

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO INICIAL NO**  
**CRESCIMENTO MUSCULAR E NA EXPRESSÃO DA MyoD**  
**E MIOGENINA EM LARVAS DE PACU**

**Natalia de Jesus Leitão**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Portella

Co-orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai-Silva

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2009

**unesp****UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


**TÍTULO:** INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO INICIAL NO CRESCIMENTO MUSCULAR E NA EXPRESSÃO DA MYOD E MIOGENINA EM LARVAS DE PACU

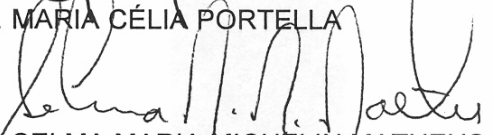
**AUTORA:** NATALIA DE JESUS LEITÃO


**ORIENTADORA:** Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

Co-Orientador(a): Dra. MAELI DAL PAI SILVA

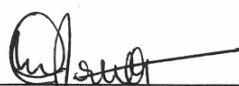
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em ZOOTECNIA pela Comissão Examinadora:

  
Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

  
Dra. SELMA MARIA MICHELIN MATHEUS

  
Dra. ROSANGELA KIVOKO JOMORI BONICHELLI

Data da realização: 28 de janeiro de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

### **NATALIA DE JESUS LEITÃO -**

nascida em 06 de novembro de 1984, na cidade de São Paulo - SP, é Zootecnista, formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Jaboticabal - SP, em 22 de julho de 2006. Foi bolsista de iniciação científica dos Programas PIBIC/CNPq/UNESP e PIBIC/REITORIA/UNESP. Recebeu o "Prêmio Dr. Henrique Francisco Raimo" outorgado pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo, pela aprovação em Primeiro Lugar no conjunto de disciplinas profissionalizantes do Curso de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal e o "Prêmio Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal" por ter obtido a maior média entre as disciplinas ministradas durante o Curso de Zootecnia, no ano letivo de 2006 – XLVI Turma de Zootecnia.

Somos muito mais capazes do que pensamos. Há momentos em que a única maneira de aprender é não tomar nenhuma iniciativa, não fazer nada. Porque, também nos momentos de total inatividade, nossa parte secreta está trabalhando e aprendendo.

KHALIL GIBRAN

Dedico este trabalho à  
minha mãe Márcia, à minha  
irmã Amanda e ao meu amor  
Gustavo por representarem  
tudo na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras: Profa. Dra. Maria Célia Portella e Profa. Dra. Maeli Dal Pai-Silva pelo carinho, amizade, atenção e dedicação;

Aos membros da Banca Examinadora: Dra. Rosângela Kiyoko Jomori Bonichelli e Profa. Dra. Selma Maria Micheli Matheus pela atenção e sugestões dadas ao trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelas concessões da Bolsa de Estudos e Auxílio à Pesquisa;

Aos colegas e funcionários do Caunesp que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho, compartilhando idéias e proporcionando conversas descontraídas;

Em especial, aos amigos Olívia Cristina C. Menossi, Thiago Mendes de Freitas, Rodrigo Takata, Luís Otávio M. Del Guerra, John A. Clavijo-Ayala, Renata Mukai Corrêa Gustavo Henrique Squassoni e Gisele Cristina Fávero pela grande ajuda na condução da larvicultura;

A todos que convivi do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado Esquelético, pela recepção, auxílio e cordialidade;

Ao Claudinei da Cruz pela disponibilidade e sugestões sobre as análises histológicas e à Fernanda Losi Alves de Almeida, pela amizade e auxílio nas análises moleculares;

À minha grande amiga Viviane Cristina Vieira pela leitura cuidadosa deste trabalho, atenção e disponibilidade;

Ao meu companheiro Gustavo Maciel Pizzato pelo apoio, compreensão e cumplicidade.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY .....	xiii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3 OBJETIVOS .....	8
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	9
4.1 Instalações e condições experimentais .....	9
4.2 Avaliação do crescimento e da sobrevivência das larvas.....	11
4.3 Análises morfológica e morfométrica.....	12
4.4 Análise de RT-PCR semiquantitativa dos genes MyoD e Miogenina .....	13
5 RESULTADOS .....	17
5.1 Desempenho e sobrevivência das larvas .....	17
5.2 Morfologia e morfometria das fibras musculares .....	23
5.3 Níveis de expressão do RNAm da MyoD e Miogenina por RT-PCR semiquantitativa.....	41
6 DISCUSSÃO .....	44

7 CONCLUSÕES .....	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Composição percentual da dieta experimental semipurificada, segundo Tesser (2005).....	11
<b>Tabela 2</b> - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de amplificação por PCR.....	15
<b>Tabela 3</b> - Valores médios de peso úmido (mg) das larvas de pacu submetidas a diferentes alimentações.....	17

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática dos tratamentos alimentares e quantidade de náuplios de artêmia oferecida às larvas de pacu .....	10
<b>Figura 2</b> - Valores médios de comprimento total (A) e peso úmido (B) das larvas de pacu submetidas a diferentes esquemas alimentares após início de alimentação exógena.....	19
<b>Figura 3</b> - Valores médios de comprimento total (A) e peso úmido (B) das larvas de pacu submetidas a diferentes esquemas alimentares após início de alimentação exógena.....	20
<b>Figura 4</b> - Taxas médias de sobrevivência das larvas de pacu submetidas a diferentes esquemas alimentares após início de alimentação exógena .....	21
<b>Figura 5</b> - Taxas médias de crescimento específico (TCE) das larvas de pacu submetidas a diferentes alimentações e esquemas alimentares após início de alimentação exógena.....	23
<b>Figura 6</b> - Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu em corte transversal .....	26
<b>Figura 7</b> - Distribuição das classes de diâmetro em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) das fibras musculares de larvas de pacu aos cinco dias (A), aos 11 dias (B) e aos 14 dias (C) de alimentação exógena.....	28
<b>Figura 8</b> - Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu (Tratamento A) em corte transversal aos 11 dias de alimentação com alimento vivo (larvas com 15 dias de vida e antes de iniciarem transição alimentar). .....	29

<b>Figura 9</b> - Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu (larvas com 15 dias de vida) em corte transversal .....	31
<b>Figura 10</b> - Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu (larvas com 18 dias de vida) em corte transversal .....	33
<b>Figura 11</b> - Distribuição das classes de diâmetro em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) das fibras musculares de larvas de pacu aos 23 dias de alimentação exógena. ....	35
<b>Figura 12</b> - Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu aos 23 dias de alimentação exógena (larvas com 27 dias de vida) em corte transversal .....	36
<b>Figura 13</b> - Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu aos 31 dias de alimentação exógena (larvas com 35 dias de vida) em corte transversal .....	38
<b>Figura 14</b> - Distribuição das classes de diâmetro em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) das fibras musculares de larvas de pacu aos 31 dias de alimentação exógena .....	40
<b>Figura 15</b> - Eletroferograma demonstrando a qualidade do RNA extraído das amostras musculares de larvas de pacu após a depleção do vitelo (T0) e aos 31 dias de alimentação exógena, constatada pela presença das bandas de RNAr 28S e 18S .....	41
<b>Figura 16</b> - Eletroferograma do produto de amplificação do gene parcial MyoD (A), Miogenina (B) e Gene Constitutivo 18S (C) em fibras musculares de larvas de pacu após a depleção do vitelo (T0) e aos 31 dias de alimentação exógena....	42
<b>Figura 17</b> - Conteúdo estimado de MyoD (A) e Miogenina (B) por RT-PCR na musculatura esquelética de larvas de pacu .....	43

## INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO INICIAL NO CRESCIMENTO MUSCULAR E NA EXPRESSÃO DA MyoD E MIOGENINA EM LARVAS DE PACU

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi verificar o crescimento hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares e avaliar a expressão diferencial dos fatores de regulação miogênica (MRFs), MyoD e Miogenina, na musculatura esquelética de larvas de pacu. Duas dietas formuladas (DC – dieta comercial e DE – dieta experimental) e alimento vivo (A) foram utilizados de acordo com os seguintes tratamentos: A: alimento vivo; DC e DE: dietas formuladas por todo período; ADC e ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista seguida pelas dietas formuladas; J: jejum. Biometrias foram realizadas aos 5, 11, 14, 23 e 31 dias para avaliação do crescimento. A taxa de sobrevivência foi determinada aos 31 dias. Análises histológicas foram realizadas para avaliação do crescimento muscular. A análise semiquantitativa da expressão gênica da MyoD e Miogenina foi realizada por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT – PCR) nos tratamentos A, ADC e ADE. Os maiores valores médios para comprimento, peso e sobrevivência foram obtidos com alimentação à base de alimento vivo (A). Mortalidade total ocorreu no 14º dia nos tratamentos DC e J. Apesar das diferenças no crescimento, a distribuição das fibras musculares nas classes de diâmetro e a expressão dos genes da MyoD e da Miogenina foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos A, ADC e ADE. A utilização exclusiva de microdietas não constitui uma prática viável para larvicultura do pacu. A substituição do alimento vivo por microdietas induz diferenças no crescimento, porém não compromete o potencial para o desenvolvimento muscular.

**Palavras-chave:** *Piaractus mesopotamicus*, larva de peixes, musculatura esquelética, hiperplasia e hipertrofia, MRFs, RT – PCR

## INFLUENCE OF INITIAL FEEDING ON MUSCLE GROWTH AND IN THE EXPRESSION OF MyoD AND MYOGENIN IN PACU LARVAE

**SUMMARY** – The aim of this study was to evaluate the hypertrophic and hyperplastic growth of muscle fibers and the differential expression of myogenic regulatory factors (MRFs), MyoD e Myogenin, in the skeletal musculature of pacu larvae. Two formulated diets (DC - commercial diet and DE - experimental diet) and live prey (A) were used according to the following treatments: A: exclusively live prey; DC and DE: formulated diets for the entire period; ADC and ADE: live prey for 11 days, three days of co-feeding and the following days of the experimental period with the formulated diets; J: starvation. Biometries were carried after 5, 11, 14, 23 and 31 days. Survival was determined at day 31. Histological analyses were made to evaluate the muscle growth. MyoD and Miogenina gene expression were determined by RT – PCR semiquantitative in A, ADC and ADE treatments. The highest means values for weight, length and survival were obtained when feeding with live prey (A). Total mortality of larvae was observed in the 14<sup>th</sup> day in DC and J treatments. Contrary to growth results, muscle fibers distributions in diameter classes and MyoD and Miogenina gene expression were similar ( $p > 0.05$ ) in A, ADC e ADE treatments. The exclusive feeding with microdiets does not constitute a viable food schedule for pacu larviculture. The substitution of live prey for microdiets induces differences in growth, but does not commit the potential for muscle development.

**Key words:** *Piaractus mesopotamicus*, fish larvae, skeletal musculature, hyperplastic e hypertrophic, MRFs, RT – PCR

## 1 INTRODUÇÃO

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe de crescimento rápido, de grande porte (100 cm de comprimento padrão e até 20 Kg) (CEMIG, 2000) podendo atingir 1,3 Kg em 12 meses de cultivo (URBINATI e GONÇALVES, 2005). Os mecanismos de crescimento por hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares nessa espécie ocorrem por um longo período, com predominância da hiperplasia nas fases larval e juvenil (ALMEIDA et al., 2008). Durante o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura, são retomados os eventos ocorridos durante a miogênese e os níveis de expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) estão relacionados com a hiperplasia e a hipertrofia dos mioblastos (JOHANSEN e OVERTURF, 2005).

Os MRFs, responsáveis por destinar as células mesodermis em linhagens musculares, estão envolvidos na iniciação e manutenção da diferenciação muscular (RESCAN, 2001; JOHNSTON, 2006). A MyoD é um fator primário, sendo expressa em mioblastos na fase de proliferação, enquanto que a Miogenina é expressa em células na fase de fusão e diferenciação em fibras musculares imaturas (JOHNSTON, 2006).

O padrão de crescimento muscular nos peixes pode ser influenciado por fatores externos, como o regime alimentar e a composição da dieta (KOUMANS e AKSTER, 1995). Em estudos realizados com o pacu, JOMORI et al. (2008) demonstraram que larvas alimentadas com dieta formulada desde a primeira alimentação têm sua taxa de crescimento em comprimento e peso reduzida em comparação com a alimentação à base de náuplios de artêmia, e que a qualidade da dieta formulada pode determinar um maior ou menor atraso nesse crescimento.

