células satélites se dá pela *down*-regulação da expressão dos MRFs, como MyoD e miogenina, via proteínas *Smad* (baseado em Langley et al., 2002).

Assim, nos mamíferos, a principal função da miostatina é regular negativamente o desenvolvimento e o crescimento muscular (McPherron et al., 1997).

A miostatina foi primeiramente descrita em camundongos, sendo inicialmente expressa durante a embriogênese, nos somitos e no músculo esquelético em desenvolvimento (McPherron et al., 1997). Camundongos adultos *knockout* para a miostatina apresentam um aumento considerável na massa muscular devido aos mecanismos de crescimento por hiperplasia e hipertrofia (McPherron et al., 1997). Já o fenótipo de dupla musculatura, observado em bovinos das raças *Belgian Blue* e *Piedmontese*, foi atribuído a mutações naturais no gene da miostatina (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997). Nos mamíferos, a miostatina é predominantemente expressa no músculo esquelético, embora níveis menores de expressão tenham sido observados no tecido adiposo (McPherron et al., 1997), na glândula mamária (Ji et al., 1998), nas fibras de Purkinje do coração e nos cardiomiócitos (Sharma et al., 1999).

O gene da miostatina tem sido descrito em várias espécies de peixes (Maccatrozzo et al., 2001a; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001; Rodgers et al., 2001; Rodgers e Weber, 2001; Kocabas et al., 2002; Ko et al., 2007; Xu et al., 2003; Ye et al., 2007). Nesses animais, os maiores níveis de expressão do gene da miostatina

foram observados no músculo esquelético; níveis menores de expressão foram detectados nos rins, pâncreas, intestino, brânquias, cérebro e coração (Maccatrozzo et al., 2001a,b; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001; Roberts e Goetz, 2001; Kocabas et al., 2002; Radaelli et al., 2003). Assim, nos peixes, a função da miostatina parece ser mais ampla se comparada à dos mamíferos, não sendo restrita apenas ao controle do crescimento muscular, mas, possivelmente, participando da fisiologia e regulação de outros tecidos (Østbye et al., 2001; Patruno et al., 2008).

Em algumas espécies de peixes, a expressão gênica da miostatina foi analisada no músculo estriado esquelético ao longo do desenvolvimento e crescimento. No início do desenvolvimento embrionário, onde o crescimento muscular ocorre, predominantemente, por hiperplasia, os níveis de expressão de miostatina, no músculo esquelético, foram baixos, aumentando significativamente nos estágios finais de desenvolvimento, quando a hiperplasia tornou-se menos intensa (Xu et al., 2003; Johansen e Overturf, 2005; Patruno et al., 2008). Muitos estudos relatam um aumento de massa muscular após um decréscimo na expressão da miostatina, porém outros trabalhos não observam um forte efeito da miostatina sobre a massa muscular (Acosta et al, 2005; Lee et al, 2009; Medeiros et al. , 2009; Sawatari et al, 2010). Estudos sugerem que a função da miostatina em peixes parece ser mais ampla quando comparada aos mamíferos, não sendo expressa apenas no tecido muscular e restrita ao controle do crescimento do músculo esquelético, mas possivelmente participando na fisiologia e na regulação de outros tecidos, de acordo com a espécie, fase de crescimento e fatores ambientais (Østbye et al, 2001; Roberts e Goetz, 2001; Acosta et al, 2005; Patruno et al, 2008).

1.8. Fatores que afetam o crescimento muscular

O crescimento e o desenvolvimento muscular podem aumentar ou diminuir em função de certos parâmetros, conhecidos como fatores moduladores do crescimento. Quando o fator está relacionado com as características próprias do animal ele é chamado de fator intrínseco, mas quando esse fator está relacionado com o ambiente em que o animal se encontra esse fator é chamado de extrínseco (Dajoz, 1983).

a) Fatores Intrínsecos:

1 - Variabilidade genética: Entre os fatores intrínsecos, destacamos a variabilidade genética ou diversidade genética que corresponde à variedade

genotípica/alélica dentro de uma população e a distribuição da variação genética dentro e entre populações (Costa, 2008).

A reprodução de um grande número de peixes não garante que sua descendência possua alta variabilidade. (Povh et al, 2008a; Barrero et al, 2008). É importante que uma população apresente variabilidade genética, pois é essa variabilidade que permite que populações submetidas a mudanças ambientais respondam às pressões ecológicas no sentido contrário à redução populacional e à extinção local. (Povh et al, 2008b; Barrero et al, 2008).

A estrutura de uma população é grandemente influenciada pelo fluxo gênico, que determina até que ponto uma população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (Slatkin, 1993). Em populações com fluxo gênico intenso, verifica-se uma evolução conjunta, pois a migração atua como fator de homogeneização das frequências alélicas. Na situação inversa, encontra-se uma subdivisão populacional que frequentemente leva à diferenciação genética entre as subpopulações, por meio da aquisição de frequências alélicas distintas (Moysés, 2005). Vários trabalhos têm demonstrado diferenciação genética entre populações de uma mesma espécie. Calcagnotto et al., (2001; 2009), estudando populações de pacu (*Piaractus Mesopotamicus*) do Pantanal Matogrossense verificou uma pequena diversidade genética entre nove populações. O mesmo foi descrito por Pansonato-Alves et al., 2011, Alves, 2012 e Mendonça et al. 2013 para populações de *Characidium cf. gomesie*, *Hypostomus* e *Rhizoprionodon lalandii*. Assim, pode-se observar a importância da manutenção da diferenciação genética entre populações de uma mesma espécie, pois é essa diferenciação que garante reprodutores de qualidade que originam juvenis capazes de sobreviver e se desenvolver até a fase adulta.

Estudos têm demonstrado que a diferenciação genética pode resultar em variações no crescimento muscular entre as populações. Greer-Walker et al. (1975), estudando uma população de arenque (*Clupea harengus*) do “Banck stock” do Mar do Norte observaram que esses animais apresentavam um número menor de fibras musculares na maturidade sexual quando comparados com uma população de arenque que desovava próximo ao estuário “Blackwater”. Meyer-Rochow e Ingram (1993), comparando duas populações de *Retropinna retropinna* também encontraram diferenças na porcentagem da musculatura branca entre as populações, fato também evidenciado em populações de salmão do Atlântico (Verspoor, 1997).

2 - Dimorfismo sexual/reversão sexual: Algumas espécies de peixes apresentam dimorfismo sexual acentuado quanto ao tamanho corporal até atingirem a maturidade sexual e/ou durante a fase adulta. Um exemplo clássico é a tilápia, em que o macho cresce mais que a fêmea. Nessa espécie, a reversão sexual é realizada para a obtenção de indivíduos machos para a engorda, que resulta num crescimento mais elevado em menos tempo. Isso é possível, pois tal procedimento evita problemas associados a gastos energéticos com a cópula, desova e excessos populacionais em cativeiros (Little et al., 1995; Beardmore et al., 2001). O processo de reversão sexual também é descrito para a espécie hermafrodita dourada (*Sparus aurata*), porém a reversão sexual ocorre de macho para fêmea. Esse evento acontece devido à estratégia de desenvolvimento em que no primeiro e/ou segundo ano de vida as douradas são machos e depois entre segundo e/ou terceiro ano transformam-se em fêmea. Rowleron et al. (1995), mostraram que a ocorrência dessa reversão sexual na espécie garante um aumento considerável no peso corporal e uma hipertrofia significativa das fibras musculares.

3 - Triplóides: Estudos com produção de triplóides estéreis também são descritos na literatura como estratégias de cultivo (Solar et al., 1984; Colombo et al, 1995).

Vários autores descrevem que o desenvolvimento gonadal em peixes adultos pode ser responsável por cerca de 25% do peso corporal do animal, portanto, os autores sugerem que peixes triploides estéreis podem direcionar gastos metabólicos para o crescimento muscular, uma vez que estes animais não apresentam crescimento sazonal e gasto energético com a maturidade sexual (Solar et al, 1984; Carter et al, 1994; Galbreath e Thorgaard, 1994).

Com base nos trabalhos analisados é possível constatar que as variações na taxa de crescimento dentro de uma população podem ser exploradas por meio da reprodução seletiva, resultando numa taxa de crescimento mais rápida que apresente características importantes e desejadas pelos produtores na aquicultura comercial.

b) Fatores Extrínsecos

Mudanças na alimentação, oxigênio e temperatura da água são fatores extrínsecos que podem alterar o número de fibras musculares recrutadas e a expressão mio gênica nos peixes (Figura 12).

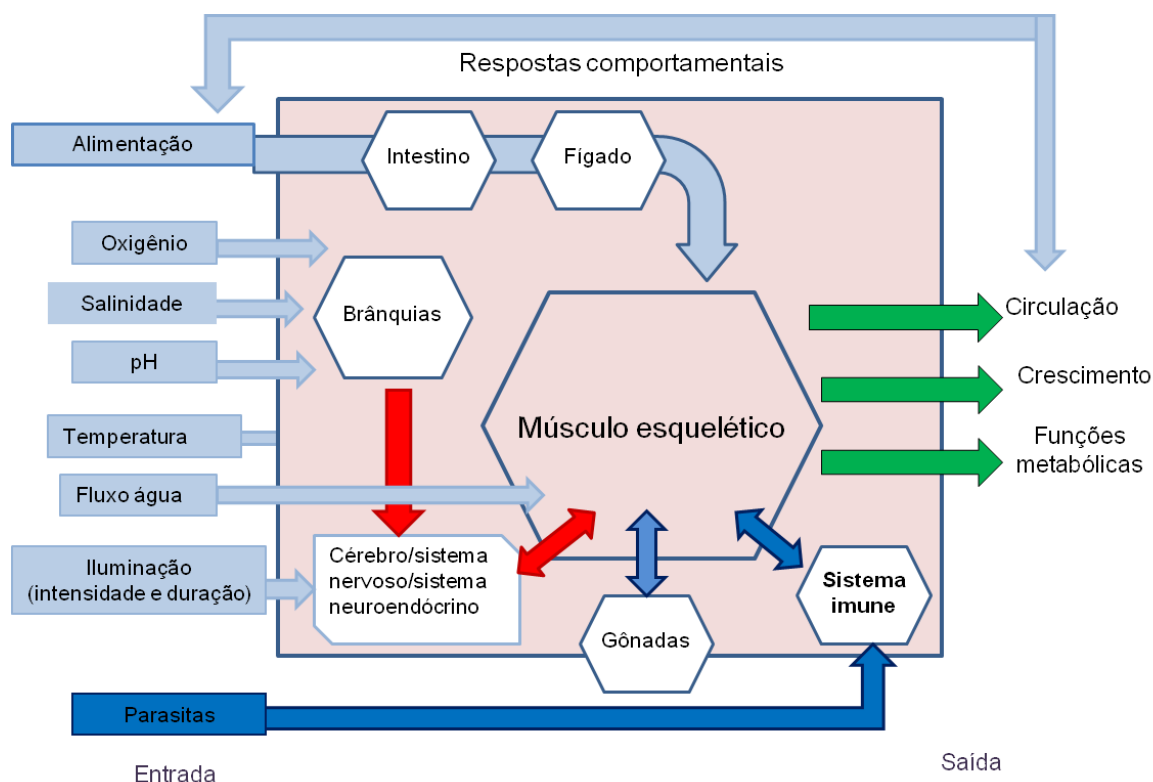


FIGURA 12. Esquema ilustrando que alterações nas condições ambientais e no sistema fisiológico podem afetar o desenvolvimento do músculo esquelético em peixes. (Adaptado: Johnston et al., 2006).

1- Alimentação: Na natureza, períodos de jejum são comuns entre os peixes, especialmente quando há escassez de alimento durante algum período do ano. Entretanto, a taxa de sobrevivência durante esses períodos é uma habilidade bem desenvolvida em muitas espécies (Dave et al., 1975). As respostas metabólicas durante a restrição alimentar variam significativamente entre os teleósteos (Sherridan e Mommsen, 1991) e alguns fatores como a linhagem, fase de crescimento, manejo, temperatura da água, disponibilidade de alimento e composição da dieta podem provocar injúria e diminuição do consumo de ração, influenciando no ajuste biológico dos animais e consequentemente, desacelerando o seu crescimento muscular (Lovell, 1989; Bastrop et al., 1991; Sheridan e Mommsen, 1991; Souza et al., 2002; Furuya 2010).

O jejum prolongado diminui a síntese de proteínas resultando num crescimento mais lento, porém, o restabelecimento das condições consideradas favoráveis a espécie pode desencadear um crescimento mais acelerado/compensatório (Dave et al., 1975; Sherridan e Mommsen, 1991). A taxa de crescimento compensatório varia com o

estágio de desenvolvimento e o tempo de jejum da espécie considerada. Após um período de jejum, a realimentação promove uma reversão nos processos de mobilização de reservas corporais para suprir o catabolismo. Somente quando esta condição estiver restabelecida, a energia disponibilizada pelo alimento será convertida em crescimento (Dobson e Holmes, 1984; Kim e Lovell, 1995; Montserrat et al., 2007; Hagen, et al., 2009).

O crescimento compensatório pode ser dividido em diferentes categorias: crescimento compensatório parcial, completo ou sobre compensação (Figura 13). Crescimento compensatório parcial: ocorre quando 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; Compensação total: acontece quando os animais que sofreram restrição alimentar durante algum período, alcançam o mesmo peso daqueles que foram continuamente alimentados; Sobre compensação: ocorre quando animais de mesma idade, apresentam taxa de crescimento superior a de animais que não sofreram privação de alimento (Ali et al., 2003).