A transição alimentar endógena para a exógena reflete acentuado aumento da massa muscular durante o desenvolvimento, decorrente dos processos de hipertrofia e hiperplasia. A utilização de dietas não adequadas nessa fase pode afetar a sobrevivência larval e influenciar o crescimento (TESSER e PORTELLA, 2003; JOMORI et al., 2005; TESSER, 2005). O atraso do crescimento em função da alimentação

inadequada ocasiona redução da musculatura esquelética, que constitui a fração comestível do peixe (FAUCONNEAU e PABOEUF, 2001).

A taxa de crescimento de peixes cultivados é um dos mais importantes aspectos para o sucesso da aquicultura, embora os fatores externos que interferem no crescimento muscular nos estágios iniciais de vida não estejam totalmente elucidados. Grande parte dos estudos que visam à caracterização morfológica e a compreensão do crescimento da musculatura esquelética vêm sendo realizados com animais de crescimento rápido, principalmente espécies utilizadas como alimento ou aquelas que a qualidade ou o aumento da massa muscular tenha importância comercial (JOHNSTON, 1999).

O conhecimento sobre a expressão dos MRFs, que regulam os mecanismos de hiperplasia e hipertrofia muscular, pode indicar estratégias que beneficiem o desenvolvimento e o crescimento muscular de espécies de peixes cultivadas comercialmente. Assim, o esclarecimento de mecanismos que controlam o crescimento muscular de espécies de interesse econômico é de importância para a aquicultura, principalmente em espécies cultivadas em grande escala.

Dessa forma, este estudo teve por objetivo avaliar o crescimento muscular e a expressão diferencial da MyoD e Miogenina durante o desenvolvimento de larvas de pacu *P. mesopotamicus* alimentadas com diferentes alimentos e em diferentes estratégias alimentares.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os peixes teleósteos são encontrados em diversos ambientes que geralmente oferecem variadas condições de temperatura, salinidade, concentração de oxigênio, pH, luminosidade, fluxo de água e disponibilidade de alimento. Individualmente e em conjunto, as variáveis ambientais afetam toda fisiologia dos peixes, inclusive o crescimento (WEST-EBERHARD, 2003). Pesquisas realizadas no Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP) mostraram que as larvas de peixes tropicais têm seu crescimento e desenvolvimento intimamente afetados pela qualidade e quantidade de dieta que recebem nesta fase (TESSER e PORTELLA, 2003; LUZ et al., 2004; CERICATO, 2005; JOMORI, 2005; JOMORI et al., 2005; TESSER, 2005), como também ressaltado por FAUCONNEAU e PABOEUF (2001).

As larvas de peixes teleósteos apresentam grande potencial de crescimento (DABROWSKI et al., 2003); mas quando passam precocemente pela transição do alimento vivo para o alimento inerte (“weaning”), muitas vezes observam-se baixa taxa crescimento e elevada mortalidade (GUERRERO-ALVARADO, 2003; CERICATO, 2005; JOMORI, 2005; TESSER et al., 2005a). O fornecimento conjunto de alimento vivo e inerte (“co-feeding”) às larvas de pacu provoca melhora no estado nutricional das larvas e facilita a aceitação da dieta, proporcionando um crescimento mais rápido, principalmente quando o tempo de manutenção do alimento vivo é maior (JOMORI, 2005; TESSER et al., 2005a).

O insucesso da utilização exclusiva de microdietas na larvicultura de peixes também pode ser atribuído à baixa organização do trato digestório das larvas altriciais, o que resulta em reduzida atividade enzimática e digestão protéica, prejudicando o crescimento desses animais (DABROWSKI, 1984). As taxas de sobrevivência e de crescimento de larvas de pacu podem apresentar melhores resultados quando a dieta formulada oferecida a elas apresenta suplementação de enzimas digestivas exógenas, como a pancreatina suína (TESSER et al., 2006).

O prejuízo no crescimento dos animais em função das estratégias alimentares e qualidade do alimento fornecido às larvas implica na redução da musculatura estriada esquelética que compreende, pelo menos, 60% da massa corporal na maioria dos teleósteos (SÄNGER e STOIBER, 2001). Essa abundante massa muscular, além de representar um importante tecido para a adaptação desses animais no ambiente aquático, também é a porção do peixe mais interessante para a alimentação humana.

A musculatura estriada esquelética, na maioria das espécies de peixes, está organizada em miômeros que, por sua vez, estão separados por miosseptos. Os miômeros são unidades morfofuncionais que se repetem ao longo do corpo do animal e os miosseptos são bainhas de tecido conjuntivo que os separam (ALEXANDER, 1969). Na região do nervo da linha lateral, um septo de tecido conjuntivo, o septo transversal, separa a massa muscular em regiões epiaxial e hipoaxial (ALEXANDER, 1969).

Análises morfológica e histoquímica do tecido muscular esquelético mostram que as fibras musculares se distribuem em três compartimentos: vermelho, intermediário e branco, com predomínio do compartimento branco (KILARSKI, 1990). A distribuição das fibras musculares nos compartimentos é variável entre as espécies de peixes e entre os diferentes estágios de desenvolvimento desses animais. A musculatura vermelha pode se estender ao longo de todo o corpo do animal em uma fina camada na região subdermal (DAL PAI-SILVA et al., 1995) ou apresentar-se de forma mais localizada na região do nervo da linha lateral (HOYLE et al., 1986).

O compartimento vermelho é formado por fibras musculares de contração lenta e de metabolismo oxidativo que são utilizadas na realização de movimentos lentos e de sustentação, como a migração (JOHNSTON, 1980). Normalmente são menores (25 a 45µm de diâmetro) que as fibras intermediárias e brancas (JOHNSTON, 1999).

O compartimento branco é constituído por fibras de contração rápida e de metabolismo glicolítico (JOHNSTON e HOME, 1994), as quais apresentam baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias e lipídios, e as miofibrilas ocupam entre 75 e 95% do volume total da fibra (SÄNGER, 1992). Esse tipo de musculatura é utilizado nos movimentos bruscos de natação, como a captura de alimento e fuga de predadores (JOHNSTON, 1980).

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 (SÄNGER e STOIBER, 2001), como contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (WEATHERLEY e GILL, 1987).

A análise do processo de miogênese nos peixes mostra que as fibras musculares vermelhas e as brancas originam-se de diferentes células precursoras ou mioblastos e que durante esse processo, ocorre a fusão de mioblastos originando os miotubos ou fibras musculares imaturas (RESCAN, 2001; JOHNSTON e HALL, 2004; RESCAN, 2005). Os miotubos possuem um ou mais núcleos em posição central, miofibrilas em posição periférica e características morfológicas e fisiológicas próprias (JOHNSTON et al., 1995). Nos miotubos, ocorre a organização das proteínas que irão constituir a unidade contrátil, o sarcômero (HUXLEY, 1969). Durante a diferenciação dos miotubos, os sarcômeros migram da periferia em direção ao centro do miotubo, enquanto que os núcleos migram do centro para a periferia e o miotubo passa a ser chamado de fibra muscular adulta (JOHNSTON et al., 1995).

O crescimento do músculo é regulado positivamente e negativamente por uma variedade de fatores de crescimento e de transcrição. Durante o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura é observada a retomada dos eventos ocorridos durante a miogênese, tendo em vista que os níveis de expressão dos MRFs estão relacionados com a hiperplasia e a hipertrofia dos mioblastos (JOHANSEN e OVERTURF, 2005).

Os fatores responsáveis por destinar as células mesodermais em linhagens musculares estão envolvidos na iniciação e manutenção da diferenciação muscular (RESCAN, 2001; JOHNSTON, 2006). Estes fatores incluem hormônios de crescimento (MOMMSEN e MOON, 2001) e ação direta ou indireta de proteínas, como os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) (TAN e DU, 2002), que apresentam especificidade muscular (COLE et al., 2004; ZHANG et al., 2005; GALLOWAY et al., 2006).

Entre os MRFs, a MyoD e o Myf5 são os fatores primários, expressos em mioblastos na fase de proliferação celular, que antecede a de diferenciação, enquanto

que a Miogenina, o MEF2 e o MRF4 são expressos em células na fase de fusão e diferenciação em fibras musculares imaturas (JOHNSTON, 2006). Na maturação dos somitos, a MyoD tem sua expressão diminuída, exceto nos somitos caudais, onde essa proteína continua sendo expressa em níveis semelhantes (ZHANG et al., 2005).

O crescimento muscular pós-embrionário envolve as células miogênicas progenitoras (CMPs), análogas às células mio-satélites em músculos de mamíferos. Essas células, de origem embrionária, são afetadas diretamente pelos fatores abióticos (temperatura, período de luz, hipóxia etc) e fatores bióticos (disponibilidade de alimento e infecções parasitárias). Esses fatores provocam efeitos na regulação da proliferação e diferenciação, degradação e síntese protéica e expressão gênica de proteínas (JOHNSTON, 2006). A temperatura interfere no número e tamanho das fibras musculares, nas fases larval e juvenil (ASSIS et al., 2004) e a alimentação, na proliferação destas (FAUCONNEAU e PABOEUF, 2001).

As CMPs são responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares. Na hipertrofia, as CMPs se fundem com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, enquanto que, na hiperplasia ocorre a formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em novas fibras musculares (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001).

No músculo miotomal há duas fases principais de miogênese: hiperplasia estratificada e hiperplasia em mosaico. A hiperplasia em mosaico é quantitativamente a mais importante fase da miogênese, porém, de acordo com JOHNSTON (2006), na fase larval dos teleósteos predomina a fase de hiperplasia estratificada.

A hiperplasia estratificada é a responsável pelo espessamento das camadas musculares e ocorre a partir das zonas germinais de proliferação celular nas regiões dorsal e ventral dos miômeros (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001). A hiperplasia em mosaico é caracterizada por fibras pequenas (diâmetro menor que 25µm) entre fibras maiores, formando um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação (JOHNSTON, 1999). Esse tipo de crescimento muscular, melhor

observado na musculatura branca, é mais comum a espécie de maior valor comercial e que atinge grande porte na fase adulta (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001).

O pacu (*P. mesopotamicus*) (Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei), encontrado nas Bacias dos Rios Paraná, Paraguai e Uruguai, e de grande potencial para a piscicultura (OLIVEIRA et al., 2004; URBINATI e GONÇALVES, 2005), foi escolhido como modelo devido sua facilidade de adaptação para criação em cativeiro, além de possuir carne de excelente qualidade. Adicionalmente, vários aspectos relacionados à alimentação inicial das larvas de pacu já foram estudados (JOMORI, 1999; JOMORI et al., 2003; TESSER e PORTELLA, 2003; JOMORI, 2005; JOMORI et al., 2005; TESSER, 2005; TESSER et al., 2005a; TESSER et al., 2005b).

A hipótese desse estudo foi que os mecanismos de crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras e a expressão dos MRFs (MyoD e Miogenina), na musculatura do pacu, podem ser influenciados pela alimentação, uma vez que o crescimento das larvas de pacu varia de acordo com a qualidade da dieta oferecida ou com a estratégia alimentar em que são submetidas durante o período inicial de alimentação exógena.