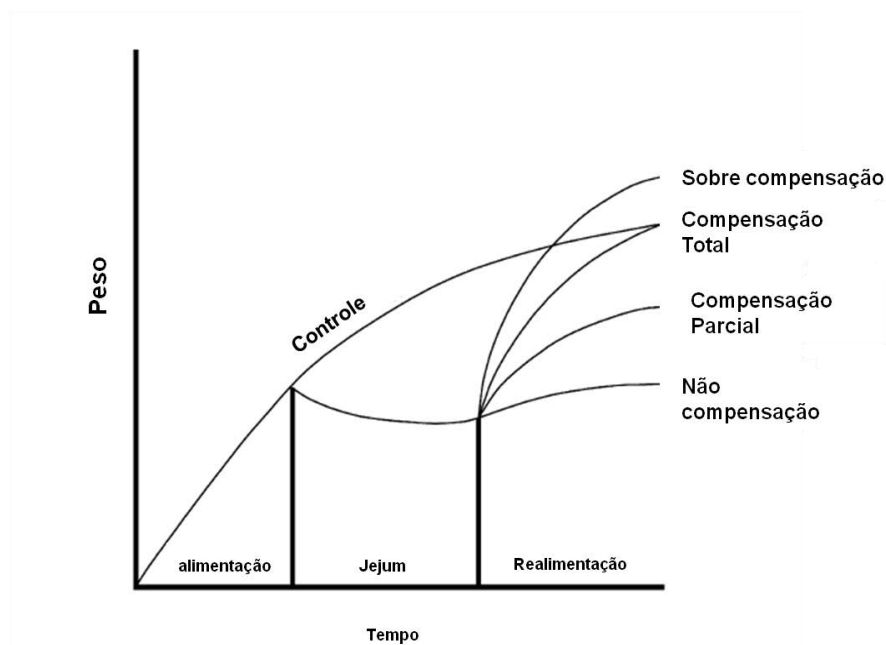


Figura 13: Esquema da curva de desempenho dos peixes após o período de restrição alimentar seguido de realimentação. (Adaptado: Ali et al., 2003)

Um dos principais mecanismos envolvidos no ganho compensatório observado em peixes é resultado da alta taxa de ingestão de alimento durante a realimentação, fenômeno conhecido como hiperfagia. (Jobling e Johansen, 1999; Gurney et al., 2003). Nebo et al., (2013), observaram ganho de peso seguido de crescimento compensatório para grupos de tilápias do nilo submetidos a um curto período de jejum e posterior realimentação. O mesmo foi descrito para a linhagem GIFT e para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Palma et al., 2010; Takahashi et al., 2010).

Com base nestes trabalhos é possível inferir que o cultivo de animais submetidos a um curto período de jejum e posterior realimentação pode ser utilizado na aquicultura como estratégia alimentar para diminuir os custos na produção.

Na aquicultura intensiva a alimentação é responsável pela maior parte do custo de produção, representando cerca de 70% dos custos no sistema de cultivo intensivo (Anualpec, 2001). Peixes confinados demandam rações com adequado balanço de nutrientes e energia para o crescimento e reprodução (Furuya, 2010).

Trabalhos realizados com algumas espécies baseando-se em diferentes dietas - concentrações no nível de lipídeos, ácidos graxos e proteína, mostram que estas alterações podem modificar o sistema endócrino e os níveis de expressão dos Fatores Regulatórios Mio gênicos (MFRs) envolvidos com o crescimento muscular em peixes (Alami-Durante et al., 2010; Campos et al., 2010).

Segundo Campos et al., (2010) linguados (*Solea senegalensis* Kaup), alimentados com diferentes porcentagens de lipídios na dieta (4%, 12% e 20%) apresentaram diferenças nos níveis de expressão dos MFRs. O grupo que recebeu uma dieta com maior concentração de ácidos graxos expressou menos MyoD, MRF4 e Miogenina, quando comparado aos grupos que receberam menor porcentagem de lipídeo.

Em juvenis de truta arco-íris, também foi observado diferenças na expressão de alguns genes músculos específicos em animais tratados com distintas fontes de aminoácidos na sua dieta (Alami-Durante et al., 2010). Assim, observa-se que o êxito no cultivo de peixes em grande escala, resulta no aumento da rentabilidade, porém, o conhecimento da dieta alimentar, respeitando-se as peculiaridades de cada espécie se faz necessário (Carneiro, 1990).

2- Níveis de oxigênio: Os peixes realizam trocas gasosas por difusão entre o sangue e a água através das brânquias. Quanto menor a concentração de gás carbônico, maior é a concentração de oxigênio na água. O teor de oxigênio exigido por uma

espécie para viver e se reproduzir varia de acordo com suas necessidades fisiológicas. Uma exposição contínua a níveis de oxigênio considerados baixos para a espécie podem resultar em “stress”, reduzindo o consumo de alimento, aumentando a incidência de doenças e interferindo na taxa de crescimento (Proença e Bittencourt, 1994; Silva e Siqueira, 1997).

Matschak et al (1997) estudando salmão do Atlântico demonstraram que pode ocorrer um decréscimo no número de fibras formadas em animais cultivados em temperaturas que apresentam menor teor de oxigênio. Resultados semelhantes foram obtidos para truta arco-íris, onde uma diferença no número de fibras musculares foi descrita entre o grupo criado em situações de hipóxia em relação ao grupo controle (Matschak et al., 1998). Catfish (*Silurus meridionalis*) aclimatados em condições de hipóxia, conseguiram melhorar sua tolerância a condições de baixa disponibilidade de oxigênio, contudo, o desempenho no crescimento apresentou-se prejudicado (Zhang et al., 2010) e na espécie killfish (*Austrofundulus limnaeus*), onde os peixes têm capacidade de se manter por longos períodos em ambientes de hipóxia, Podrabsky e Culpepper (2012) descreveram uma diminuição na taxa metabólica do grupo exposto a ausência de oxigênio em comparação ao grupo criado em condições mais favoráveis.

Com base nesses resultados é possível inferir que a disponibilidade de oxigênio influencia na formação de fibras musculares e no desenvolvimento do animal.

3 - Temperatura: A maioria das espécies de peixes apresenta amplas faixas de tolerância térmica. Entretanto, a faixa de conforto ambiental que proporciona condições ideais para o desempenho das funções de crescimento é específica de cada espécie (Emerson, 1986).

Estudos com várias espécies têm mostrado que os estágios de desenvolvimento são sensíveis à oscilações na temperatura da água e que esta mudança pode influenciar o desenvolvimento e o crescimento muscular do animal (Purchase & Brown 2001; Alami-Durante et al., 2000; Alami-Durante et al., 2007). A temperatura exerce influência direta sobre o músculo esquelético, podendo alterar a taxa de miogênese (tempo de proliferação e diferenciação de mioblastos) e o número e diâmetro das fibras musculares. Em resposta a diferentes temperaturas de incubação de embriões e larvas, a plasticidade muscular pode ser irreversível devido ao ritmo acelerado das mudanças ontogenéticas, podendo refletir em mudanças no crescimento do animal adulto (Johnston, 2006).

Os peixes são animais pecilotérmicos, sendo assim, a temperatura da água influencia diretamente o metabolismo destes animais. Oscilações na tolerância termal considerada zona de conforto para uma espécie pode resultar na redução ou até mesmo na interrupção do crescimento muscular. (Johnston, 2006; Alami-Durante et al., 2007).

Johnston, 2011, destaca em seu trabalho que os peixes tem um limite superior e inferior de tolerância térmica e apresentam uma temperatura ótima para o crescimento, reprodução, regulação das taxas metabólicas e resistência a doenças.

Carneiro et al. (1990a) cultivando alevinos de pacu em três temperaturas (24, 28 e 32°C) observaram que as médias de ganho de peso foram muito maiores para as

temperaturas de 28 e 32°C, quando comparadas à da temperatura de 24°C. Mudanças na temperatura da água alteram a exigência nutricional dos peixes, determinada pelo acréscimo ou decréscimo nas taxas de crescimento, na atividade e, conseqüentemente, no consumo de oxigênio (Carneiro, 1990).

Wilkes et al. (2001) observaram que "sea bass" (*Dicentrarchus labrax*) cultivados em menores temperaturas expressaram mais MyoD e Miogenina em peixes cultivados a 4 °C quando comparados aos peixes cultivados à 8°C. Com base em tais resultados, acredita-se que a expressão dos MRFs pode ser prolongada com a redução da temperatura e que uma diferenciação relativamente tardia poderia resultar numa fase de proliferação mais longa a baixas temperaturas, permitindo uma maior hiperplasia das fibras. Assis et. al. (2004) observaram aos 25 dias de criação um maior nível de hiperplasia em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) cultivados a 25°C, quando comparado aos animais cultivados a 27 e 29°C.

Em peixes de clima temperado, como o salmão do Atlântico, o cultivo dos animais em diferentes temperaturas de incubação (2°, 5° e 8°C) influenciou no desenvolvimento dos somitos. Os animais criados na temperatura mais elevada (8°C) desenvolveram os somitos mais rapidamente que os animais incubados nas temperaturas inferiores (2° e 5°C) (McQueen et al., 2007).

A variação no diâmetro das fibras musculares pode influenciar a quantidade de colágeno na matriz extracelular e várias comparações interespecíficas tem mostrado uma correlação negativa entre o diâmetro das fibras e a firmeza do filé (Sato et al., 1986a e b; Sato et al., 1989; Sato et al., 1997; Sato et al., 1998). Peixes com fibras musculares pequenas apresentam um filé mais firme em relação àquelas espécies em que as fibras musculares são maiores (Hatae et al., 1990; Hurling et al., 1996; Michelin et al., 2009)

Pesquisas têm demonstrando a importância do modelo de cultivo dos peixes sobre a qualidade da carne, destacando que esta qualidade está diretamente relacionada com a densidade das fibras, e que esta densidade pode atuar de forma positiva ou negativa na firmeza e sabor do filé, características importantes e desejadas pelos produtores (Jonhston et al., 2000d, 2003b).

Com base nos trabalhos analisados é possível constatar que a diferenciação genética dentro de uma população, o crescimento somático, as taxas metabólicas e os parâmetros da água podem ser explorados de forma positiva no cultivo resultando numa taxa de crescimento muscular mais rápida que apresente características importantes e desejadas para a aquicultura.

2. OBJETIVOS

Avaliar a influência da temperatura de cultivo em juvenis de pacu sobre os seguintes parâmetros na musculatura estriada esquelética:

- Morfologia das fibras musculares;
- Contribuição dos mecanismos de crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico;
- Expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e miostatina;
- Expressão das proteínas MyoD e miogenina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O experimento de cultivo dos pacus (Fig. 6) em diferentes temperaturas foi conduzido no Pólo Regional da Alta Sorocabana, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), com sede em Presidente Prudente-SP, durante o período de 23 de janeiro a 24 de março. Peixes, com aproximadamente 1,5 g, foram distribuídos em caixas d'água (0,5 m³), na densidade de 15 peixes m⁻³ em três sistemas de recirculação distintos (Fig. 7). A temperatura da água desses sistemas de recirculação foi mantida a 24 °C, 32 °C e 28°C durante todo o período do experimento. Para cada temperatura, foram utilizadas três réplicas. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia, até a saciedade aparente, com ração comercial contendo 40% de proteína bruta (Ração Prámirim/Guaebe, 1.0 mm) . Durante o período experimental, os seguintes parâmetros

de qualidade da água dos tanques foram medidos por grupo: temperatura, oxigênio dissolvido, nitrito, nitrato e amônia. As médias foram as seguintes: grupo de 24°C (23.65°C; 7.33 mg / L; x mg / L; x mg / L and ; 0 mg / L), grupo de 28 °C (27.18 °C; 7.14 mg / L; x mg / L; ; x mg / L and ; 0 mg / L) e grupo de 32°C (32.09 °C; 6.61 mg / L; x mg / L; x mg / L and ; 0 mg / L). Os exemplares de pacu foram coletados aos 30 e 60 dias de cultivo. Em cada coleta, os peixes foram anestesiados com benzocaína (100-200 mg/L de água), eutanasiados, e posteriormente foram feitas amostragens de 8 peixes por réplica (caixa), totalizando 24 peixes coletados. Desses 24 animais, 12 foram utilizados nas análises morfológica, morfométrica e imunofluorescência e, os 12 restantes, na análise de expressão gênica. As coletas foram realizadas após um período de jejum de 24 horas. Nos peixes amostrados, foram determinados as medidas de peso (g) e do comprimento (cm).

Para cada temperatura, foram coletados fragmentos da musculatura branca na região da linha lateral. As amostras musculares foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento. As análises da morfologia, morfometria e expressão gênica estão sendo realizadas no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME) do Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu.

3.2. Processamento das amostras:

Morfologia e morfometria da musculatura branca

As amostras musculares foram fixadas em formalina tamponada a 10% e conservadas em etanol a 70%. As amostras foram desidratadas com uma série de concentrações de etanol (80, 90 e 95%) e embebidas em resina (Historresina - Leica Instruments GmbH, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes histológicos transversais (4 mm) de fibras musculares foram obtidos através de um micrótomo com navalha de vidro. Os cortes foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE).