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Comparar o desempenho zootécnico (peso, comprimento e sobrevivência) e o crescimento muscular de larvas de pacu tratadas com alimento vivo ou com dietas formuladas como substitutos parciais ou totais do alimento vivo, nas primeiras semanas de vida;
- Avaliar a expressão dos MRFs, MyoD e Miogenina, na musculatura do pacu, correlacionando-a com os mecanismos de crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico entre larvas de pacu tratadas com alimento vivo ou com dietas formuladas como substitutos parciais do alimento vivo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

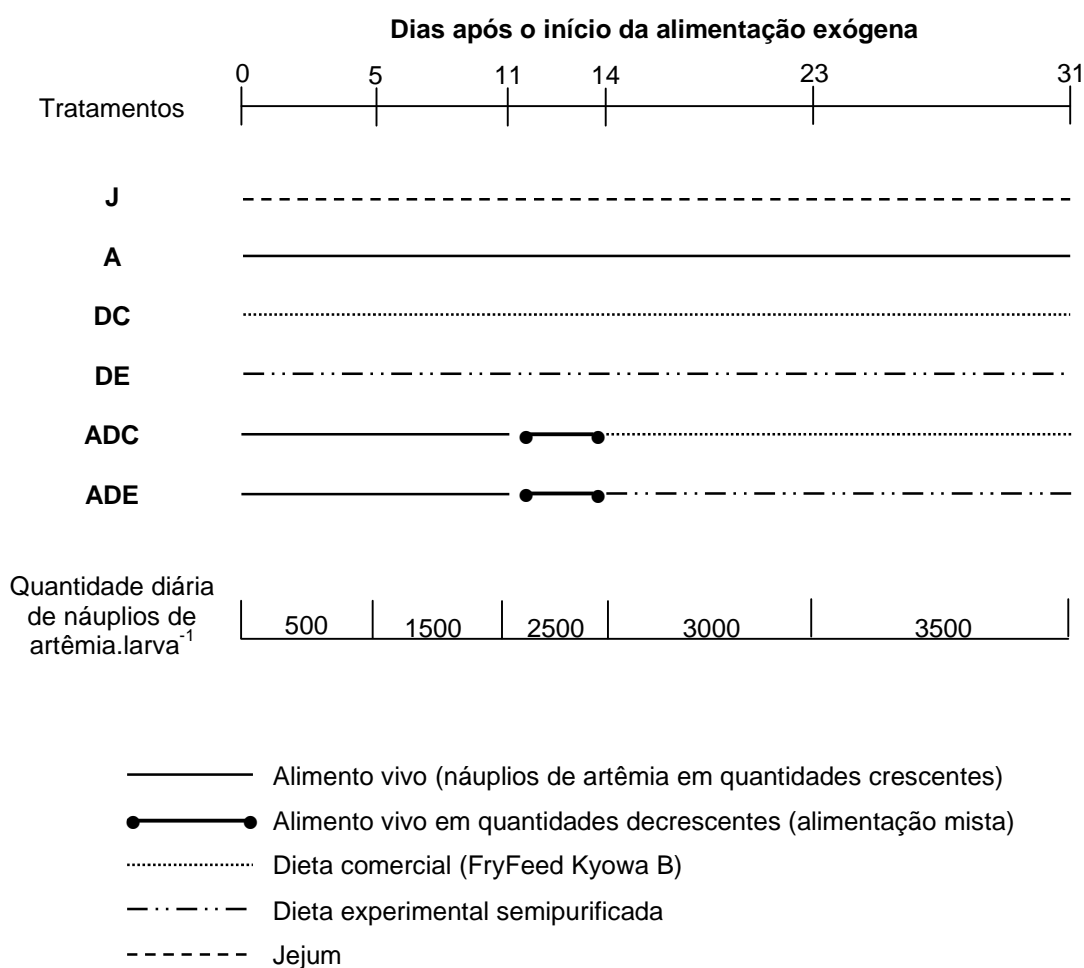
### 4.1 Instalações e condições experimentais

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP e no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Instituto de Biociência da UNESP, Botucatu, SP. As larvas de pacu, obtidas por reprodução induzida de um único casal de reprodutores, com quatro dias após a eclosão e iniciando a alimentação exógena, foram estocadas numa densidade de 10 larvas.L<sup>-1</sup>, em 30 tanques de polietileno com 100 litros de água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo e com aeração artificial constante. As variáveis de qualidade da água observadas foram 6,5 ± 0,2mg/L para oxigênio dissolvido e 7,7 ± 0,6 para pH, respectivamente. As médias de temperatura apresentaram variações de 28,9 ± 0,6°C. Os resíduos acumulados no fundo dos tanques foram removidos por sifonamento diariamente.

As larvas com médias de comprimento total de 5,90 ± 0,22mm e peso úmido de 0,77 ± 0,12mg foram submetidas a seis esquemas alimentares. Duas dietas formuladas foram testadas, sendo uma dieta experimental semipurificada (TESSER, 2005) e uma dieta comercial (FryFeed Kyowa B, Kyowa Kogyo, Japão). Além das dietas formuladas, dois grupos foram utilizados como controle, larvas alimentadas somente com alimento vivo por todo período e larvas mantidas em jejum. Os tratamentos alimentares são apresentados na Figura 1.

Para análise estatística considerou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo os esquemas alimentares comparados nos períodos de avaliação (5, 11, 14, 23 e 31 dias), com cinco repetições cada. Os dados de sobrevivência e taxa de crescimento específico foram transformados em  $y = \arcsin \sqrt{x/100}$ , onde x indica o valor da porcentagem da sobrevivência ou da taxa de crescimento específico, para posterior análise da variância.

As larvas foram alimentadas cinco vezes ao dia (8:00; 11:00; 14:00; 17:00; 20:00). Para evitar a dispersão e possível perda de dieta, a circulação da água foi interrompida por 30 minutos após o seu fornecimento. Durante o período de alimentação mista, as dietas formuladas foram oferecidas em excesso logo após o fornecimento do alimento vivo que foi diminuído diariamente nas proporções de 25, 50 e 75%.



**Figura 1.** Representação esquemática dos tratamentos alimentares e da quantidade de náuplios de artêmia oferecida às larvas de pacu.

As dietas formuladas apresentaram composição química (analisada) em 51% de proteína bruta e 14 e 8% de extrato etéreo para dieta comercial e experimental, respectivamente. A composição da dieta experimental está na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição percentual da dieta experimental semipurificada, segundo Tesser (2005).

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>
Caseína	42,5
<sup>1</sup> CPP	5,0
Gelatina	8,0
Dextrina	8,0
<sup>2</sup> Farinha de maca	15,0
Óleo de peixe	4,0
Suplemento vitamínico e mineral	8,95
Ácido ascórbico	0,05
Lecitina de soja	4,0
Carboximetilcelulose	1,8
L-Arg	0,5
L-Met	0,4
L-Lis	0,8
Cloreto de colina	1,0

<sup>1</sup> CPP (Concentrado protéico de peixe): 76,7% de proteína bruta e 4,78% de extrato etéreo.

<sup>2</sup> Farinha de maca: 12,9% de proteína bruta e 0,76% de extrato etéreo.

#### **4.2 Avaliação do crescimento e da sobrevivência das larvas**

Para avaliação do crescimento, 50 larvas de cada réplica experimental foram coletadas aos cinco, 11, 14, 23 e 31 dias após início da alimentação exógena (fixadas em formol 10% e preservadas em álcool 70%). Determinaram-se comprimento total (mm) e peso úmido individual (mg) das larvas usando-se paquímetro digital e balança

analítica digital Chyo modelo JS-110 (precisão 0,0001g). Ao final do experimento, também foram determinadas as taxas de sobrevivência em cada tratamento.

A partir dos dados biométricos a taxa de crescimento específico (TCE) foi calculada pela seguinte fórmula:  $TCE = (Ln \text{ comprimento final} - Ln \text{ comprimento inicial}) \times 100 / \text{intervalo de tempos (dias) entre biometrias}$ .

Os resultados de comprimento total, peso, sobrevivência e taxa de crescimento específico foram analisados estatisticamente através de Análise de Variância Paramétrica (ZAR, 1999), considerando-se os resultados médios das réplicas de cada parcela experimental. Para os resultados que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), as médias foram estudadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Todas as variâncias biométricas foram submetidas a testes para a verificação da normalidade (Cramer Von Mises) e homocedasticidade das variâncias (Levene).

### 4.3 Análises morfológica e morfométrica

As amostras das larvas ( $n = 5$ ) foram coletadas ao longo do experimento, simultaneamente às coletas para avaliação do crescimento. As larvas foram fixadas em formaldeído 10% tamponado (pH 7,4). Após 24 horas essas amostras foram lavadas e preservadas em solução alcoólica 70%.

Para os estudos histológicos da musculatura esquelética de larvas de pacu, as amostras fixadas em formaldeído foram incluídas em Historesina® (Leica, Germany). As larvas foram desidratadas em concentrações alcoólicas crescentes, até álcool 95% e submetidas à pré-infiltração com solução de glicol-metacrilato e ativador (embedding kit - Leica) e etanol a 95% (1:1 v/v), durante 4 horas. Em seguida o material foi embebido em glicol-metacrilato e ativador *over-night*.

Posteriormente, o material foi incluído em solução de pré-inclusão (glicol-metacrilato + ativador) com polimerizador, em molde histológico. Após o endurecimento parcial da solução, os blocos foram colocados em estufa à temperatura de 37°C *over-night*, para polimerização e

endurecimento total. Cortes histológicos transversais, com três micrômetros de espessura, foram obtidos com a utilização de micrótomo automático LEICA, modelo RM 2155, utilizando-se navalhas de vidro e, posteriormente, corados com Azul de Toluidina a 1% e Floxina B a 0,5%.

Utilizando um sistema de análise de imagens (Leica Qwin, Germany), foi calculado o menor diâmetro de 100 fibras musculares por animal, no compartimento profundo, localizado na região epiaxial (ALMEIDA et al., 2008), para avaliar o crescimento muscular das larvas de pacu submetidas a diferentes alimentações e esquemas alimentares. No caso das larvas que não apresentaram crescimento, foram medidas todas as fibras da região avaliada. O menor diâmetro foi determinado para não permitir os erros que poderiam ocorrer caso algum exemplar não tivesse sido seccionado exatamente em corte transversal (DUBOWITZ, 1985).

Posteriormente, as fibras musculares foram distribuídas em classes, na dependência do seu diâmetro ( $\leq 10$ ,  $\leq 20$ ,  $\leq 30$ ,  $\leq 40$  e  $> 40\mu\text{m}$ ), baseando-se nos resultados obtidos por ASSIS et al. (2004) para avaliar o grau de crescimento hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares de larvas de pacu.

#### **4.4 Análise de RT-PCR semiquantitativa dos genes MyoD e Miogenina**

A avaliação da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica, MyoD e Miogenina, na musculatura esquelética do pacu foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT - PCR).

Os exemplares de pacu aos quatro dias após a eclosão (T0) e ao final de 31 dias dos esquemas alimentares A, ADC e ADE foram anestesiados e abatidos em gelo. Fragmentos da musculatura esquelética (cerca de 50mg de tecido) foram coletados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido, e estocados à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Os fragmentos musculares foram homogeneizados mecanicamente (IKA UltraTurrax/T-25) com 1mL de TRIzol (Invitrogen). O homogeneizado foi incubado

durante 5min, à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos.

Foram acrescentados 200µL de clorofórmio em cada amostra. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 3min à temperatura ambiente. Posteriormente foram centrifugadas a 12.000xg por 15min a 4°C.

A fase aquosa formada após a centrifugação do material foi transferida para um novo tubo. O RNA foi precipitado por intermédio de incubação com 500µL de álcool isopropílico, durante 10min à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 10min a 4°C e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após, foi lavado com 1mL de etanol 75% a 4°C e centrifugado a 7.500xg por 5min a 4°C.

O RNA total foi dissolvido em água destilada e estéril (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma - DEPC, a 0,01%), incubado por 10min à temperatura de 60°C para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase e armazenado à -80°C. Foi realizada a quantificação por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA (40) e determinada a razão entre 260 e 280 nm que forneceu uma estimativa da qualidade da extração (razão  $\geq 1,65$ ). A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE de Tris-Ácido Bórico-EDTA1X (108g de Tris-base, 40mL de EDTA 0,5M e 55g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a pH = 8,0).

A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 120V durante 60min. Após a eletroforese, o gel foi corado com SYBR Safe (Invitrogen) por 50min. As amostras de RNA total foram visualizadas sob luz UV e documentadas em fotodocumentador modelo Foto UV 450 DNA Transilluminator (Fotodyne Incorporated).

A transcrição reversa do RNA total (produção de cDNA) foi realizada utilizando-se os componentes do "First-Strand cDNA Synthesis Kit" (Amersham Biosciences - GE Healthcare). Uma mistura contendo 4µg de RNA total, com o volume total ajustado para 8µL de água livre de DNase e RNase (Gibco), 5µL de "Bulk First-Strand cDNA Reaction Mix", 1µL de solução DTT e 1µL do oligonucleotídeo pd(N)<sub>6</sub>, foi incubada por 10min a 65°C.

Os oligonucleotídeos iniciadores, utilizados para a amplificação do cDNA, foram obtidos a partir da seqüência codificante do gene da MyoD descrita em *P. mesopotamicus* por ALMEIDA et al. (2008) e os utilizados para a amplificação do gene da Miogenina foram construídos a partir da seqüência codificante obtida de diversas espécies de peixes teleósteos (DAL PAI-SILVA et al., resultados não publicados) . Os oligonucleotídeos para o gene RNA ribossomal (RNAr) 18S (controle interno) foram elaborados com base na seqüência desse gene descrita para diversas espécies de peixes teleósteos por TOM et al. (2004) (Tabela 2).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se “PCR SuperMix” (Invitrogen) em um volume final de 25µL contendo: 22,5µL SuperMix, 1µL do produto de cDNA, 0,5µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10µM) e 0,5µL de água livre de RNase e DNase (Gibco).

**Tabela 2.** Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de amplificação por PCR.

Produto	Seqüência	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
MyoD	Forward: 5' - CTAACCAGAGGCTGCCHAAG - 3'	288
	Reverse: 5' - CACGATGCTGGACAGACAGT - 3'	
Miogenina	Forward: 5' - TGGAGCTTTTYGAGACCAAC - 3'	620
	Reverse: 5' - AGATTGGCTTGCTCCGAAGA - 3'	
RNAr 18S	Forward: 5' - TACCACATCCAAAGAAGGCAG - 3'	245
	Reverse: 5' - TCGATCCCGAGATCCAACACTAC - 3'	

As reações de amplificação para os segmentos dos genes da MyoD e Miogenina foram baseadas no protocolo descrito por ALMEIDA et al. (2008). O programa adotado para esta etapa de análise foi: 3min a 94°C seguido de 35 ciclos de 1min a 94°C, 1min e 30s a 55°C, 2min a 72°C e em seguida 10min a 72°C. Para a reação do gene constitutivo RNAr 18S, utilizou-se as seguintes condições: 2min a 94°C seguido de 32 ciclos de 1min à 94°C, 1min à 57°C, 1min à 72°C e em seguida 5min à 72°C.

A análise do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE de Tris-Ácido Bórico-EDTA 1X corado com SYBR Safe

(Invitrogen), em comparação ao padrão de tamanho molecular de 100pb (Norgen Biotek Corporation, Canadá). O produto amplificado foi visualizado utilizando-se o Foto UV 450 DNA Transilluminator (Fotodyne Incorporated).

Os fragmentos correspondentes a cada gene foram quantificados, determinando-se a densidade óptica X área em pixels (densidade óptica integrada – IOD) de cada um deles, usando Kodak one-dimensional (1-D) image analysis system (Eastman Kodak, Rochester, NY). Os valores obtidos para a expressão de MyoD e Miogenina foram normalizados em relação aos valores obtidos para a expressão do gene RNAr 18S. A análise de eletroforese dos produtos de PCR foi feita em duplicata para cada gene e foram consideradas as médias dos resultados normalizados para cada animal.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Desempenho e sobrevivência das larvas

Os resultados das análises estatísticas evidenciaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) para os alimentos e esquemas alimentares testados. Os melhores resultados de crescimento das larvas em todos os tempos analisados foram no tratamento com alimento vivo por todo o período experimental, seguido dos tratamentos de transição do alimento vivo por dietas formuladas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios de peso úmido (mg) das larvas de pacu submetidas a diferentes alimentações.

Tratamentos	Dias após início da alimentação exógena				
	5	11	14	23	31
<b>A</b>	2,17±0,44 <sup>a</sup>	9,93±2,15 <sup>a</sup>	22,76±5,12 <sup>a</sup>	130,38±17,42 <sup>a</sup>	330,20±26,38 <sup>a</sup>
<b>ADC</b>	2,04±0,79 <sup>a</sup>	9,88±3,89 <sup>a</sup>	14,93±2,45 <sup>b</sup>	46,68±12,57 <sup>b</sup>	61,88±9,55 <sup>b</sup>
<b>ADE</b>	1,96±0,54 <sup>a</sup>	12,57±2,50 <sup>a</sup>	13,30±1,89 <sup>b</sup>	21,94±4,32 <sup>c</sup>	29,17±2,89 <sup>c</sup>
<b>DC</b>	0,46±0,09 <sup>b</sup>	0,56±0,08 <sup>b</sup>	0,49±0,11 <sup>c</sup>	-	-
<b>DE</b>	0,52±0,01 <sup>b</sup>	0,49±0,04 <sup>b</sup>	0,86±0,21 <sup>c</sup>	0,92±0,14 <sup>d</sup>	1,38±0,37 <sup>d</sup>
<b>J</b>	0,57±0,03 <sup>b</sup>	0,56±0,02 <sup>b</sup>	0,42±0,02 <sup>c</sup>	-	-

Médias seguidas de mesma letra (na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

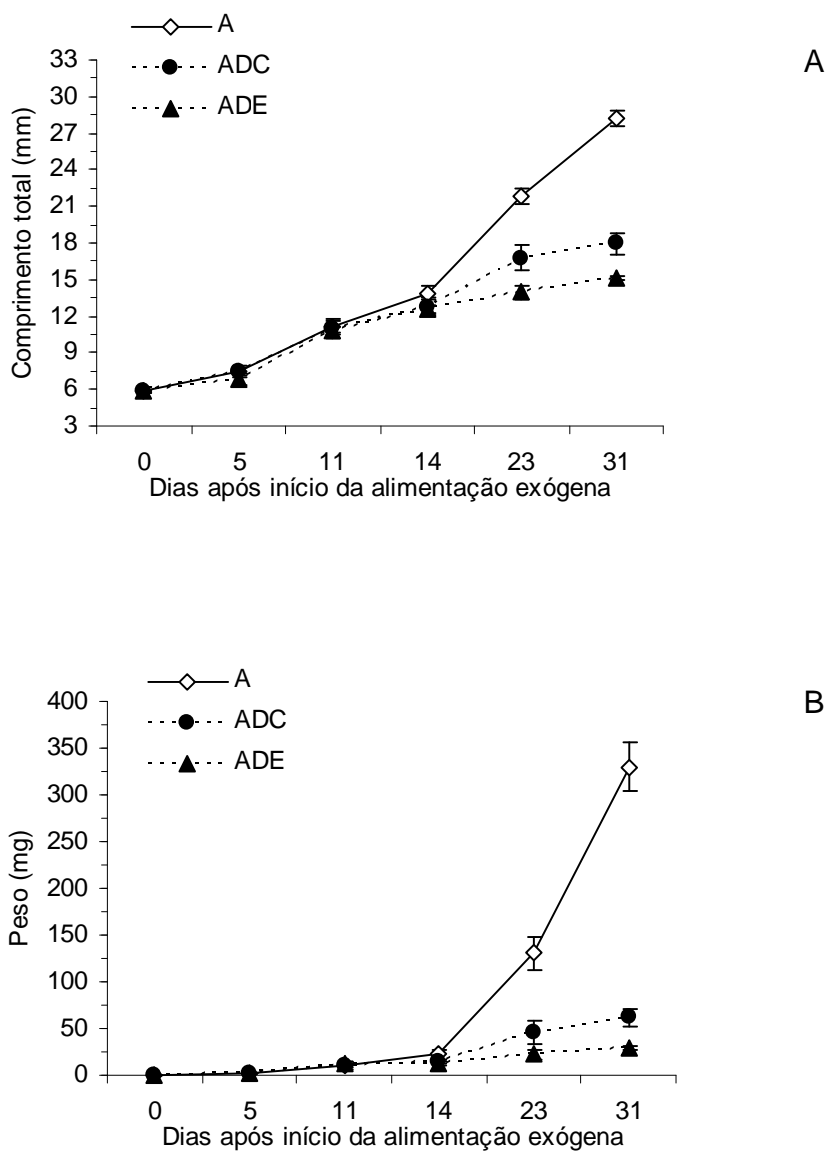
A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguido pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguido pela dieta experimental; DC: dieta comercial; DE: dieta experimental; J: jejum.

As médias de comprimento e peso mostraram que aos 11 dias de experimento os tratamentos A, ADC e ADE não diferenciaram, pois as larvas estavam recebendo as mesmas quantidades de alimento vivo. Na análise realizada aos 14 dias, primeiro período após a substituição total do alimento vivo, os tratamentos ADC e ADE diferiram do tratamento A em que as larvas continuaram recebendo apenas alimento vivo (Tabela 3 e Figura 2).

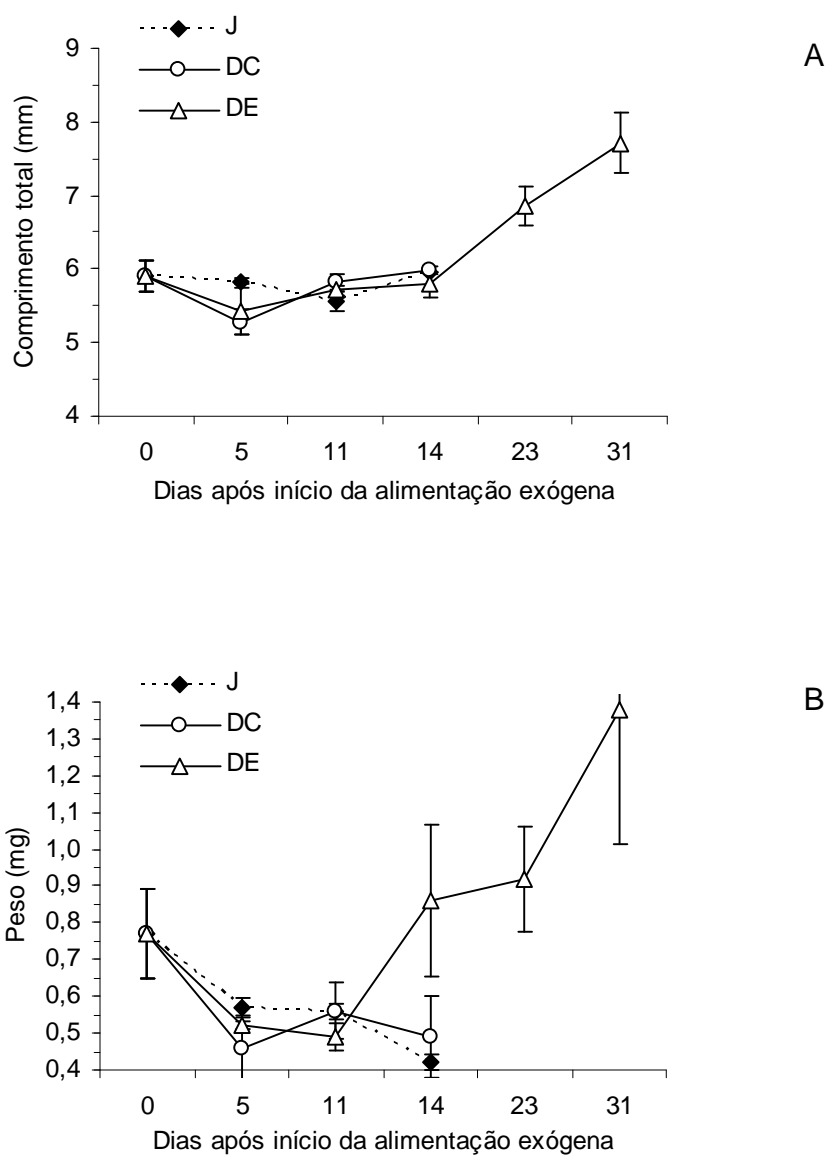
Enquanto o alimento vivo propiciou às larvas um crescimento gradual e contínuo ao longo do período de avaliação, as dietas formuladas, quando fornecida às larvas desde o início da alimentação exógena, condicionaram outro ritmo de crescimento. Os ganhos em comprimento e peso foram observados somente a partir do 14º dia para larvas que receberam dieta experimental (DE) por todo período (Tabela 3 e Figura 3).

Em relação às larvas que receberam dieta comercial (DC), mortalidade total ocorreu no 14º dia após início da alimentação exógena, assim como no grupo controle de larvas mantidas em jejum (J). Esse resultado sugere que as larvas que receberam apenas dieta comercial não ingeriram ou não tiveram capacidade de assimilá-la.