Utilizando um sistema de análise de imagens (Leica Qwin, Germany), foi determinado o menor diâmetro de todas as fibras musculares brancas presentes em campos aleatórios da lâmina histológica até que aproximadamente 200 fibras musculares fossem analisadas, por animal, em cada grupo experimental (Dubowitz e Brooke, 1973). Após a mensuração, as fibras musculares foram distribuídas em classes,

na dependência de seu diâmetro ($<25\ \mu\text{m}$; entre $20\text{-}50\ \mu\text{m}$; $>50\ \mu\text{m}$), de acordo com Almeida et al. (2008). Essa classificação das fibras permite avaliar o grau de crescimento hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares. A área das fibras musculares foi medida e o diâmetro determinado usando a fórmula $2A^{0.5} \Pi^{-0.5}$ (Valente et al., 1999).

Expressão gênica

A análise da expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina foi realizada pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Foram utilizadas as seguintes metodologias:

3.3. Extração do RNA total

O RNA total dos fragmentos congelados dos exemplares de pacu foi extraído com o reagente Trizol (*Life Technologies* - EUA), seguindo a metodologia descrita no manual do produto. As amostras musculares foram individualmente homogeneizadas com o homogeneizador de tecidos (*IKA UltraTurrax/T-25*) em 1 mL de TRIzol para 50-100 mg de tecido. Cada homogenato foi incubado durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Foram acrescentados 200 μL de clorofórmio em cada amostra, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente e incubando por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado a $12000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O RNA permaneceu na fase aquosa.

A fase aquosa, foi transferida para um novo tubo, onde o RNA foi precipitado com 500 μL de álcool isopropílico (por mL de TRIzol), durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O precipitado de RNA foi seco à temperatura ambiente, lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol) a 4°C e centrifugado a $7500 \times g$ por 5 minutos a 4°C .

O RNA total foi dissolvido em água ultrapura (*Gibco, Life Technologies* - EUA), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C , para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase, e armazenado em freezer a -80°C .

Para quantificação do RNA total foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop e com base na densidade óptica (OD) com a leitura em absorbância à 260 nm (específica para ácidos nucleicos), foi verificada a quantidade do RNA. Além disso, as razões das

absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm, forneceu uma estimativa da qualidade da extração. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese capilar utilizando o Bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) que calcula o número de integridade de RNA (RIN), a média dos valores de todas as amostras foi 8.95 ± 0.49 (escala 1–10), indicando um RNA de alta qualidade e com mínimo de degradação).

3.4. Tratamento do RNA com DNase

Para remoção do DNA genômico contaminante, foi realizado o tratamento do RNA total extraído com DNase, conforme as instruções do protocolo *Deoxyribonuclease I - Amplification Grade* (Life Technologies - EUA). O volume de solução de RNA total, equivalente a 2 µg de RNA, foi transferido para um microtubo estéril, onde foram acrescentados 2 µL de tampão para a reação da DNase I (10X), 2 µL da enzima DNase I (1 unidade/µL) e volume de água ultrapura suficiente para completar 20 µL de solução. Essa solução foi incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 µL de EDTA (25 mM, pH 8,0) à cada amostra, com posterior incubação a 65°C por 10 minutos.

3.5. Transcrição Reversa (RT) do RNA total

Para a reação de RT do RNA total, foi utilizado o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Life Technologies - EUA). A cada reação de RNA total tratado, foram adicionados 10 µL de Tampão para Transcrição Reversa (10X), 4 µL de dNTPs (25X), 10 µL de *random primers* (10X), 2.5 µL da enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50 unidades/µL), 2.5 µL de Inibidor de RNases (40 unidades/µL) (Ambion, Life Technologies - EUA) e volume de água ultrapura suficiente para completar 100 µL de solução. Cada amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 42°C por duas horas e, em seguida, estocadas em freezer a -20°C.

3.6. Expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e miostatina

A expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina foi realizada pela Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR). A β -actina foi utilizada como gene de referência para a normalização dos resultados de expressão dos genes-alvo.

Os conjuntos de primers senso e antisenso, para os genes analisados, foram desenhados no software Primer Express 3.0[®] (Life Technologies – EUA), a partir das seqüências expressas na musculatura de *P. mesopotamicus*, publicadas no Genbank (números de acesso: MyoD - FJ686692; Miogenina - FJ810421 e β -actina; seqüência publicada) (Tabela 1). Os *primers* foram sintetizados comercialmente (Life Technologies - EUA) e diluídos em água ultrapura para uma concentração final de 5 μ M. (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados na RT-PCR quantitativa em tempo real para a amplificação dos genes MyoD, miogenina, miostatina e do gene de referência β -actina.

Gene	Seqüência do primer (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
MyoD	S: TACTACCCCGTCCTGGATCA	140
	A: GTCAGAGCCGCTTCAGTGTC	
miogenina	S: AGCGCAGCACATTGATGAAC	57
	A: TCCTCAGGATTTCCACTTTTGG	
miostatina	S: GACGGAAGGAGGCACATAAGAA	60
	A: CGTGACCCCGAGCGTTTAC	
B-actina	S: TCACAGAGGCTCCCCTGAAC	64
	A: TCTCAAACATGATCTGGGTCATCT	

S: primer senso; *A*: primer antisenso; pb: pares de bases

A eficiência de cada conjunto de *primers* foi testada construindo-se curvas-padrão para os genes-alvo e o gene de referência β -actina, a partir de um *pool* de cDNA de todas as amostras, na ordem de diluição 1:10. Para cada amostra, a reação de amplificação foi constituída por 2 μ L de um *pool* de cDNA (20 ng/ μ L), 12.5 μ L de *Power SYBR Green Master Mix 2.5X* (Life Technologies - EUA) e 2 μ L de cada primer (400 nM), em um volume final de 25 μ L. Para cada gene, foram incluídos um controle negativo da PCR (amostra de cDNA substituída por água ultrapura) e um controle negativo para a reação de transcrição reversa (amostra substituída por mistura inicial contendo quantidades iguais de RNA de todas as amostras). As reações para cada gene foram realizadas, em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Life Technologies - EUA), utilizando-se as condições de termociclagem universal (configuradas no software): 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a corrida, foi analisada a curva de dissociação para confirmar a amplificação específica dos produtos de RT-qPCR de cada gene.

Para cada reação de RT-qPCR, foram determinados, manualmente, os parâmetros *baseline* e *threshold*, gerando para cada amostra um ciclo *threshold* (C_t). O C_t corresponde ao ciclo da RT-qPCR no qual a fluorescência gerada cruza o limiar *threshold*. A partir das curvas-padrão construídas foi determinada a eficiência de amplificação de cada conjunto de *primers* de forma a obter um valor de $100\% \pm 5\%$, com os valores de inclinação das retas (*slope*) inclusos no intervalo de -3.32 a -3.4, de acordo com o *User Bulletin #2* (*Applied Biosystems*, 2001).

Após a análise das curvas-padrão e da eficiência da reação de PCR para cada gene, foi realizado um experimento de validação do Método do $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001), de acordo com o *User Bulletin #2* (*Applied Biosystems*, 2001), para a quantificação relativa da expressão dos genes-alvo. Essa validação permitiu confirmar que as eficiências de amplificação dos genes-alvo e de referência foram iguais. Os valores de C_t obtidos, a partir das curvas-padrão dos genes-alvo e do gene de referência RNAr 18S, foram utilizados para construir gráficos representando, no eixo y, o valor de ΔC_T (onde $\Delta C_t = C_{t \text{ gene alvo}} - C_{t \text{ gene de referência}}$) e, no eixo x, o valor do log das diluições utilizadas (log dos valores de 100 a 1.5625). Como o valor da inclinação da reta estava entre os valores de -0.1 e 0.1, o Método do $\Delta\Delta C_t$ pôde ser utilizado.

Após a validação do Método do $\Delta\Delta C_t$ para todos os genes-alvo, a expressão gênica relativa, em cada animal, foi obtida a partir da construção de placas de reação contendo 2 μL de cDNA do respectivo animal, 12.5 μL de *Power SYBR Green Master Mix 2.5X* (*Life Technologies* - EUA) e 2 μL de cada primer (400 nM), em um volume final de 25 μL . Os parâmetros da reação foram os mesmos descritos na reação para teste de eficiência dos *primers*, descrito anteriormente. Cada placa de reação foi construída de modo a permitir a amplificação de um gene-alvo e do gene de referência, além de conter um controle negativo para a reação de PCR. Os valores de expressão obtidos para cada gene-alvo foram normalizados pelos valores obtidos para a expressão do gene de referência β -actina. A estabilidade do gene de referência foi confirmada pela sua expressão constante entre todas as amostras ($p = 0.56$).

Para cada animal foi obtido o valor de C_t para o gene-alvo e o valor de C_t para o gene de referência a partir da média dos C_t s de cada reação em duplicata. Para cada animal, foi calculado o valor de ΔC_t ($C_{t \text{ gene-alvo}} - C_{t \text{ gene de referência}}$). Todos os valores foram normalizados pelo valor de ΔC_t do calibrador para obter o valor de $\Delta\Delta C_t$ (ΔC_t obtido para cada animal - ΔC_t calibrador). O calibrador é definido como uma amostra utilizada

como base de comparação dos resultados, podendo representar um animal não tratado ou um estágio particular de desenvolvimento animal (*User Bulletin #2, Applied Biosystems*, 2001). Pelo Método do $\Delta\Delta C_t$, a quantificação relativa da expressão gênica é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, expressa em unidades arbitrárias (*User Bulletin #2, Applied Biosystems*, 2001) e normalizada pelo gene de referência β -actina.

4. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., Estrada, M.P., 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.* 119, 324-331.
- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L.E., Dal Pai-Silva, M., 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *J. Fish. Biol.* 67, 1-12.
- Alami-Durante, H., Bergot, P., Rouel, M., Goldspink, G., 2000. Effects of environmental temperature on the development of the myotomal white muscle in larval carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Biol.* 203, 3675-3688.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A.M., Bergot, P., 1997. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibers in carp larvae in relation to growth rate. *J. Fish Biol.* 50, 1285-1302.
- Alami-Durante, H., Olive, N., Rouel, M., 2007. Early thermal history significantly affects the seasonal hyperplastic process occurring in the myotomal white muscle of *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Cell Tissue Res.* 327, 553-570.
- Alami-Durante, H., Wrutniak-Cabello, C., Kaushik, S.J., Medale, F., 2010. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 156, 561-8.
- Alexander, R., 1969. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 49, 263-290.
- Alfei, L., Onali, A., Spanò, L., Colombari, P.T., Altavista, P.L., De Vita, R., 1994. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). *Eur. J. Histochem.* 38, 151-162.
- Ali, M.; Nicieza, A.; Woonton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, v.4, p.147-190.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. *Micron* 39, 1306-1311.
- Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron* 41, 997-1004.

- Alves, A.L., Borba, R. S., Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A. e Foresti, F., 2012. Karyotypic diversity and evolutionary trends in the Neotropical catfish genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Comparative Cytogenetics* 6, 443-452.
- Anualpec., 2001. Anuário da Pecuária Brasileira. FNP Consultoria & Comércio, São Paulo, SP, Brazil, p. 209-322.
- Ashby, P.R., Pincon-Raymond, M., Harris, A.J., 1993. Regulation of myogenesis in paralysed muscles in the mouse mutants peroneal muscular atrophy and muscular dysgenesis. *Dev. Biol.* 156, 529–536.
- Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 237, 251-267.
- Barrero L.,Ribeiro, R. P.; Vargas, L.; Povh, J. A.; Gomes, P. C.; Mangolin, C. A.; Boso, K. M. O. e Gualda,T., 2008. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. *Biosci. J., Uberlândia.* 24, 86-93.
- Bastrop, R.; Spangenberg, R.; Jurss, K. 1991. Biochemical adaptation of juvenile carpa (*Cyprinus carpio* L) to food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol.* 98, 143-149.
- Beardmore, J. A.; Mair, G. C.; Lewis, R. I. 2001. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture.* 197, 283-301.
- Blackwell, T., Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104-1110.
- Blagden, C.S., Currie, P.D., Inghan, P.W., Hughes, S.M., 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev.* 11, 2163-2175.
- Bone, Q., 1966. On the function of the two types of myotomal muscle fiber in elasmobranch fish. *J. Mar. Biol. Assoc.* 46, 321-349.
- Bone, Q., 1978. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiol.* Academic Press, New York, pp. 361-424.
- Bone, Q., 1989. Evolutionary patterns of axial muscle systems in some invertebrates and fish. *Am. Zool.* 29, 5-18.
- Calcagnotto, D., DeSalle, R., 2009. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology* 7: 607-616.
- Calcagnotto, D., Russello, M., Desalle, R., 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes* 1: 245-247.
- Campion, D.R., 1984. The muscle satellite cells. *Int. Ver. Cytol.* 87, 225-251.
- Campos, C., Valente, L.P.M., Borges, P., Bizauayehu, T., Fernandes, J.M.O., 2010. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in *Solea senegalensis* . *J. Exp. Biol.* 231, 200-209.

- Carneiro, D.J. 1990. Efeito da temperatura na exigência de proteína e energia em dietas para alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). São Carlos: UFSCar,. 59p (Tese de Doutorado).
- Carneiro, D.J.; Rantin, F.T.; Dias, T.C.R. e Malhereiros, E.B., 1990a. Níveis de proteína e energia brutas em dietas práticas para o crescimento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), em diferentes temperaturas. I - efeitos sobre o desempenho de produção. In Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 7, Natal, RN, p. 62 (Resumos).
- Carter, T.R., Parry, M.L., Harasawa, H., Nishioka, S., 1994. Inter governmental panel on climate change technical guide- lines for assessing climate change impacts and adaptation. University College London and Center for Global Environmental Research, London.
- Cole, N.J., Hall, T.E., Christopher, I.M., Chapman, M.A., Kobiyama, A., Nihei, Y., Watabe, S., Johnston, I.A., 2004. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. J. Exp. Biol. 207, 4239-4248
- Colombo, L., Barbaro, A., Libertini, A., Francescon, A., 1995. Lombardo Artificial fertilization and induction of triploidy and meiotogynogenesis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. J. Appl. Ichthyol., 11 (1995), pp. 118–125. J. Appl. Ichthyol. 11, 118–125
- Costa, F. R., 2008. Estudo das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. Campos dos Goytacazes/RJ.
- Currie, P.D., Ingham, P.W., 2001. 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.
- Dajoz, R. 1983. Ecologia Geral. 4 ed. Editora Vozes, Petrópolis, RJ.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). Anat. Histol. Embriol. 29, 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.I., Rodrigues, A.C., 1995. Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* (Boch, 1795). Ann. Anat. 177, 65-70.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C., 2003. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. Arch. Fish Mar. Res. 50, 149-160.
- Dave, G.; Johansson-Sjöbeck, M.L.; Larsson, A.; Lewander, K.; Lindman, U., 1975. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. Comp. Biochem. and Physiol. 52, 423-430.
- Devoto, S.H., Melançon, E., Eisen, J.S., Westerfield, M., 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. Development 122, 3371-3380.
- Dobson, S.H., Holmes, R.M., 1984. Compensatory growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol. 25, 649-656.

- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W., 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am. J. Physiol.* 230, 579-582.
- Du, S.J., Devoto, S.H., Westerfield, M., Moon, R.T., 1997. Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the *hedgehog* and TGF- β gene families. *J. Cell Biol.* 139, 145-156.
- Dubowitz, V., Brooke, M.H., 1973. Muscle biopsy: A modern approach. WB Saunders Company, London.
- Edmonson, D.G., Lyons, G.E., Martin, J.F., Olson, E.N., 1994. *Mef2* gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 120, 1251-1263.
- Edmonson, D.G., Olson, E.N., 1993. Helix loop helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Bio. Chem.* 268, 755-758.
- Eggington, S., Johnston, I.A., 1982. Muscle fiber differentiation and vascularisation in the juvenile European eel (*Anguilla anguilla* L). *Cell Tissue Res.* 222, 563-577.
- Emerson S.B., 1986. Heterochrony and frogs: the relation- ship of a life history trait to morphological form. *American Naturalist.* 127,163-183.
- Fauconneau, B., Paboeuf, G., 2001. Muscle satellite cells in fish. In: Johnston IA (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, pp. 73-98.
- Flutcher, B.E., Phillips, J.L., Powell, J.A., Andrews, S.B., Daniels, M.P., 1992. Coordinated development of myofibrils sarcoplasmic reticulum and transverse tubules in normal and dysgenic mouse skeletal muscle, in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 155, 266-280.
- Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y., Hosoda, Y., Obinata, T., Nabeshima, Y., 1990. Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors. *J. Biol. Chem.* 265, 15219-15223.
- Funkenstein, B., Rebhan, Y., 2007. Expression, purification, renaturation and activation of fish myostatin expressed in *Escherichia coli*: facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. *Protein Expr. Purif.* 54, 54-65.
- Funkenstein, B., Balas, V., Skopal, T., Radaelli, G., Rowleron, A., 2006. Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. *Tissue and Cell* 38, 399-415.
- Furuya, W.M., 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. GFM: Toledo, 100p.
- Galbreath, P.F., Thorgaard, G.H., 1994. Viability and fresh-water performance of atlantic salmon (*Salmo salar*) x brown trout (*Salmo trutta*) triploid hybrids. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 51, 16-24.
- Greer-Walker, M., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish. Biol.* 7, 295-300.
- Grobet, L., Royo-Martin, L.J., Poncelet, D.A., 1997. Deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17, 71-74.
- Gurney, W.S.C.; Jones, W.; Veitch, A.R.; Nisbet, R.M. 2003. Resource allocation, hyperphagia and compensatory growth in juveniles. *Ecology.* 84, 2777-2787.
- Hagen, O., Fernandes, J.M.O., Solberg, C., Johnston, I.A, 2009. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 152, 47-53.
- Harris, A.J., 1988. Critical periods in the development of motoneurons. *Rev. Neurol.* 144, 643-647.

- Hatae K, Yoshimatsu F, Matsumoto JJ., 1990. Role of muscle fibres in contributing firmness of cooked fish. *J. Food Sci.* 55, 693-96.
- Hopwood, N.D., Pluck, A., Gurdon, J.B., 1989. MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* 8, 3409-3417.
- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H., 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kelling, *E. masquinongy* (Mitchill). *J. Fish. Biol.* 28, 393-401.
- Hurling R, Rodell, J.B, Hunt, H.D. 1996. Fiber diameter and fish texture. *J Texture Studies.* 27, 679-85.
- Huxley, H.E., 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365.
- Huxley, H.E., 1971. The structural basis of muscular contraction. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 178, 131-149.
- 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., 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 44, 1265-1273.
- Jobling, M., Johansen, J.S., 1999. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. *Aquaculture Res.* 30, 473-478.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* 7, 576-587.
- Johnston, I.A., 1981. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Res.* 214, 369-379.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Johnston, I.A., 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 209, 2249-2264.
- Johnston, I.A., Davison, W., Goldspink, G., 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.* 114, 203-216.
- Johnston, I.A., McIay H.A., Abercromby, M., Robbins, D., 2000d. Early thermal experience has different effects on growth and muscle fibre in spring and autumn-running Atlantic salmon population. *J. Exp. Biol.* 203, 2553-64.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickel, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., Burt, M.L., 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 203, 2539-2552.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., 2003b. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J. Exp. Biol.* 206: 3425-35.
- Johnston, I.A., Vieira, V.L.A., Abercromby, M., 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring, *Clupea harengus*. *J. Exp. Biol.* 198, 1389-1403.
- Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., Cabello, G., 2003. Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.* 286, 263-275.

- Joulia, D., Cabello, G., 2007. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 310-315.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., Bass, J.J., 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7, 910-916.
- Katz, S.L., 2002. Design of heterothermic muscle in fish. *J. Exp. Biol.* 205, 2251-2266.
- Kelly, A.M., 1971. Sarcoplasmic reticulum and T tubules in differentiating rat skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 49, 335-344.
- Kilarski, W., 1990. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L.). *J. Fish Biol.* 36, 353-362.
- Kim, M.K.; Lovell, R.T. 1995. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Aquaculture* 125, 285-293.
- Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, T.T., Wu, J.L., Chen, J.C., Lu, J.K., 2007. Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Mar. Biotechnol.* 9, 20-32.
- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, Y., Suetake, H., Johnston, I.A., Watabe, S., 1998. 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.
- Kocabas, A.M., Kucuktas, H., Dunham, R.A., Liu, Z., 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1575, 99-107.
- Kollias, H.D., McDermott, J.C., 2008. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 104, 579-87.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 3-20.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Booms, G.H.R., Lemmens, C.J.J., Osse, J.W., 1991. Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). *Am. J. Anat.* 192, 418-424.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49831-49840.
- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-831.
- Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D., Weintraub, H., 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E-47- like proteins *in vivo*. *Cell* 66, 305-315.
- Lee, S.J., 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 61-86.
- Lee, S.J., McPherron, A.C., 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9306-9311.

- Lee, C.Y., Hu, S.Y., Hu, S.Y., Gong, H.Y., Chen, M.H.C., Lu, J.K., Wu, J.L., 2009. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 766-771.
- Lin, Z.Y., Dechesne, C.A., Eldridge, J., Paterson, B.M., 1989. An avian muscle factor related to MyoD1 activates muscle-specific promoters in nonmuscle cells of different germ-layer origin and in BrdU-treated myoblasts. *Genes Dev.* 3, 986-996.
- Little, D.C., Lin, C.K., Turner, W.A., 1995. Commercial scale tilapia fry production Thailand. *Aquaculture* 26, 21-24.
- Lovell, R.T., 1989. Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, p.260.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., Pabo, C.O., 1994. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., Patarnello, T., 2001a. Characterization of the myostatin gene in the gillhead seabream (*Sparus aurata*): sequence and genomic structure, and expression pattern. *Mar. Biotechnol.* 3, 224-230.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G., Patarnello, T., 2001b. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Lett.* 509, 36-40.
- MacQueen, D.J., Robb, D., Johnston, I.A., 2007. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 210, 2781-94.
- Matschak, T.W., Hopcroft, T., Mason, P.S., Crook, A.R., Stickland, N.C., 1998. Temperature and oxygen tension influence the development of muscle cellularity in embryonic rainbow trout. *J. Fish Biol.* 53, 51-590.
- Matschak, T.W., Stickland, N.C., Mason, P.S., Crook, A.R., 1997. Oxygen availability and temperature affect embryonic muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Differentiation* 61, 229-235.
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493-494.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
- Medeiros, E.F., Phelps, M.P., Fuentes, F.D., Bradley, T.M., 2009. Over expression of follistatin in trout stimulates increased muscling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, 235-242.
- Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem. Cell Biol.* 73, 723-732.
- Mendonça, F.F., Hashimoto, D., Porto-Foresti, F., Oliveira, C., Gadig, O.B., Foresti, F., 2013. Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 771-773.
- Meyer-Rochow, V.B., Ingram, J.R., 1993. Red-white muscle distribution and fibre growth dynamics: a comparison between lacustrine and riverine populations of the Southern smelt *Retropinna retropinna* Richardson. *Proc. R. Soc. Land. B.* 25, 85-92.

- Michelin, A.C., Justulin Jr, L.A., Delella F.K., Padovani, C.R., Felisbino, S.L., Dal Pai Silva, M., 2009. Differential MMP-2 and MMP-9 activity and collagen distribution in skeletal muscle from pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during juvenile and adult growth phases. *The Anatomical Record* 292:387–395
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Bioch. Physiol.* 129, 207-219.
- Montserrat, N., Gabillard, J.C., Capilla, E., Navarro, M.I., Gutiérrez, J., 2007. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 150, 462-472.
- Moysés, C.B., 2005. Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) São Paulo. Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva-Universidade de São Paulo.
- Murre, C., Bain, G., Van Dijk, M.A., Engel, I., Furnari, B.A., Massari, M.E., Matthews, J.R., Quong, M.W., Rivera, R.R., Stuver, M.H., 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1218, 129-135.
- Murre, C., Mccaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Yan, J.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Nebo, C., Portella, M.C., Carani, F.R., Almeida, F.L., Padovani, C.R., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2013. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 164, 268-274
- Nicoll, C.S., Rodgers, B.D., Kelley, K.M., 1999. Hormonal regulation of growth and development of nonmammalian vertebrates. In: Kostyo, J.L., Goodman, H.M. (Eds.), *Handbook of Physiology. The endocrine systems: hormonal control of growth*. Oxford University Press, New York, pp. 73-98.
- Ontell, M., Kozeka, K., 1984. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. *Am. J. Anat.* 171, 133–148.
- Østbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., Andersen, Ø., 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268, 5249-5257.
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., Buckingham, M., 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111, 1097-1107.
- Otto, A., Patel, K., 2010. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Exp. Cell Res.* 316, 3059-3066.
- Palma, E.H., Takahashi, L.S., Dias, L.T.S., Gimbo, R.Y., Kojima, J.T., Nicodemo D., 2010. Estratégia alimentar com ciclos de restrição e realimentação no desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT. *Ciência Rural*, Santa Maria. 40, 421-426.
- Pansonato-Alves, J.C., Vicari, M.R., Oliveira, C., Foresti, F., 2011. Chromosomal diversification in populations of *Characidium cf. gomesi* (Teleostei, Crenuchidae). *J Fish Biol.* 78,183-94.