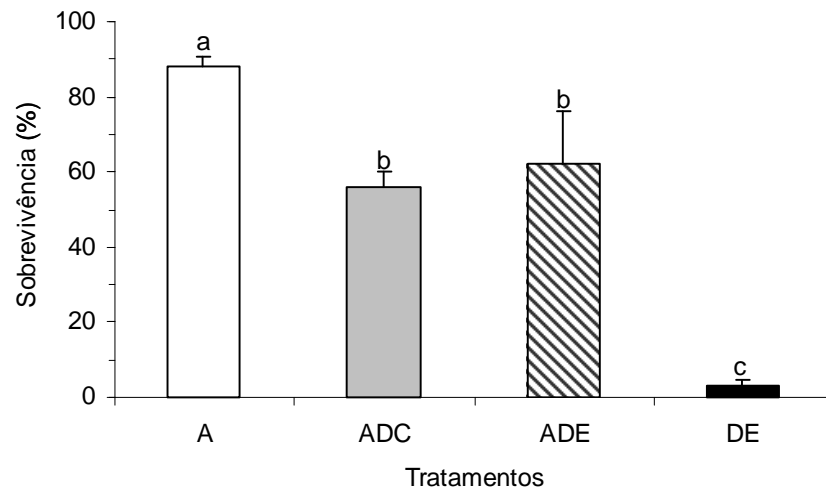
Os resultados de sobrevivência também foram influenciados pelos diferentes alimentos e esquemas alimentares (Figura 4). A maior média ( $p < 0,05$ ) foi obtida no grupo alimentado exclusivamente com alimento vivo (A),  $88 \pm 3\%$ , seguido pelos grupos que receberam substituição alimentar (ADC e ADE),  $56 \pm 5$  e  $62 \pm 14\%$ , respectivamente. A menor média ( $p < 0,05$ ) foi verificada no grupo alimentado com dieta experimental (DE) por todo período,  $3 \pm 1\%$ .



**Figura 2.** Valores médios de comprimento total (A) e peso úmido (B) das larvas de pacu submetidas a diferentes esquemas alimentares após início de alimentação exógena. A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguido pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguido pela dieta experimental.



**Figura 3.** Valores médios de comprimento total (A) e peso úmido (B) das larvas de pacu submetidas a diferentes esquemas alimentares após início de alimentação exógena. J: jejum; DC: dieta comercial; DE: dieta experimental.



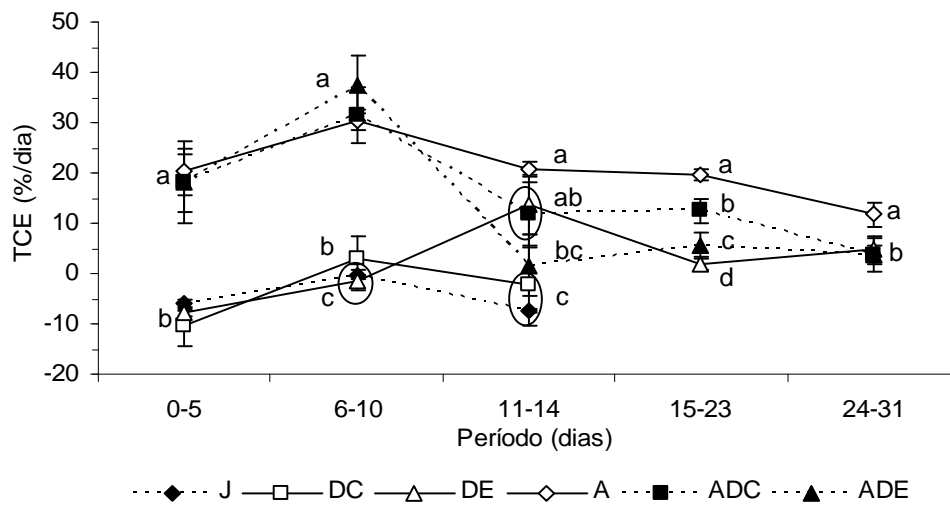
**Figura 4.** Taxas médias de sobrevivência das larvas de pacu submetidas a diferentes esquemas alimentares após início de alimentação exógena. A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental; DE: dieta experimental. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

O efeito dos alimentos e dos esquemas de alimentação ficou evidenciado pelas taxas de crescimento específico (Figura 5). Os valores médios não diferiram estatisticamente entre o grupo alimentado com alimento vivo (A) e aqueles submetidos à transição alimentar (ADC e ADE), 18 a 20%/dia e 30 a 37%/dia, para o primeiro e segundo período de alimentação, respectivamente. Todos estes grupos estavam recebendo as mesmas quantidades de alimento vivo.

Durante o período de alimentação mista, a taxa de crescimento específico observada (2%/dia), indicou prejuízo no crescimento das larvas submetidas à transição alimentar com dieta experimental (ADE), quando comparamos com as larvas dos tratamentos A e ADC (21%/dia e 12%/dia, respectivamente). Embora essas larvas tenham recuperado o crescimento ao longo do tempo, ao final do experimento apresentaram taxa de crescimento específico inferior (4%/dia) a das larvas que receberam alimento vivo (12%/dia).

Ao contrário do alimento vivo que propiciou altas taxas de crescimento específico, as dietas formuladas, fornecida às larvas desde o início, proporcionaram baixo crescimento destas. As taxas de crescimento específico para os tratamentos DC e DE, apresentaram valores negativos no primeiro período de alimentação, em função da perda de peso observada. No segundo período avaliado, o grupo alimentado com dieta comercial (DC) apresentou taxa de crescimento de 3%/dia. O grupo DE apresentou déficit no crescimento, assim como o grupo controle (J) mantido em jejum (Figura 5).

No terceiro período (11 a 14 dias), o grupo alimentado somente com dieta experimental (DE) apresentou a sua maior taxa de crescimento específico durante o experimento, cerca de 14%/dia, valor este que não diferiu estatisticamente dos tratamentos ADC e ADE, que estavam na fase de alimentação mista. Neste período, as larvas do tratamento DE passaram de 0,5 a 0,9mg de peso úmido (Tabela 3). No último período avaliado apenas o grupo que recebeu alimento vivo durante todo experimento (A) diferiu ( $p < 0,05$ ) dos demais (Figura 5).



**Figura 5.** Taxas médias de crescimento específico (TCE) das larvas de pacu submetidas a diferentes alimentações e esquemas alimentares após início de alimentação exógena. A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental; DC: dieta comercial; DE: dieta experimental; J: jejum. Médias seguidas de mesma letra (na vertical) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Morfologia e morfometria das fibras musculares

No início do experimento, após a depleção de vitelo, as larvas com quatro dias de vida e antes do início da alimentação exógena apresentavam dois tipos distintos de fibras musculares: um superficial localizado logo abaixo da pele, formado por pequenas fibras colunares em corte transversal e um tipo mais profundo, compondo a maioria da massa muscular, formado por fibras separadas por uma camada de tecido conjuntivo e com núcleos centrais (Figura 6A). Cerca de  $65 \pm 4$  e  $34 \pm 2\%$  das fibras apresentavam  $\leq 20$  e  $\leq 30\mu\text{m}$  de diâmetro, respectivamente. Apenas  $1 \pm 2\%$  das fibras musculares analisadas nesta fase estavam distribuídas na classe de diâmetro de  $\leq 10\mu\text{m}$ .

Aos cinco dias de avaliação após alimentação exógena, as larvas do tratamento A apresentaram aumento da massa muscular epiaxial e do número de miosseptos. No compartimento profundo, ocorreu grande quantidade de fibras musculares

arredondadas e, em sua maioria, com núcleos centrais (Figuras 6B e 6C). Nesse mesmo período, a análise morfométrica mostrou que o crescimento das larvas dos grupos DC e DE foi prejudicado (Figura 7A). Além disso, essas larvas apresentaram características morfológicas similares às larvas após a depleção do vitelo, assim como foi observado no grupo mantido em jejum.

Aos 11 dias, o alimento vivo proporcionou às larvas (A, ADC e ADE) espessamento da musculatura esquelética (Figura 8A). Os núcleos das fibras musculares do compartimento profundo apresentaram-se na periferia das células e observou-se ocorrência de miosseptos. No compartimento profundo, foram observadas muitas fibras de pequeno diâmetro ao redor de fibras musculares maiores, indicando intensa hiperplasia muscular em mosaico (Figura 8B). Nesse mesmo período foi verificada a maior taxa de crescimento específico para as larvas desses grupos (Figura 5).

Nessa fase, também foi evidenciada a presença de fibras musculares logo abaixo do compartimento superficial, na região da linha lateral, formando o compartimento intermediário (Figura 8C). Esse processo de crescimento muscular é conhecido por hiperplasia estratificada.

Durante os 11 primeiros dias, foi verificada alta frequência de fibras musculares nas classes de  $\leq 20$  e  $\leq 30$   $\mu\text{m}$  de diâmetro para as larvas alimentadas com alimento vivo. Aos 11 dias de experimento,  $86 \pm 7\%$  das fibras musculares apresentavam diâmetro menor que 30  $\mu\text{m}$ . Fibras musculares nessas classes de diâmetro indicam fibras muito jovens em intenso crescimento hiperplásico (Figura 7B).

As larvas que vinham recebendo dietas formuladas começaram a apresentar fibras musculares angulares e perda de massa muscular, assim como observado no tratamento J, com larvas mantidas em jejum (Figuras 9A e 9B). Nessas larvas, as classes de diâmetro das fibras musculares que apresentaram maior frequência, foram de  $\leq 10$  e  $\leq 20$   $\mu\text{m}$ , indicando diminuição do tamanho das fibras quando comparadas com os períodos anteriores de avaliação morfométrica, após a depleção do vitelo e aos cinco dias de alimentação exógena (Figuras 7A e 7B).

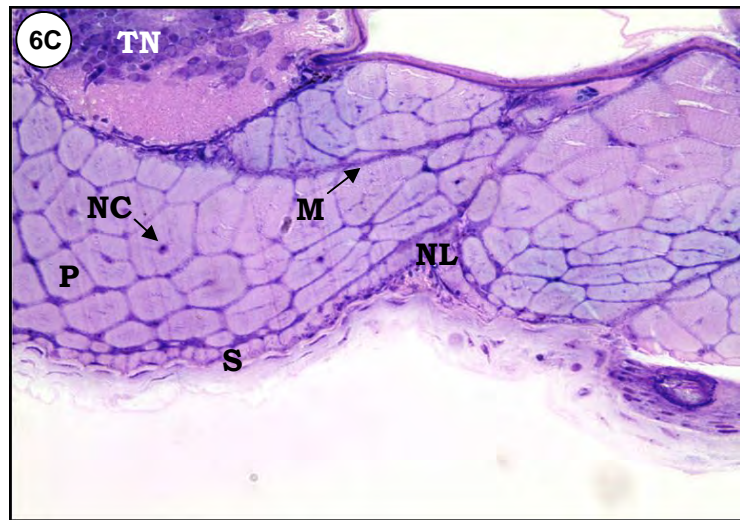
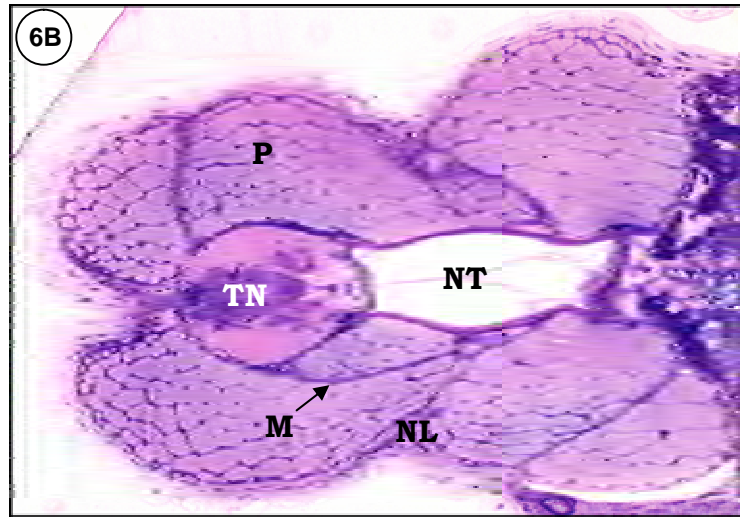
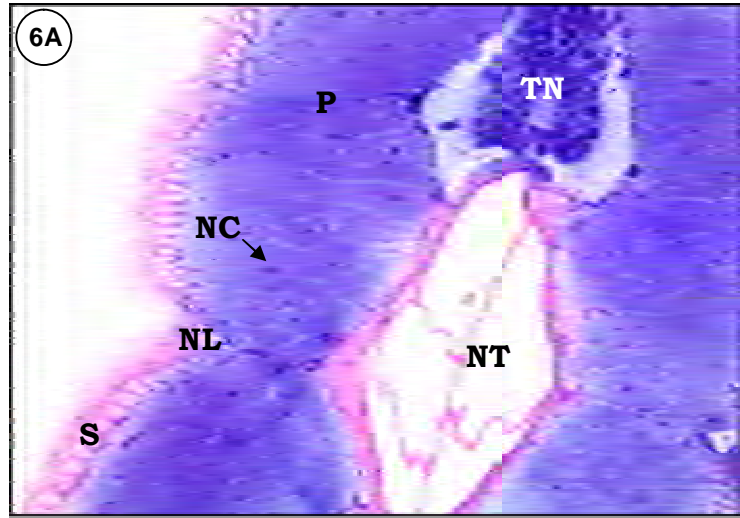
Aos 14 dias, no grupo mantido em jejum (J) e no alimentado desde o início com a dieta comercial (DC) observou-se mortalidade total das larvas. Neste momento as larvas apresentavam o mesmo padrão morfológico das fibras musculares, como formas angulares e núcleo central, além da diminuição de tamanho e perda de massa muscular (Figura 10A), resultados que confirmam a perda de peso observada na análise de desempenho zootécnico (Tabela 3 e Figura 3).