- Patruno, M., Caliaro, F., Maccatrozzo, L., Sacchetto, R., Martinello, T., Toniolo, L., Reggiani, C., Mascarello, F., 2007. Myostatin shows a specific expression pattern in pig skeletal and extraocular muscles during pre and post-natal growth. *Differentiation* 76, 168-81.
- Patruno, M., Radaelli, G., Mascarello, F., Candia Carnevali, M.D., 1998. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anat. Embryol.* 198, 487-504.
- Patruno, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell Tissue Res.* 331, 643-58.
- Podrabsky, J.E., Culpepper, K.M., 2012. Cell cycle regulation during development and dormancy in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *Cell Cycle* 11, 1697-704.
- Povh, J. A., Lopera-Barrero, N. M., Ribeiro, R. P., Lupchinski Jr. E., Gomes, P. C., Lopes, T. S. 2008a. Monitorio genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria.* 35, 5-15.
- Povh, J.A., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Streit-Junior, D.P., Lopera-Barrero, N.M., Vargas, L., Gomes, P.C., Lopes, T.S., 2008b. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. *Pesq. agropec. bras.* 43, 201-206.
- Pownall, M.E., Emerson, C.P., 1992. Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. *Dev. Biol.* 151, 67-79.
- Proença, A., Bittencourt, P.R.L., 1994. Manual de piscicultura tropical. Brasília. 196p.
- Purchase, C.F., Brown, J.A., 2001. Stock-specific changes in growth rates, food conversion efficiencies, and energy allocation in response to temperature change in juvenile Atlantic cod. *J. Fish Biol.* 58, 36-52.
- Radaelli, G., Rowleron, A., Mascarello, F., Patruno, M., Funkenstein, B., 2003. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell Tissue Res.* 311, 239-50.
- Rescan, P.Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., 1995. A gene of homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and *in vitro* during the conversion of myosatellite cells to myotubes. *FEBS Lett.* 362, 89-92.
- Rescan, P.Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., Fauconneau, B., 1994. Identification of a muscle factor related to MyoD in fish species. *Biochim. Biophys. Acta* 1218, 202-204.
- Rescan, P.Y., Jutel, I., Rallièrre, C., 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 3523-3529.
- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J., 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, 993-999.
- Roberts, S.B., Goetz, F.W., 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Lett.* 491, 212-216.

- Rodgers, B.D., Weber, G.M., 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129, 597-603.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., Levine, M.A., 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142, 1412-1418.
- Rome, L.C., Funke, R.P., Alexander, R.M., Lutz, G., Aldridge, H., Scott, F., Freadman, M., 1988. Why animals have different muscle fibre types. *Nature* 335, 824-827.
- Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G., Veggetti, A., 1995. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 16, 223-236.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, pp. 103-139.
- Rudnicki, M.A., Jaenish, R., 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays* 17, 203-209.
- Sänger, A.M., 1992. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. *Environ. Biol. Fishes* 33, 97-104.
- Sänger, A.M., Kim, Z.S., Adam, H., 1990. The fine structure of muscle fibers of roach, *Rutilus rutilus* (L.), and chub, *Leuciscus cephalus* (L.), Cyprinidae, Teleostei: interspecific differences and effects of habitat and season. *J. Fish Biol.* 36, 205-213.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press London, pp. 187-250.
- Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Nakagawa, T., Makinodan, Y., Ohtsuki, K., Kawabata, M., 1997. Involvement of type m collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *J. Agric. Food Chem.* 45, 343-348.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Ikeda, S., 1986a. A simplified method for determining collagen in fish muscle. *Bull Jpn. Soc. Sci. Fish* 52, 889-893,
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Shimizu, Y., 1986b. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bull Jpn Sci Fish* 52, 1595-1600.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., Itoh, Y., Sato, M., 1989. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 92, 87-91.
- Sato, T., Foged, N.T., Delaisse, J.M., 1998. The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J. Bone. Mineral Res.* 13, 59-66.
- Sawatari, E., Seki, R., Adachi, T., Hashimoto, H., Uji, S., Wakamatsu, Y., Nakata, T., Kinoshita, M., 2010. 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.
- Schiaffino, S., Margreth, A., 1969. Coordinated development of the sarcoplasmatic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 41, 855-875.

- Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J., Bass, J.J., 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell Physiol.* 180, 1-9.
- Sheridan, M.A., Mommsen, T.P., 1991. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General Comparative Endocrinology.* 81, 473-483.
- Silva, A.L.N., Siqueira, A.T., 1997. *Piscicultura em tanques-rede: princípios básicos*. Recife: SUDENE/UFRPE – imprensa universitária, 72p.
- Sinha-Hikim, I., Roth, S.M., Lee, M.I., Bhasin, S., 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, 197-205.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations *Evolution* 47, 264-279.
- Solar, I.I., Donaldson, E.M., G.A. Hunter., 1984. Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth. *Aquaculture* 42, 57-68.
- Souza, V.L., Urbinati, E.C., Gonçalves, D.C., Silva, P.C., 2002. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. *Acta Scientiarum*, Maringá. 24, 533-540.
- Stoiber, W., Sängner, A.M., 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. *Anat. Embryol.* 194, 569-579.
- Takahashi, L.S, Biller, J.D., Criscuolo-Urbinati E., Urbinati, E.C., 2010. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding: effects on farmed pacu production. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 1-8.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R., 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 40235-40243.
- Ticho, B.S., Stainier, D.Y.R., Fishman, M.C., Breitbart, R.E., 1996. Three zebrafish MEF2 genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos. *Mech. Dev.* 59, 205-218.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., e Fauconneau, B. 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of *Rainbow trout*. *J. Fish Biol.* 55, 675-691.
- van Raamsdonk, W., Pool, C.W., Kronnie, G., 1978. Differentiation of muscle fiber types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Anat. Embryol.* 153, 137-155.
- van Raamsdonk, W., Tekronnie, G., Pool, C.W., van de Laarse, W., 1980. An immune histochemical and enzymic characterization of the muscle fibres in myotomal muscle of the teleost *Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan. *Acta Histochem.* 67, 200-216.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapollo, P.A., 1990. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embryol.* 182, 1-10. 1.
- Verspoor, E. 1997. Genetic diversity among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations. *ICES Journal of Marine Science* 54, 965-973.

- Xu, C., Wu, G., Zohar, Y., Du, S.J., 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.* 206, 4067-4079.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press London, pp. 19-41.
- Weatherley, A., Gill, H.S., 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia* 41, 353-354.
- Weatherley, A., Gill, H., 1989. The role of muscle in determination growth and size in teleost fish. *Experientia* 45, 875-878.
- Weatherley, A., Gill, H., Lobo, A.F., 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J. Fish Biol.* 33, 851-859.
- Weinberg, E.S., Allende, M.L., Kelly, C.S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O.G., Grunwald, D.J., Riggleman, B., 1996. Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, *no tail* and *spadetail* embryos. *Development* 122, 271-280.
- Weintraub, H., 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.
- Wilkes, D., Xie, S.Q., Stickland, N.C., Alami-Durante, H., Kentouri, M., Sterioti, A., Koumoundouros, G., Fauconneau, B., Goldspink, G., 2001. Temperature and myogenic factor transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Biol.* 204, 2763-2771.
- Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S., Lee, S.J., 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15842-15846.
- Ye, H.Q., Chen, S.L., Sha, Z.X., Liu, Y., 2007. Molecular cloning and expression analysis of the myostatin gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*). *Mar. Biotechnol.* 9, 262-272.
- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C., 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *J. Morphol.* 229, 71-81.
- Zhang, W., Zhen-Dong, C., Jiang-Lan, P., Bo-Jian, C., Shi-Jian F. 2010. The effects of dissolved oxygen level on the metabolic interaction between digestion and locomotion in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Comparative Bioch. and Physiol. Part A: Molec. Integ. Physiol.* 157, 212-219.
- Zimmerman, A.M., Lowery, M.S., 1999. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). *J. Exp. Zoo.* 284, 299-308.

CAPÍTULO 1

REARING TEMPERATURE INDUCES CHANGES IN MUSCLE GROWTH AND GENE EXPRESSION IN JUVENILE OF PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Tassiana Gutierrez de Paula

São Paulo State University, UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil. ttgutierrez@gmail.com

Maeli Dal-Pai-Silva. Corresponding author.

São Paulo State University, UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology and CAUNESP, 18618-970, Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Phone/Fax: +55 (14) 3880-0479. maeli@ibb.unesp.br

Abstract

Muscle growth in teleost fish involves the balance between the recruitment (hyperplasia) and the enlargement (hypertrophy) of muscle fibers, mechanisms that are controlled by many transcription factors, as the MyoD family and growth factors as myostatin. Several environmental factors such as temperature can influence the muscle fiber cellularity, and the expression of genes related with muscle development and growth, affecting the growth rate pattern in fish. Pacu is a fast growing fish extensively used in Brazilian aquaculture programs and shows a wide range of thermal tolerance. As temperature is an environmental factor that influences the fish growth rate, parameter directly related with muscle plasticity and growth, we hypothesized that different rearing temperatures in juvenile of pacu, which presents an intense muscle growth by hyperplasia, can potentially alter the muscle cellularity that could influence the muscle growth patterns in this species. The aim of this study is to analyze the muscle growth characteristics and the expression of Myogenic Regulatory Factors, MyoD and myogenin, and the growth factor myostatin in juvenile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to the different rearing temperatures. Juvenile fish (1.5 g weight) were distributed in tanks containing water and maintained at 24 (G24), 28 (G28) and 32 (G32)°C (three replicates for each group) during 60 days. At days 30 and 60, fish were anesthetized, euthanized and muscle samples (n=12) were collected for morphological, morphometric and gene expression analyses. At days 30, the body weight and the standard length were lower in fish reared at 24 °C. Muscle fiber frequency in the class <25µm was significantly higher in fish reared at 24 °C, compared to the fish reared at 28 and 32 °C. Considering the frequency distribution of muscle fiber diameter in the class >50 µm, fish reared at 28 and 32 °C showed similar results and these was higher than that observed in fish reared at 24 °C. MyoD gene expression was higher in fish reared at 24 °C compared to that reared at 28 and 32 °C. Myogenin and myostatin mRNA levels were higher in fish reared at 24 °C compared to that reared in the temperature of 28 °C. At 60 days, body weight and standard length were higher in G32. At the same way, the G28 had an increase in body weight and standard length compared to the G24. The frequency distribution of muscle fiber diameter in the class <25µm was higher in G24 comparing to G28 and G32. In the class >50 µm, fish from G32 showed a higher percentage compared to G24. MyoD mRNA levels were similar in G24 and G32, and were higher in comparison to the expression levels observed in G28; myogenin mRNA levels were similar between G24 and G28, and G24 and G32, but were higher in G28 compared to G32. Myostatin mRNA levels were similar between the temperatures studied. According to our results, we can conclude that low rearing temperature was able to change the expression of muscle growth-related genes in juvenile of pacu. Our study provides a clear example of

thermally induced phenotypic plasticity in fish and shows that changing the rearing temperature during the juvenile stage of pacu can affect gene expression and muscle growth in this species.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*, Rearing temperature, Skeletal muscle growth, Myogenic Regulatory Factors, *Myostatin*

1. Introduction

Skeletal muscle makes up 40–60% of body mass in most fishes. As well as being a specific mechanical adaptation to aquatic life (Bone, 1978), this tissue also constitutes the edible part of the fish (Zhang et al., 1996; Sanger and Stoiber, 2001). Fish muscle is predominantly composed of white muscle, which comprises less than 70% of the bulk of myotomal muscle mass composed by fibers with glycolytic metabolism and fast-contracting (Driedzic and Hochachka, 1976; Zhang et al., 1996) and is used in fast swimming such as predation and escape behavior (Altringham and Johnston, 1988). Red muscle forms a thin superficial layer, generally making up less than 30% of total musculature (Greer-Walker and Pull, 1975; Hoyle et al., 1986; Luther et al., 1995) and is constituted by muscle fibers displaying aerobic metabolism and slow contraction; they are associated with slow cruise swimming such as migration and foraging (Bone, 1966; Johnston et al., 1977). There is an intermediate layer between red and white musculature which has intermediate characteristics (Sanger and Stoiber, 2001).

Fish muscle growth involves a population of proliferative myogenic progenitor cells or adult myoblasts (Johnston et al., 2011), that provide the essential nuclei for continuous production of muscle fibers (hyperplasia) in addition to an increase of fiber size (hypertrophy) (Zammit et al., 2006; McCarthy et al., 2011). These muscle growth mechanisms are controlled by several molecular pathways and there are complex interspecies differences not well understood in fish.

The MyoD family of muscle transcription factors play an important role during the development and muscle growth (Palmer and Rudnicki, 2003). The primary MRFs, MyoD and Myf5, direct the commitment and proliferating myogenic progenitor cells towards a myogenic lineage, and the secondary MRFs, myogenin and MRF4, control the terminal differentiation and fusion of myoblasts to form myotubes and mature in new fibers. The

others myoblasts are absorbed into existing muscle fibers to maintain the nuclear to cytoplasmic ratio as fibers increase in diameter with growth (Koumans et al., 1991).

Muscle growth is also controlled by the expression of GDF-8 (growth and differentiation factor-8), known as myostatin, a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily of proteins (McPherron et al., 1997). The myostatin, mostly expressed in skeletal muscle, was first identified in mice (McPherron et al., 1997) and has been demonstrated to negatively regulate skeletal muscle growth in several mammalian species. In contrast to that observed in mammals, myostatin role in fish may not be restricted to muscle growth regulation and may have other possible functions in other tissues, where this gene is also expressed (Østbye et al., 2001; Rodgers et al., 2001; Acosta et al., 2005; Patrino et al., 2008; Lee et al., 2009). In vitro studies have shown that myostatin inhibits the proliferation and the differentiation of myogenic cells by decreasing the level and the activity of MyoD and myogenin protein (Thomas et al., 2000; Ríos et al., 2001; Langley et al., 2002), through a physical interaction between MyoD and myogenin and the transcriptional factor Smad3/4, which is activated by myostatin (Liu et al., 2001; Langley et al., 2002).

Most fish species has wide ranges of thermal tolerance. However, the range of environmental comfort that provides ideal conditions for the functions of growth is specific for each species (Emerson, 1986). Several environmental factors such as water quality, oxygen availability and temperature, can affect the physiological systems and fish growth rate (Brett, 1979). The thermal conditions during early stages of development can influence the rate of myogenesis, muscle fiber cellularity and the expression of genes related with muscle development and growth pattern in adults (Alami-Durante et al., 2000; Purchase and Brown, 2001; Assis et al., 2004; Johnston, 2006; Alami-Durante et al., 2007; Campos et al., 2013).

Assis et al., (2004) studying muscle growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after eggs incubation in 25, 27 and 29°C, observed a high frequency of fibers in the class <10 and

20µm in fish maintained in low temperature. Similar results also were observed by Campos et al., (2013) in *Solea senegalensis*, where incubated fish 15 °C resulted in a high frequency of fibers with small diameter during 30 days post-hatching. Wilkes et al. (2001), observed in trout that different temperatures can modify the expression time of myogenic regulatory factors during the early stages of muscle development, modulating the proliferation and differentiation of mioblasts. The authors checked an increase in MyoD and myogenin gene expression in larvae of trout reared at lower temperature, 4 °C, compared to fish reared at higher temperature, 8 °C. The authors also observed that larvae reared in the temperature of 4 °C showed a total white muscle fiber number higher compared with larvae reared at 8 °C.

The pacu (*Piaractus mesopotamicus*) freshwater neotropical characid of commercial importance, is extensively cultivated in Brazilian aquaculture programs (Hernandez, 1989; Urbinati and Gonçalves, 2005). It is an omnivorous fish and one of the most important food species farmed in the Pantanal wetland areas of the Parana-Paraguay basin (Oliveira et al., 2004) and the reproduction occur between October and March when temperatures are hot and the rain is frequent (Romagosa et al., 1990). Pacu is a fast growing fish and can reach 1.2 kg in its first culture year (Bernardino and Colares de Melo, 1989). This fast growth depends on both hyperplastic and hypertrophic muscle growth mechanisms controlled by transcriptional and growth factors (Dal Pai et al., 2000; Johnston, 2006; Alami-Durante et al., 2007; Campos et al., 2013).

As temperature is an environmental factor influencing the fish growth rate, an important parameter for the success of aquaculture systems directly related with muscle plasticity and growth, we hypothesize that changes in temperature of cultivation during the juvenile stage in pacu, which presents an intense muscle growth by hyperplasia (Almeida et al., 2008), can potentially alter the muscle cellularity that in turn could influence the muscle growth pattern in this species. The aim of this study was to analyze the muscle growth

characteristics and expression of Myogenic Regulatory factors, MyoD and myogenin and the growth factor myostatin in juvenile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to the different rearing temperatures.

2. Materials and Methods

2.1 Fish samples

This experiment was approved by the Ethics Committee of the Biosciences Institute, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol nº 332).

The experiment was performed in the Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Presidente Prudente, SP, Brazil, and in the Skeletal Muscle Biology Laboratory (LBME), Department of Morphology, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Juvenile fish (1.5 g weight) were distributed in nine tanks (0,5 m³ and initial density of 15 fish m³), under three separated recirculation systems, whose temperatures were maintained at 24 °C (Group 24), 28 °C (Group 28) and 32 °C, (Group 32) (three replicates for each group), during the whole experiment (60 days). The fish were fed three times a day with commercial food containing 40% crude protein, until apparent satiation. During the experimental period, the following parameters of tank water quality were measured: temperature, dissolved oxygen, nitrite, nitrate and ammonia. The averages were as follows: 24 °C (23.65 °C; 7.33 mg / L; 1.2 mg / L; 20 mg / L and ; 0 mg / L), 28 °C (27.18 °C; 7.14 mg / L; 1.2 mg / L; 20 mg / L and ; 0 mg / L) and 32 °C (32.09 °C; 6.61 mg / L; 1.4mg / L; 30 mg / L and ; 0 mg / L).

At days 30 and 60, fish were anesthetized with benzocaine (100-200 mg / L in water), individually weighed (g), measured (mm) and euthanized. Muscle samples (n=12 for each group) were collected for morphological, morphometric and gene expression analysis.

2.2 Morphological and morphometric analysis

White muscle samples were fixed in 10% buffered formalin and preserved in 70% ethanol. Samples were dehydrated with a series of ethanol concentrations (80, 90 and 95%) and soaked in resin (Historesin - Leica Instruments GmbH, Germany), according to the manufacturer's recommendations. Transverse histological sections (4 μ m) of muscle fibers were obtained through a glass-razor microtome. Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) method.

The individual fiber area was determined by measuring 200 white muscle fibers from each animal per group, using a compound microscope attached to a computerized imaging analysis system (Leica Qwin, Wetzlar, Germany) (Dubowitz and Brooke, 1973). The fiber diameter (D) was estimated indirectly from individual fiber area (A) using the formula $D = 2A^{0.5} \pi^{-0.5}$ (Valente et al., 1999).

For each group, muscle fibers diameters were grouped into three classes: <25 μ m, 20-50 μ m, and >50 μ m, based on Almeida et al. (2010). Muscle fiber frequency was expressed as the number of fibers from each diameter class relative to the total number of fibers measured.

2.3 *MyoD*, *myogenin* and *myostatin* mRNA expression

Total RNA was isolated from dorsal white muscle samples using TRIzol Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The RNA extracted samples were quantified using a GE NanoVue Plus Spectrophotometer. RNA purity was ensured by obtaining a 260/280 nm OD ratio near to 2.0. The RNA integrity was assessed using a 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA calculating

the RNA. Integrity Number (RIN). The average RIN value for all samples was 8.95 ± 0.49 (scale 1–10), indicating high-quality RNA with minimal degradation.

Total RNA (2 μ g) was treated with Amplification Grade Deoxyribonuclease I according to the protocol provided by Invitrogen (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Purified total RNA were reverse transcribed with random hexamer primers and a High-Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), in a total volume of 100 μ l, according to the manufacturer's protocol. A sample without reverse transcriptase (NoRT) was used to verify DNase treatment efficiency.

MyoD, myogenin and myostatin gene expression levels were detected by quantitative real-time polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) using an ABI 7300 Real Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). A sample without cDNA template (NTC) was used to verify that the master mix was free from contaminants. Two microliters of cDNA (20ng/ μ l) were amplified using Power SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), and 400 nM of each primer (Table 1), to yield a final volume of 25 μ l. Real-time conditions were: 10 min at 95 °C, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15s, and annealing/extension at 60 °C for 1 min. The β -actin gene was used as a reference to normalize quantification of mRNA target.

Primer pairs for MyoD, myogenin, myostatin and β -actin were designed with reference to the cDNA nucleotide sequence from *Piaractus mesopotamicus* using Primer Express 3.0 software (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) (Table 1).

Table 1. Oligonucleotide *primers* used for RT-qPCR amplification of the genes MyoD, myogenin, myostatin and reference gene β -actin.

Gene	Sequence (5' → 3')	Size of amplified fragment (bp)
MyoD ^a	S: TACTACCCCGTCCTGGATCA A: GTCAGAGCCGCTTCAGTGTC	140
myogenin ^b	S: AGCGCAGCACATTGATGAAC A: TCCTCAGGATTTCACCTTTTGG	57
myostatin ^c	S:GACGGAAGGAGGCACATAAGAA A: CGTGACCCAGCGTTCAC	60
β -actin ^d	S: TCACAGAGGCTCCCCTGAAC A:CTCAAACATGATCTGGGTCATCT	64

S: primer sense; *A*: primer antisense; pb: bases pairs

GenBank accession numbers: a: FJ686692; b: FJ810421 c: HM561964, d: partial sequence not published

An amplification plot graphically displayed the fluorescence detected over the number of cycles that were performed.

The parameters signal baseline and threshold were set manually for each detector (MyoD, myogenin, myostatin and β -actin), generating a threshold cycle (Ct) for each sample.

The PCR efficiency of each individual assay was determined by creating standard curves for both targets and the reference gene. Standard curves were obtained by using serial dilutions (1:10) of sample cDNA and represented a semi-log regression line plot of Ct value vs. the logarithm of the starting amount of cDNA. The standard curve slope showed acceptable values, included between -3.8 and -3.3, as reported by Patruno et al., 2008.

The difference between Ct values was calculated for each target gene by taking the mean Ct of duplicate reactions and subtracting the mean Ct of duplicate reactions for the

reference gene ($\Delta Ct = Ct \text{ target gene} - Ct \text{ reference gene}$). All samples were then compared to the ΔCt value of a calibrator sample to obtain a $\Delta\Delta Ct$ value ($\Delta Ct \text{ target} - \Delta Ct \text{ calibrator}$). The animal lower expression of temperature of 24 °C was chosen as the calibrator sample to evaluate target gene putative differential mRNA expression relative to this sample.

Therefore, by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Ct comparative method), data were recorded as the fold-change in gene expression normalized with the reference gene and relative to the calibrator sample (Livak and Schmittgen, 2001). The specificity of each primer was confirmed by the presence of a single peak in the dissociation curve analysis.

2.4. Statistical Analysis

ANOVA complemented with Multiple Comparisons Test the (Tukey) was utilized to analyze body weight and standard length data (Zar, 2009). Muscle fibers diameters data were expressed as frequency percentage, analyzed by Goodman test between and within multinomial population (Goodman, 1965). Relative gene expression data were analyzed using the Kruskal-Wallis Test complemented by the Dunn Multiple Comparisons Test (Zar, 2009). Statistical significance level was set at $P < 0.05$ for all analysis.

3. Results

3.1 Anatomical data

During the experimental period, independent of the rearing temperature, the fish showed an increase in the body weight and standard length. At 30 days from the beginning of the experiment, body weight and standard length were lower in G24 compared to G28 and

G32, where these data were similar. At 60 days, body weight and standard length were higher in G32, in comparison to G28 and this was higher than in G24 (Table 2).

Table 2. Mean and standard deviation (SD) of the body weight (BW) (g) and standard length (LS)(cm) of juveniles pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in G24, G28 and G32, at 30 and 60 days.

Period	Variable	Groups			Value (p)
		G24	G28	G32	
30 days	BW	7,80(2,35)a	11,00(1,99)b	11,17(3,59)b	P<0,001
30 days	LS	5,81(0,61)a	6,46(0,34)b	6,52(0,62)b	P<0,001
60 days	BW	20,40(5,26)a	32,30(7,36)b	43,00(13,45)c	P<0,001
60 days	LS	8,08(0,66)a	9,54(0,73)b	10,50(1,10)c	P<0,001

Values with the same letters are not statistically significant (P<0,001, Tukey - Multiple Comparison)

3.2 Morphological and morphometric analysis

HE stain showed white skeletal muscle making up most of the muscle mass in all temperature studied. This muscle consisted of round and polygonal fibers separated by a fine septum of connective tissue, the endomysium. Thicker septa of connective tissue separate muscle fibers into fascicles comprising the perimysium. Muscle fibers were distributed in a mosaic pattern characterized by fibers of different diameters (Fig. 1).

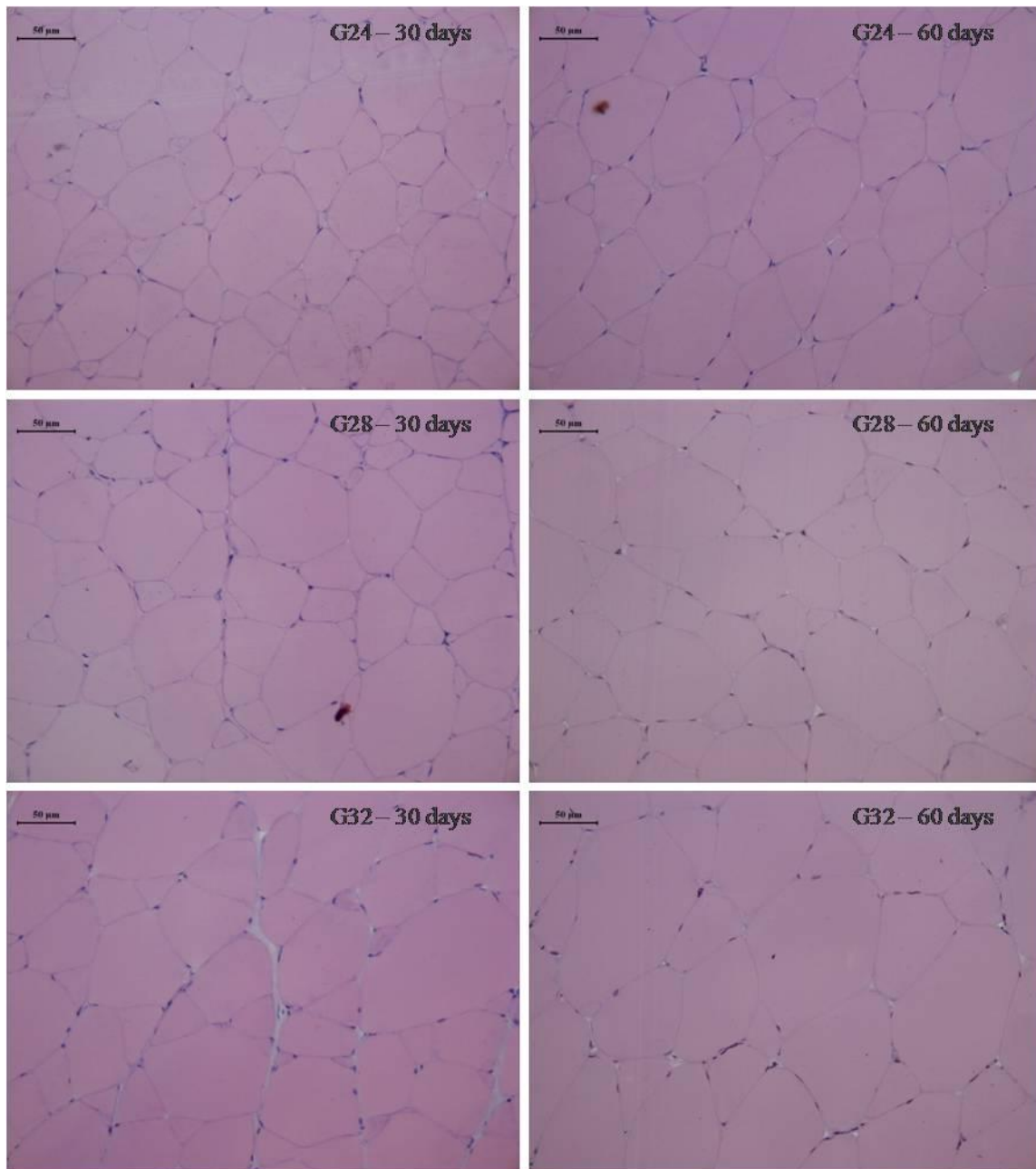


Fig. 1. Transverse sections of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) white skeletal muscle in G24, G28 and G32. A mosaic pattern of different muscle fiber diameters composed of small fibers (arrows) between large fibers (arrowhead) can be observed. Muscle fibers are separated by the endomysium (e). Perimysium (*) separates muscle fibers into fascicles. Haematoxylin-eosin stain. Scale bars: 50 μm .