No tratamento DE, as larvas de pacu apresentaram aumento do número de fibras musculares. Nessas larvas,  $67 \pm 10\%$  de suas fibras estavam com diâmetro superior a  $10\mu\text{m}$ , enquanto que no período anterior de avaliação (aos 11 dias) as fibras nessa classe de diâmetro representavam apenas  $35 \pm 16\%$  (Figuras 7B e 7C).

Após o período de alimentação mista, ainda aos 14 dias, o crescimento hipertrófico foi evidenciado nos tratamentos A e ADC. Nesses dois tratamentos, aproximadamente  $14 \pm 10$  e  $22 \pm 7\%$  das fibras musculares, respectivamente, apresentavam diâmetro superior a  $40\mu\text{m}$ , valores estes que não diferiram estatisticamente (Figura 7C). Morfologicamente, foram observados os dois tipos de crescimento hiperplásico, estratificado e em mosaico (Figura 10B).

Aos 23 dias, as larvas dos tratamentos A, ADC e ADE, não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) quanto à distribuição das fibras musculares nas classes de diâmetro. A maioria delas estava distribuída nas classes de  $\leq 20$  e  $\leq 30 \mu\text{m}$  (Figura 11). Apesar da diferença de tamanho, observada nos resultados de desempenho (Tabela 3), o desenvolvimento muscular entre os exemplares desses grupos foi muito semelhante. Observaram-se fibras pequenas localizadas perifericamente a fibras maiores, caracterizando o crescimento hiperplásico em mosaico (Figura 12A).

Na região da linha lateral, ocorreu intensa proliferação celular formando o compartimento intermediário pelo processo de hiperplasia estratificada (Figura 12B). Nesse processo, comum às fases iniciais do desenvolvimento, ocorre o espessamento das camadas musculares (JOHNSTON e HALL, 2004).

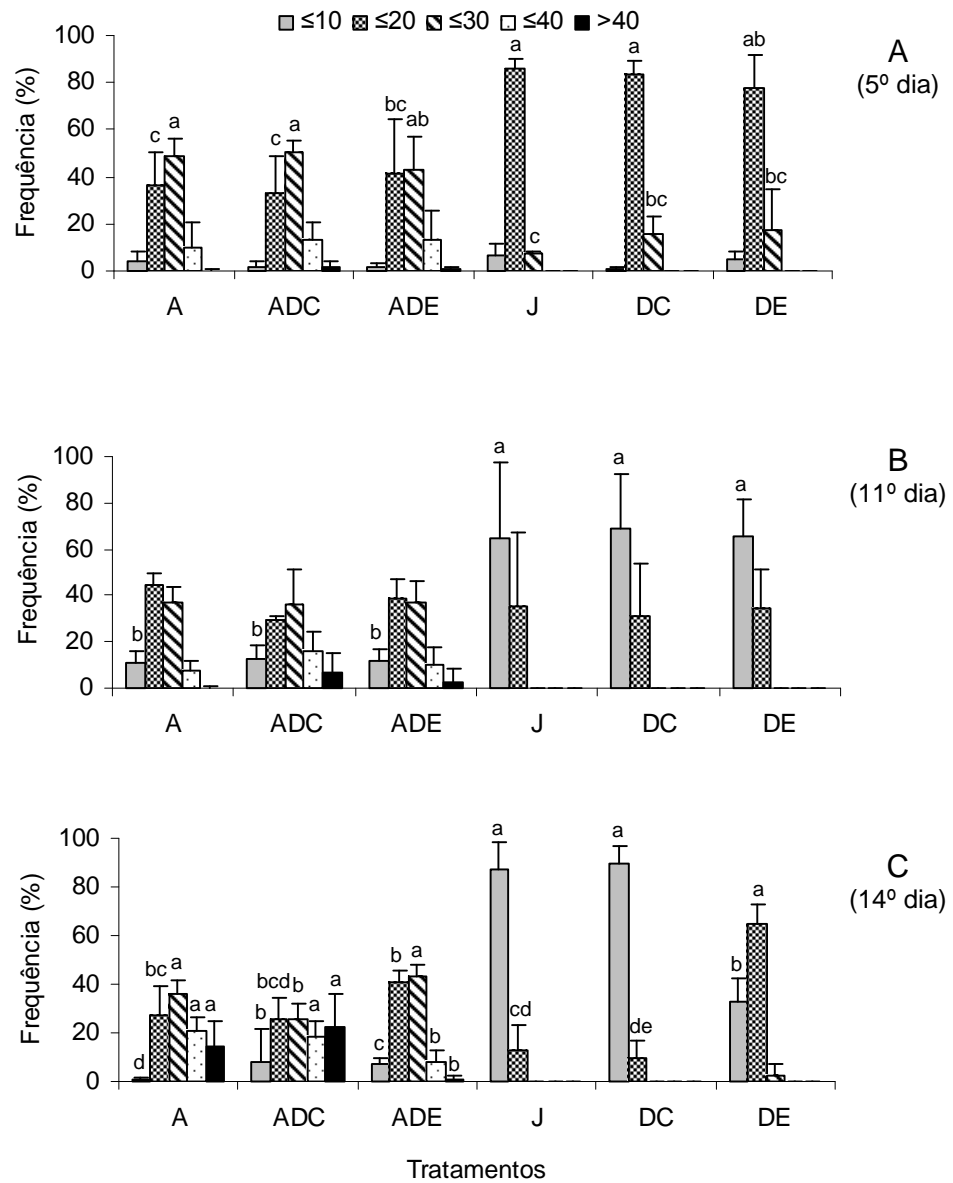


**Figura 6.** Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu em corte transversal.

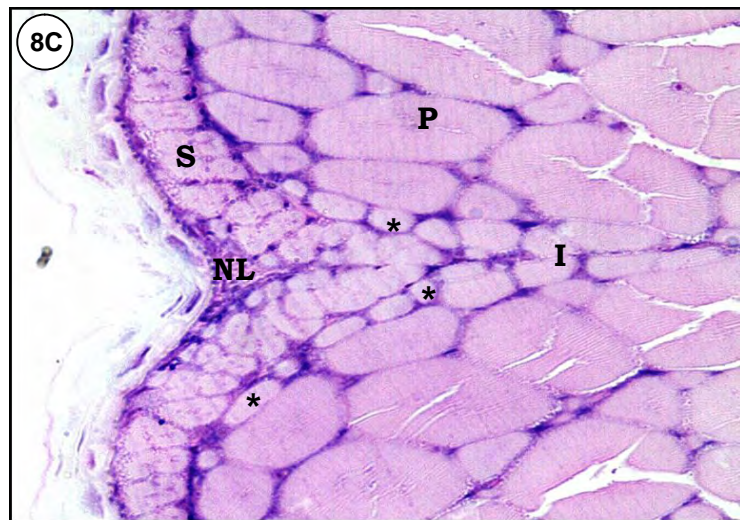
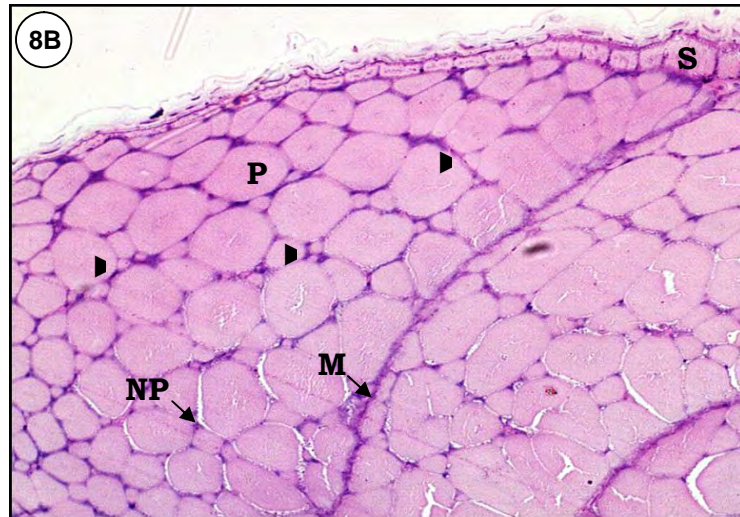
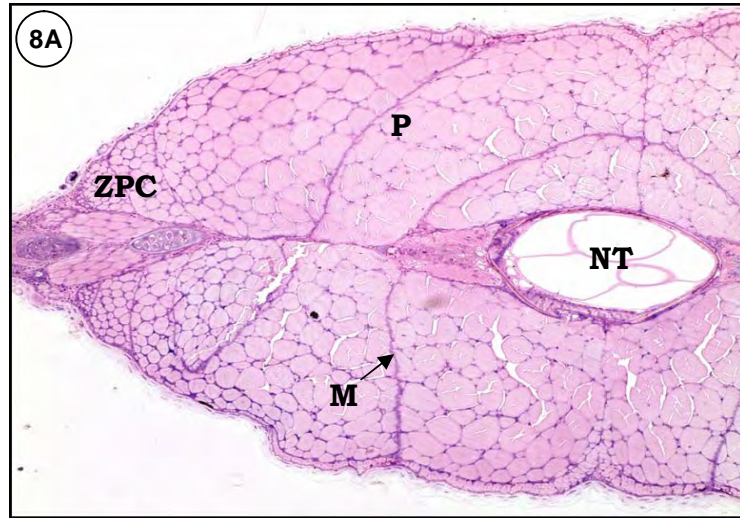
**Figura 6A.** Musculatura de larva de pacu aos quatro dias após a eclosão e no início da alimentação exógena evidenciando fibras musculares colunares superficiais (S), fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo central (NC), tecido nervoso (TN), notocorda (NT) e nervo da linha lateral (NL). 400x. At/FloB.

**Figura 6B.** Musculatura de larva de pacu (tratamento A) aos cinco dias de alimentação com alimento vivo (larvas com nove dias de vida), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P), mioossépto (M), tecido nervoso (TN), notocorda (NT) e nervo da linha lateral (NL). 200x. At/FloB.

**Figura 6C.** Musculatura de larva de pacu (tratamento A) aos cinco dias de alimentação com alimento vivo (larvas com nove dias de vida), evidenciando fibras musculares colunares superficiais (S), fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo central (NC), mioossépto (M), tecido nervoso (TN) e nervo da linha lateral (NL). 400x. At/FloB.