The frequency distribution of white muscle fiber diameter in the class $<25\mu\text{m}$ was statistically different in all temperature studied. At 30 days, this fiber class was significantly higher in G24, compared to G28 and G32. The group 28 (G28) presented a significantly higher percentage of fiber in class $<25\mu\text{m}$ than G32.

The frequency distribution of muscle fiber diameter in the class 25-50 μ m was significantly higher in G32 compared to G24 and G28. Considering the frequency distribution of muscle fiber diameter in the class >50 μ m, G28 and G32 showed similar results and these were higher compared to G24 (Table 3).

Table 3. The frequency distribution (%) of white muscle fiber diameter in classes: <25 μ m, 20-50 μ m and >50 μ m of juveniles pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in G24, G28 and G32, at 30 and 60 days of the experiment.

Time period	Group	Diameter Classes (μ m)			Total Fibers
		< 25	25-50	>50	
30	G24	719 (59,9)c	468 (39,0)a	13 (1,1)a	1200
30	G28	602 (50,2)b	532 (44,3)a	66 (5,5)b	1200
30	G32	516 (43,0)a	633 (52,8)b	51 (4,3)b	1200
60	G24	508 (42,3)b	553 (46,1)a	139 (11,6)a	1200
60	G28	407 (33,9)a	629 (52,4)a	164(13,7)ab	1200
60	G32	423 (35,3)a	573 (47,8)a	204 (17,0)b	1200

Frequency distribution of white muscle fibers of juvenile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in diameter classes (μ m): class < 25; class 25-50 and class >50 at 30 and 60 days of the experiment. Small letters in the vertical line compare the frequency of fibers between the temperatures. Values with the same letters are not statistically significant. (P<0.05, Goodman test).

At the end of the experimental period (60 days), the frequency distribution of muscle fiber diameter in the class <25 μ m was higher in G24 comparing to G28 and G32; in these temperatures, the frequency distribution of muscle fiber diameter in the class <25 μ m was similar. In the class 25-50 μ m, muscle fiber frequency distribution was similar in all temperature studied and in the class >50 μ m, G32 showed a higher percentage comparing to G24.

3.3 *MyoD*, *myogenin* and *myostatin* mRNA expression

RT-qPCR results showed changes in gene expression in fish cultivated in different temperature. After 30 days of cultivation, *MyoD* gene expression was higher in G24

compared to G28 and G32. Myogenin and myostatin mRNA levels were higher in G24 compared to G28. The myogenin gene expression observed in G28 was similar to that observed in G24 and G32.

At 60 days, MyoD mRNA levels were similar in G24 and G32, and were higher in comparison to the expression level observed in G28; myogenin mRNA levels were similar between G24 and G28, and G24 and G32, but were higher in the temperature G28 compared to G32. At this period, myostatin mRNA levels were similar among the rearing temperatures studied (Figure 2).

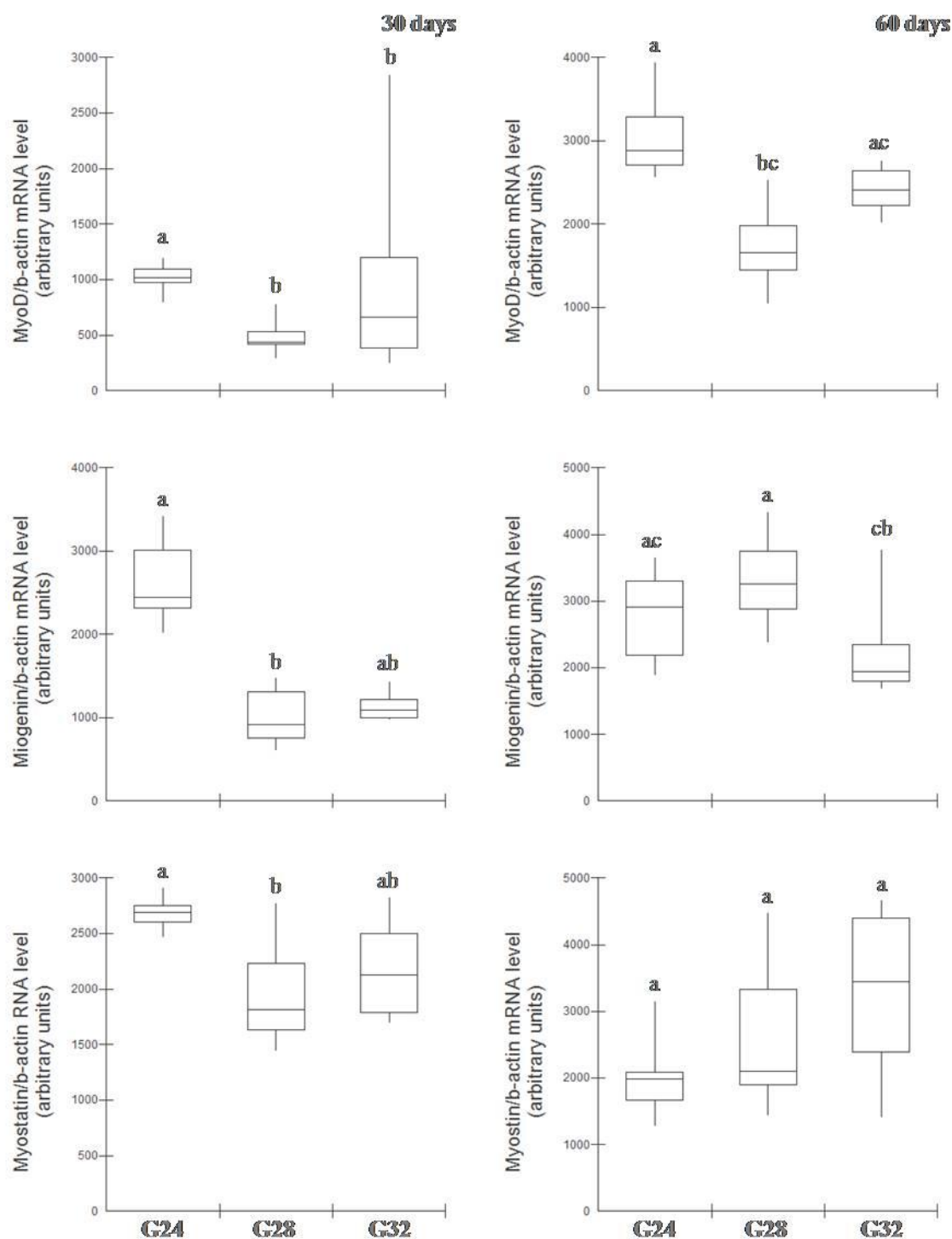


Fig. 2. Real-time RT-PCR quantification of MyoD (a), Myogenin (b) and Myostatin (c) mRNA expression in white skeletal muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in G24, G28 and G32 at 30 and 60 days. Data were expressed as minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum values. Values with the same letters are not statistically significant ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis Test complemented by the Dunn Multiple Comparisons Test).

4. Discussion

In the present work we demonstrate that differences in cultivation temperature changed the expression of muscle growth-related genes and muscle growth characteristics in juvenile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

In the studied temperatures (24, 28 and 32 °C), fish showed white muscle fibers in a mosaic distribution pattern that was characterized by fibers with different diameters, characteristic that is frequently described in fish during growth (Dal Pai et al., 2000; Dal Pai Silva et al., 2003; Assis et al., 2004; Carani et al., 2008; Almeida et al., 2008, 2010). However, studies have shown that muscle development in teleosts is sensitive to thermal conditions and can produce different phenotypes regarding muscle fiber growth pattern in the adults (Johnston, 2006).

In our study, at 30 and 60 days of cultivation, fish maintained in the temperature of 24 °C showed a high frequency of fibers in the class <25µm when compared to animals maintained in temperatures of 28 and 32 °C. Similar results also were observed by Assis et al., (2004) that studied muscle growth in pacu after eggs incubation in 25 °C and muscle analysis at 25 days of cultivation. Campos et al., (2013) also observed that low temperature of eggs incubation (15 °C) in *Solea senegalensis*, changed the muscle cellularity resulting in a high frequency of fibers with small diameter during 30 days post-hatching. These results in addition with ours, shows a great potential of low temperature promoting muscle fiber recruitment in fish, which can alter the muscle cellularity and the muscle growth rate.

In this work, all groups, except fish cultivated at 24 °C, showed significantly increase in length and body mass. Macqueen et al., (2008) observed a direct temperature effects on muscle development in juvenile and adult growth rate in *Salmo salar* L. The authors showed that, in spite of a low body mass and high small muscle fiber frequency in fish reared at lower

temperature (2 °C), this temperature was able to promote a compensatory growth in adult fish. Based on these results, we can infer that low temperature of cultivation in juvenile of pacu could influence the final growth rate of this species, leading to a compensatory growth in the post juvenile and adult stages.

Skeletal muscle growth in fish is a process involving populations of satellite cells, also called adult myoblasts (Koumans and Akster, 1995; Johnston, 1999; Johnston et al., 2011). These cells are activated and they proliferate and differentiate, providing the new muscle fiber formation (hyperplasia) or enlargement of muscle (hypertrophy) (Johnston et al., 2011).

During hyperplastic growth, new fibers are formed on the surface of existing fibers by satellite cells that fuse themselves to generate multinucleated myotubes (Johnston, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001). Hyperplastic growth mainly occurs in two waves (Rowlerson and Veggetti, 2001). The first is a continuation of embryonic myogenesis and takes place during part of larval life generating new fibers along a germinal or proliferative zone (Usher et al., 1994); it is responsible for thickening muscle mass in early developmental stages (Johnston et al., 2003; Rowlerson and Veggetti, 2001). This event is known as stratified hyperplasia and occurs in most fish species (Johnston, 1999). The second, mosaic hyperplasia, occurs in fish which grow to large sizes, such as the pacu, and new fiber production is found across the whole myotome, resulting in a mosaic pattern of different fiber diameters. In this work, although we observed the mosaic hyperplasia pattern in juvenile pacu during the experiment, the temperature of 24 °C promoted a higher capacity to pacu to recruit new fibers, fact that could influence the muscle growth rate and the ultimate adult size.

During the hypertrophic growth, as fibers expand they absorb satellite cells nuclei in order to maintain a relatively constant ratio between the nucleus and the cytoplasm of fiber (Koumans et al., 1994). In juvenile pacu analyzed, muscle fiber hypertrophy was the main

process observed in fish cultivated in the temperature of 28 and 32 °C, as demonstrated by the most muscle fiber frequency in the classes 25-50 and >50.

Hyperplasia and hypertrophy mechanisms are regulated by the sequential expression of the myogenic regulatory factors (MRFs) family which include MyoD, Myf5, myogenin, and the MRF4 (Watabe, 1999; Watabe, 2001). Studies in fish have shown that variations in rearing temperature can alter the gene expression of MRFs, modifying the muscle plasticity and cellularity in teleosts (Fernandes et al., 2006, 2007a, 2007b; Macqueen et al., 2007; Campos et al., 2013). During the embryonic development of *Takifugu rubripes*, the time required to form a somites was 122 min, 97 min and 50 min in embryos incubated at 15, 18 and 21 °C, respectively. The myogenin peak expression occurred later with respect to developmental stage and was over 2-fold higher at 21 than at either 18 or 15° C. The authors suggested that changes in myogenin expression might influence the number and size of muscle fibers in the larval/ juvenile stages and that these changes has a potential to alter the muscle differentiation (Fernandes et al., 2006). During metamorphosis, in *Solea senegalensis* hyperplastic growth was higher in larvae rearing at 18 °C compared with that rearing at 15 and 21 °C. Myf5 and Myod2 mRNA levels were significantly higher at several stages prior to hatching in embryos incubated at 21 °C compared with that cultivated at 15 and 28 °C. The authors concluded that incubation of *S. senegalensis* eggs at 15 °C produced a delay in embryonic development and smaller larvae with less and smaller fibers throughout growth compared to those incubated at 18 and 21 °C. Several key genes involved in growth and myogenesis were found to be differentially expressed with temperature, in a stage-dependent manner (Campos et al., 2013).

In this study, we observed that at 30 and 60 days of cultivation, juveniles of pacu maintained at the temperature of 24 °C showed an increase in MyoD gene expression (statistical significance at 30 days in G28 and G32 and 60 days in G28). During skeletal

muscle growth, MyoD controls satellite cell proliferation (Megeney and Rudnicki, 1995; Watabe, 2001; Kuang and Rudnicki, 2008). These cells provide nuclei for new muscle fiber formation (hyperplasia) and hypertrophy (McCarthy et al., 2011).

The mechanism underlying the increased MyoD mRNA expression found in fish maintained at 24 °C could be related to an intense satellite cell proliferation rate, responsible by the control of muscle fiber recruitment that occurred during the experimental periods analyzed, as observed by morphological and morphometric analysis. This expression pattern for MyoD was observed in both 30 and 60 days of cultivation.

At 30 days of cultivation, fish maintained at 24°C showed a higher Myogenin mRNA expression compared to 28 and 32 °C, and at 60 days, fish maintained at 28 °C showed a higher myogenin mRNA expression compared to 24 and 32 °C. According to Wilkes et al. (2001), the temperature can change the time expression of myogenic regulatory factors during the early stages of fish muscle development modulating the proliferation and differentiation of myoblasts. The authors observed an increase in MyoD and myogenin gene expression in larvae of trout reared in lower temperature, 4 °C compared to fish reared at higher temperature, 8 °C. The authors also observed that larvae reared in the temperature of 4 °C showed a total white muscle fiber number higher compared with larvae reared at 8 °C.

Based on the results observed in our study, we believe that the expression level of myogenin mRNA was able to induce a high rate of satellite cell differentiation, thus contributing to muscle fiber hyperplasia, more evident in fish cultivated at 24 °C, and hypertrophy more evident in fish cultivated at 28 and 32 °C.

At 30 days of cultivation, myostatin gene expression was higher in muscle of fish maintained in the temperature of 24 °C compared to fish that was maintained in 28 °C. At 60 days, the myostatin gene expression was similar in all temperature evaluated.

In mammals, several studies have investigated the actions of myostatin in skeletal muscle development and growth and it is well shown that this growth factor controls the muscle growth (McPherron et al., 1997; Lee and McPherron, 2001), by inhibiting not only the proliferation but also the differentiation of myogenic cells in vitro (Joulia et al., 2003; Trendelenburg et al., 2009). Indeed, myostatin inhibits satellite cell proliferation by activating the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which forces the withdrawal of the cell from the cell cycle maintaining them in a quiescent and undifferentiated state (Thomas et al., 2000; Manceau et al., 2008). In fish, although several works report an increase of muscle mass after decreasing myostatin activity (Lee et al., 2009; Medeiros et al., 2009), others studies did not show a strong effect of this growth factor on muscle mass, controlling the satellite cell proliferation and differentiation (Acosta et al., 2005; Sawatari et al., 2010).

Seiliez et al, (2012) using satellite cells culture of trout treated with human myostatin, observed that myostatin was not able to inhibit the differentiation of adult myoblasts. The authors also observed that myostatin did not affect MyoD and myogenin protein expression. These results are, in part, in agreement with the results observed in pacu at 30 days, after cultivation in 24 °C. Our results showed that despite a high level of myostatin mRNA content, the MyoD gene expression was high; this indicate a possible lack of inhibitory effect of myostatin on myoblast proliferation in skeletal muscle of juvenile pacu cultivated at 24 °C. In this condition, the high myostatin also did not inhibit the differentiation of myoblasts, detected by a high myogenin mRNA expression. However, a low myostatin gene expression pattern observed after 60 days of cultivation could be related with a high satellite cell proliferation and differentiation activity, confirmed by a high MyoD and myogenin mRNA levels, respectively.

Based on these results we can infer that the expression level of myostatin at 60 days could have been enough to promote satellite cell proliferation and differentiation for

hyperplasia and hypertrophy, also demonstrated by the distribution of the muscle fiber diameter classes.

5. Conclusion

Based on our results, we conclude that low rearing temperature can change the expression of muscle growth-related genes that promote muscle growth in juvenile of pacu. Our study provides a clear example of environmental factor inducing a phenotypic plasticity in fish and shows that rearing temperatures during the juvenile stage of pacu can have a considerable effect on gene expression and muscle growth.

Acknowledgments

This study was supported by Grant #2011/14538-7, São Paulo Research Foundation (FAPESP). This work is part of the M.Sc. Thesis presented by Tassiana Gutierrez de Paula to State University of São Paulo, UNESP, Bioscience Institute, in 2013.

References

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., Estrada, M.P., 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.* 119, 324-331.
- Alami-Durante, H., Bergot, P., Rouel, M., Goldspink, G., 2000. Effects of environmental temperature on the development of the myotomal white muscle in larval carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Biol.* 203, 3675-3688.
- Alami-Durante, H., Olive, N., Rouel, M., 2007. Early thermal history significantly affects the seasonal hyperplastic process occurring in the myotomal white muscle of *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Cell Tissue Res.* 327, 553-570.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron* 39, 1306-1311.
- Almeida, F.L.A., Pessoti, N.S., Pinhal, D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron* 41, 997-1004.
- Altringham, J.D., Johnston, I.A., 1988. The mechanical properties of polyneuronally myotomal muscle fibres isolated from a teleost fish (*Myoxocephalus scorpius*). *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 412, 524-529.
- Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 237, 251-267.
- Bernardino G., Colares de Melo, J.S., 1989. Estimativa do tamanho mínimo da amostra de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em monocultura, em viveiros experimentais. *Bol. Téc. CEPTA*, 2, 75-89.
- Bone, Q., 1966. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 46, 321-349.
- Bone, Q., 1978. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 361-424.
- Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and Insulin-Like Growth factors during myogenesis in atlantic salmon. *PLoS ONE* 5, e11100.
- Brett, J.R., 1979. *Environmental Factors and Growth Fish Physiology*. Academic Press London 8, 599-675.
- Campos, C., Valente, L.M.P., Conceição, L.E.C., Engrola, S., Sousa, V., Rocha, E., Fernandes, J.M.O., 2013. Incubation temperature induces changes in muscle cellularity and gene expression in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gene* 516, 209-217.

- Carani, F.R.; Aguiar, D. H. ; Almeida, F. L. A. ; Gonçalves, H. S. ; Padovani, C. R. ; Dal Pai-Silva, M. , 2008. Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). *Acta Scientiarum. Biol. Sciences* (Online) 30, 205-211.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anat. Histol. Embriol.* 29, 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C., 2003. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Arch. Fish Mar. Res.* 50, 149-160.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W., 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am. J. Physiol.* 230, 579-582.
- Dubowitz, V., Brooke, M.H., 1973. Muscle biopsy: A modern approach. WB Saunders Company, London.
- Emerson S.B., 1986. Heterochrony and frogs: the relation- ship of a life history trait to morphological form. *American Naturalist*.127,163-183.
- Fernandes, J.M.O., et al., 2006. Myogenin in model pufferfish species: comparative genomic analysis and thermal plasticity of expression during early development. *Comp. Biochem. Physiol. D. Genomics Proteomics* 1, 35–45.
- Fernandes, J.M.O., et al., 2007a. Differential regulation of multiple alternatively spliced transcripts of MyoD. *Gene* 391, 178–185.
- Fernandes, J.M.O., et al., 2007b. FoxK1 splice variants show developmental stage specific plasticity of expression with temperature in the tiger pufferfish. *J. Exp. Biol.* 210, 3461–3472.
- Gabillard, J. C., Sabin, N., 2010. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell Tissue* 342, 471–477.
- Goodman, L.A., 1965. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*, Washington, D.C. 7, pp 247-254.
- Greer-Walker, M., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish. Biol.* 7, 295-300.
- Hernandez, R.A., 1989. Cultivo de Colossoma. Guadalupe, Bogotá.
- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H., 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellunge, *E. masquinongy* (Mitchill). *J. Fish. Biol.* 28, 393-401.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2007. Estatística da pesca 2005. IBAMA, Brasília

- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential application for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Johnston, I.A. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 209, 2249-2264.
- Johnston, I.A., Bower, N.I., Macqueen, D.J., 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 214, 1617-1628.
- Johnston, I.A., Davison, W., Goldspink, G., 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.* 114, 203-216.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickel, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., Burt, M.L., 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 203, 2539-2552.
- Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., Cabello, G., 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.* 286, 263-275.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 3-20.
- Koumans JTM, Akster HA, Brooms GHR, Lemmens CJJ, Osse, J.W.M., 1991. Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). *J. Anat.* 192, 418-424.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Witkam, A., Osse, J.W.M., 1994. Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Fish Biol.* 44, 391-408.
- Kuang, S., Rudnicki, M.A., 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Mol. Med.* 14, 82-91.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49831-49840.
- Lee, C.Y., Hu, S.Y., Hu, S.Y., Gong, H.Y., Chen, M.H.C., Lu, J.K., Wu, J.L., 2009. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 766-771.
- Lee, S.J., McPherron, A.C., 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 9306-9311.
- Liu, D., Black, B.L., Derynck, R., 2001. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* 15, 2950-2966.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

- Lopez-Albors O, Ayala MD, Gil F, Garcí'a-Alca'zar A, Abellan E., 2003. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax*, during larval and juvenile stages. *Aquaculture* 220, 385–406.
- Luther, P.K., Munro, P.M.G., Squire, J.M., 1995. Muscle ultrastructure in the teleost fish. *Micron* 26, 431–459.
- Macqueen, D.J., Robb, D., Johnston, I.A., 2007. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 210, 2781–2794.
- Macqueen, D.J., Robb, D., Johnston, I.A., 2008. Temperature until the 'eyed stage' of embryogenesis programmes the growth trajectory and muscle phenotype of adult Atlantic salmon. *Biol. Lett.* 4, 294–298.
- Manceau, M., Gros, J., Savage, K., Thomé, V., McPherron, A., Paterson B., Marcelle C., 2008. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes Dev.* 22, 668–681.
- McCarthy, J.J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A.B., Srikuea, R., Lawson, B.A., Grimes, B., Keller, C., Zant, G.V., Campbell, K.S., Esser, K.A., Dupont-Versteegden, E.E., Peterson, C.A., 2011. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development*. 138, 3657–3666.
- McPherron, A. C., Lawler, A.M., Lee, S., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 387, 83–90.
- Medeiros, E.F., Phelps, M.P., Fuentes, F.D., Bradley, T.M., 2009. Over expression of follistatin in trout stimulates increased muscling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, 235–242.
- Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem. Cell Biol.* 73, 723–732.
- Oliveira, A.M.B.M.S.; Conte, L.; Cyrino, J.E.P., 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M; Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, 533p.
- Østbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., Andersen, Ø., 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem.* 268, 5249–5257.
- Palmer C.M., Rudnicki, M.A., 2003. The myogenic regulatory factors. *Adv. Dev. Biol. and Biochem.* 11, 1–32.
- Patrino, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and

- myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell Tissue Res.* 331, 643-58.
- Purchase, C.F. e Brown, J.A. 2001. Stock-specific changes in growth rates, food conversion efficiencies, and energy allocation in response to temperature change in juvenile Atlantic cod. *J. Fish Biol.*, 58, 36-52.
- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J., 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 561–566.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., Levine, M.A., 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142, 1412-1418.
- Romagosa, E., Paiva, P., Godinho, H.M., 1990. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) = *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), induced to spawn. *Aquaculture* 86, 105-110.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species, In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Acad. Press, London, pp. 103-140.
- Rudnicki, M.A., Jaenish, R., 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays*.17, 203-209.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press London, pp. 187-250.
- Sawatari, E., Seki, R., Adachi, T., Hashimoto, H., Uji, S., Wakamatsu, Y., Nakata, T., Kinoshita, M., 2010. 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.
- Seilliez, I., Sabin, N., Gabillard, J.-C., 2012. Myostatin inhibits proliferation but not differentiation of trout myoblasts. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 351, 220–226.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R., 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 40235-40243.
- Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., Glass, D.J., 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C1258–C1270.
- Urbinati, C.U., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B. & Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies nativas para a piscicultura no Brasil*. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 225-255.
- Usher, M.L., Stickland, N.C., Thorpe, J.E., 1994. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. *J. Fish Biol.* 44, 953-964.

- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., e Fauconneau, B. 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of Rainbow trout. *J. Fish Biol.* 55, 675-691.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors, In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Acad. Press, London, pp.19-41.
- Wilkes, D., Xie, S.Q, Stickland, N.C., Alami-Durante, H., Kentouri, M., Sterioti, A., Koumoundouros, G., Fauconneau, B., Goldspink, G., 2001. Temperature and myogenic factor transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Biol.* 204, 2763–2771.
- Zammit, P.S., Partridge, T.A., Yablonka-Reuveni, Z., 2006. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 1177–1191.
- Zar, J.H., 2009. *Biostatistical Analysis*, fourth 5th ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp 944.
- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C., 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *J. Morphol.* 229, 71-81.