**Figura 7.** Distribuição das classes de diâmetro em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) das fibras musculares de larvas de pacu aos cinco dias (A), aos 11 dias (B) e aos 14 dias (C) de alimentação exógena. A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental; DC: dieta comercial; DE: dieta experimental; J: jejum. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

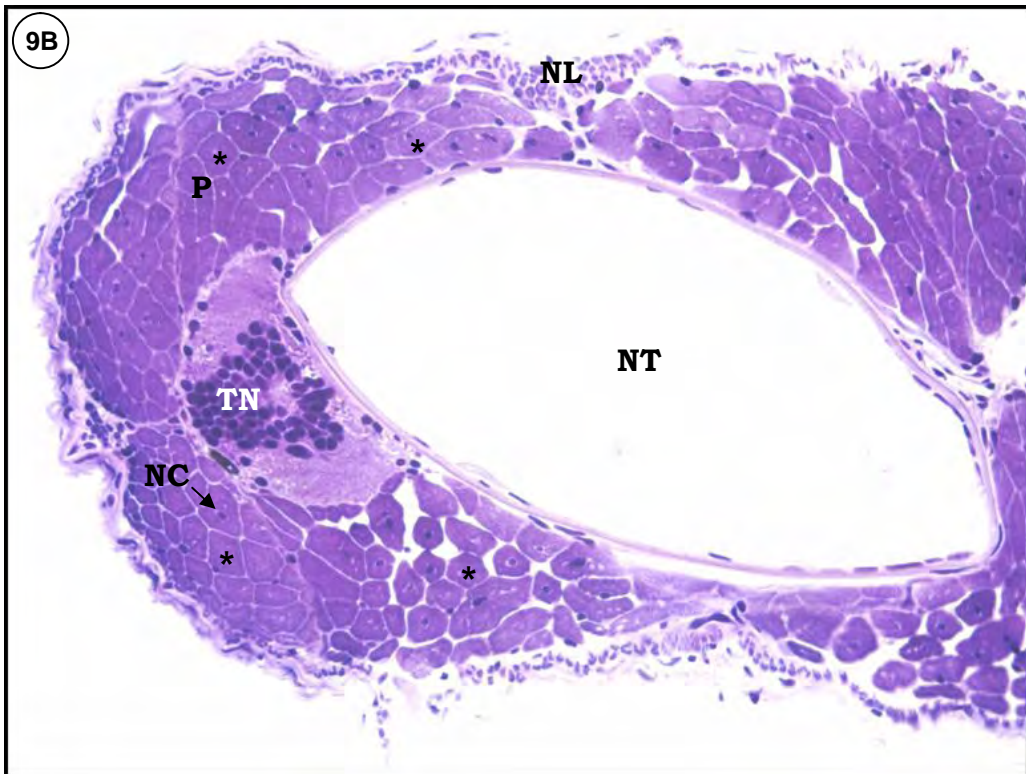
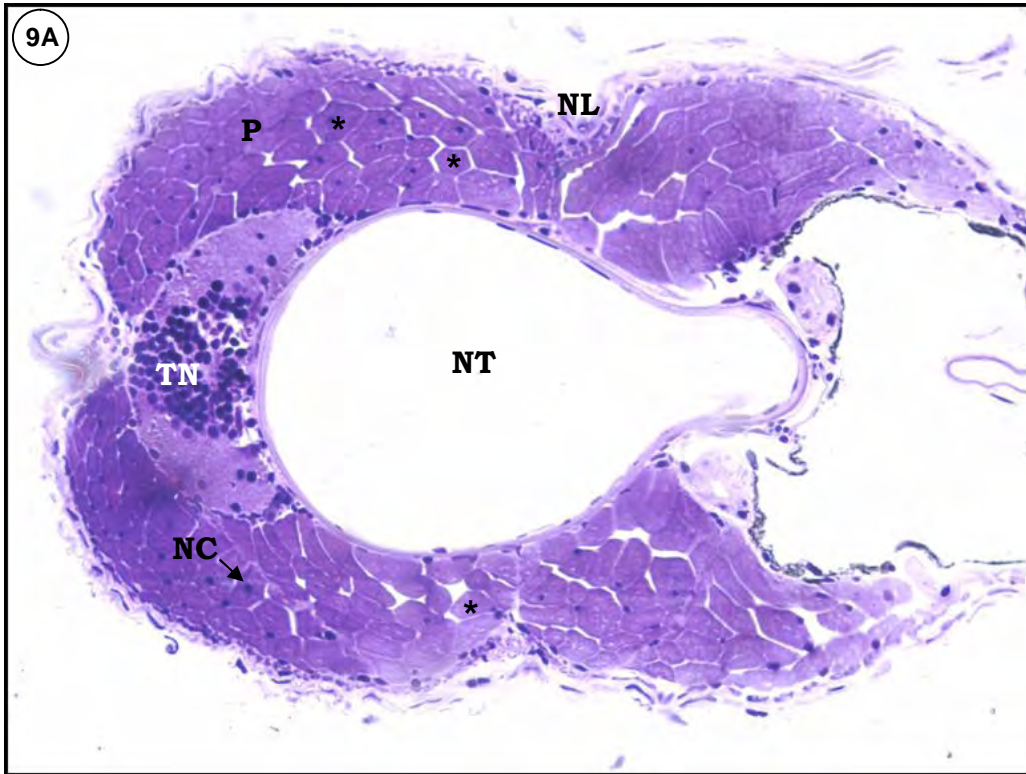


**Figura 8.** Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu (Tratamento A) em corte transversal aos 11 dias de alimentação com alimento vivo (larvas com 15 dias de vida e antes de iniciarem a transição alimentar).

**Figura 8A.** Musculatura de larva de pacu, evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com zona de intensa proliferação celular (ZPC) na região dorsal, mioossépto (M) e notocorda (NT). 100x. At/FloB.

**Figura 8B.** Musculatura de larva de pacu, evidenciando fibras musculares colunares superficiais (S), fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo periférico (NP) e mioossépto (M). (►) Notar mosaico de fibras de diferentes diâmetros no compartimento profundo. Observar fibras pequenas entre as maiores. 200x. At/FloB.

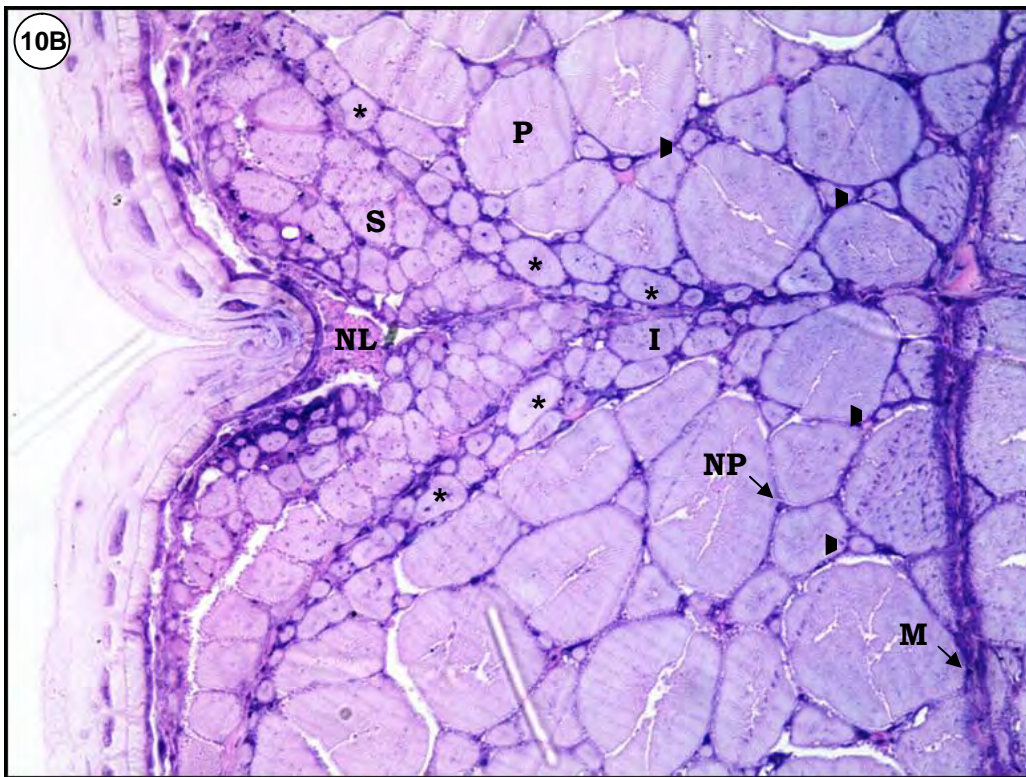
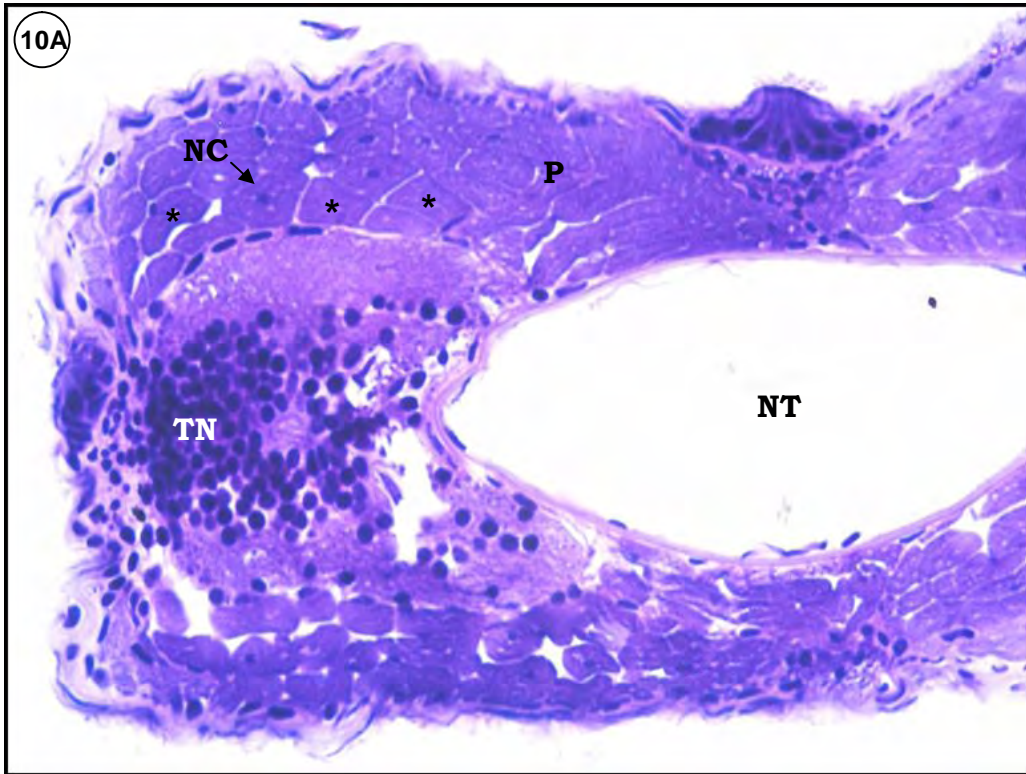
**Figura 8C.** Musculatura de larva de pacu, evidenciando fibras musculares do compartimento intermediário (I) entre as fibras musculares colunares superficiais (S) e as fibras musculares do compartimento profundo (P). (\*) Notar a presença de fibras musculares intermediárias na região da linha lateral (NL), caracterizando o processo de hiperplasia estratificada. 400x. At/FloB.



**Figura 9.** Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu (larvas com 15 dias de vida) em corte transversal.

**Figura 9A.** Musculatura de larva de pacu aos 11 dias de alimentação com dieta experimental (Tratamento DE), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo central (NC), tecido nervoso (TN), notocorda (NT) e nervo da linha lateral (NL). (\*) Notar no compartimento profundo fibras musculares angulares. 400x. At/FloB.

**Figura 9B.** Musculatura de larva de pacu mantida em jejum por 11 dias (Tratamento J), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo central (NC), tecido nervoso (TN), notocorda (NT) e nervo da linha lateral (NL). (\*) Notar no compartimento profundo fibras musculares angulares. 400x. At/FloB.

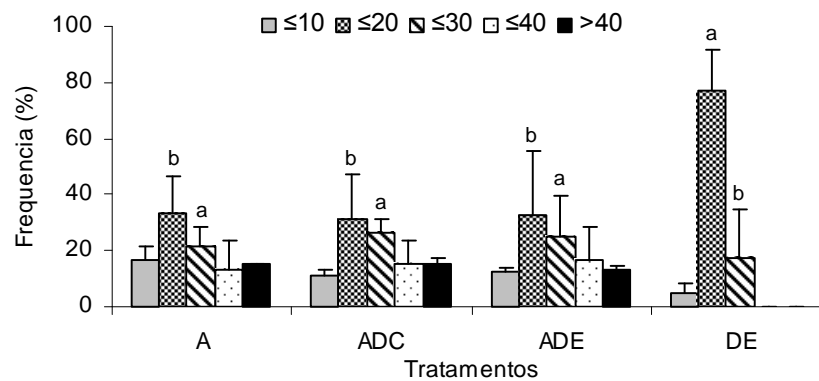


**Figura 10.** Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu (larvas com 18 dias de vida) em corte transversal.

**Figura 10A.** Musculatura de larva de pacu mantida em jejum por 14 dias (Tratamento J), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo central (NC), tecido nervoso (TN) e notocorda (NT). (\*) Notar no compartimento profundo fibras musculares angulares e perda de massa muscular. 400x. At/FloB.

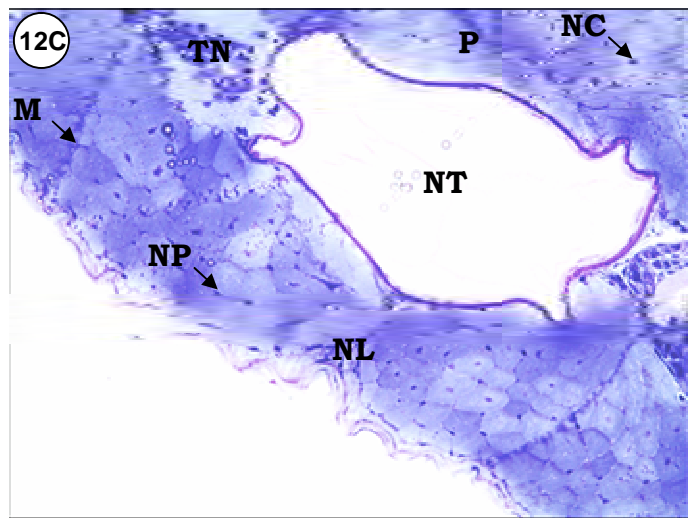
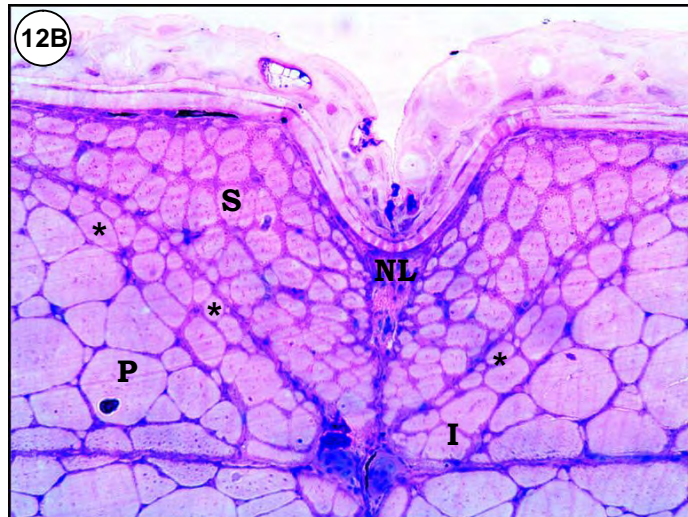
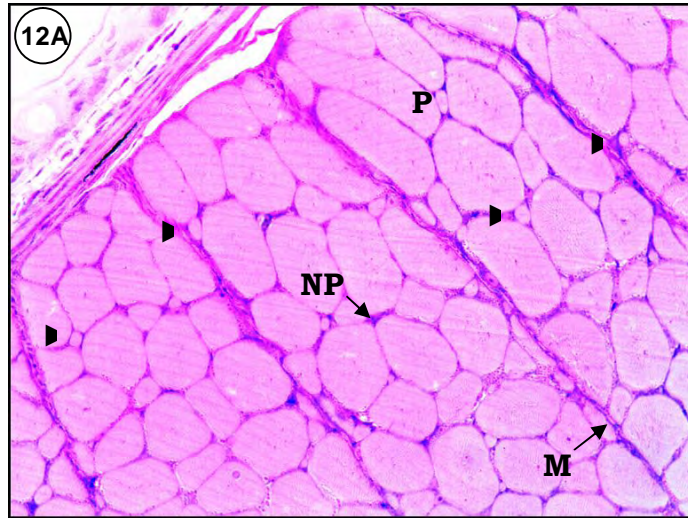
**Figura 10B.** Musculatura de larva de pacu após alimentação mista aos 14 dias de experimento (Tratamento ADC), evidenciando fibras musculares do compartimento intermediário (I) entre as fibras musculares colunares superficiais (S) e as fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo periférico (NP) e miosepto (M). (►) Notar mosaico de fibras de diferentes diâmetros no compartimento profundo e a (\*) presença de fibras musculares intermediárias na região da linha lateral (NL), caracterizando o processo de hiperplasia estratificada. 400x. At/FloB.

Ainda aos 23 dias, as larvas do tratamento com dieta experimental, embora apresentassem tamanho médio muito pequeno,  $0,9 \pm 0,1\text{mg}$ , continuavam apresentando crescimento (Tabela 3) e aumento do diâmetro das fibras. Cerca de  $94 \pm 3\%$  das fibras musculares tinham mais de  $10\mu\text{m}$  de diâmetro, com  $77 \pm 15\%$  delas incluídas na classe de  $\leq 20\mu\text{m}$  (Figura 11). Morfologicamente, essas larvas apresentavam fibras arredondadas, com a maioria dos núcleos centrais, embora alguns localizados periféricamente à fibra (Figura 12C).



**Figura 11.** Distribuição das classes de diâmetro em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) das fibras musculares de larvas de pacu aos 23 dias de alimentação exógena. A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental; DE: dieta experimental. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Na avaliação aos 31 dias, o desenvolvimento muscular dos exemplares de pacu dos tratamentos ADC e ADE foi similar. Ocorreu aumento de massa muscular, espessamento do compartimento intermediário e hiperplasia em mosaico (Figura 13A e Figura 13B). Fibras musculares com diâmetro superior a  $40\mu\text{m}$  apresentaram frequência de  $22 \pm 9$  e  $20 \pm 2\%$ , para os tratamentos ADC e ADE, respectivamente, caracterizando crescimento hipertrófico já bem representativo nesta fase (Figura 14).

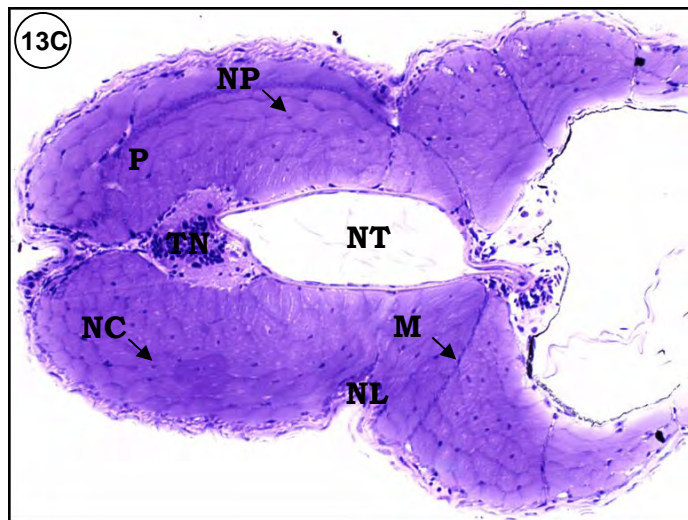
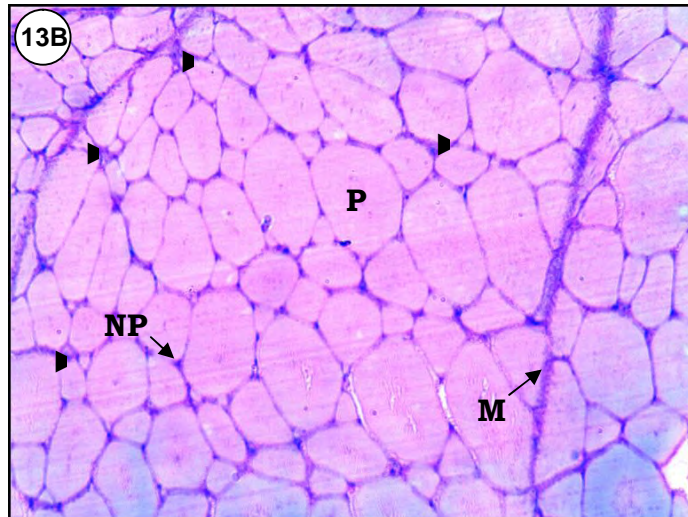
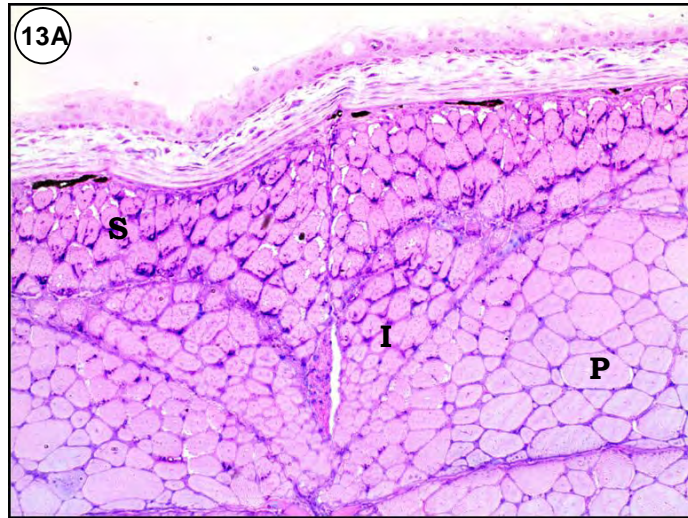


**Figura 12.** Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu aos 23 dias de alimentação exógena (larvas com 27 dias de vida) em corte transversal.

**Figura 12A.** Musculatura de larva de pacu (Tratamento A), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo periférico (NP) e miosepto (M). (►) Notar mosaico de fibras de diferentes diâmetros no compartimento profundo. Observar fibras pequenas entre as maiores. 400x. At/FloB.

**Figura 12B.** Musculatura de larva de pacu (Tratamento A), evidenciando fibras musculares do compartimento intermediário (I) entre as fibras musculares colunares superficiais (S) e as fibras musculares do compartimento profundo (P). (\*) Notar a presença de fibras musculares intermediárias na região da linha lateral (NL), caracterizando o processo de hiperplasia estratificada. 400x. At/FloB.

**Figura 12C.** Musculatura de larva de pacu aos 23 dias de alimentação com dieta experimental (Tratamento DE), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo central (NC), tecido nervoso (TN), miosepto (M) notocorda (NT) e nervo da linha lateral (NL). Notar no compartimento profundo presença de algumas fibras musculares com núcleos periféricos (NP). 400x. At/FloB.



**Figura 13.** Fotomicrografias da musculatura esquelética de larvas de pacu aos 31 dias de alimentação exógena (larvas com 35 dias de vida) em corte transversal.

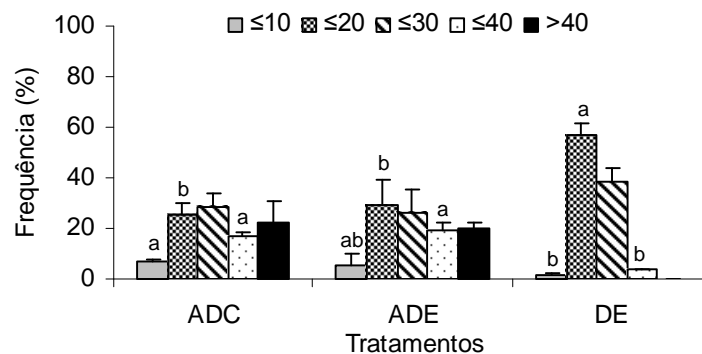
**Figura 13A.** Musculatura de larva de pacu (Tratamento ADE), evidenciando fibras musculares do compartimento intermediário (I) entre as fibras musculares colunares superficiais (S) e as fibras musculares do compartimento profundo (P). Notar espessamento dos compartimentos superficial e intermediário. 200x. At/FloB.

**Figura 13B.** Musculatura de larva de pacu (Tratamento ADE), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo periférico (NP) e miosepto (M). (►) Notar mosaico de fibras de diferentes diâmetros no compartimento profundo. Observar fibras pequenas entre as maiores. 400x. At/FloB.

**Figura 13C.** Musculatura de larva de pacu aos 31 dias de alimentação com dieta experimental (Tratamento DE), evidenciando fibras musculares do compartimento profundo (P) com núcleo central (NC), tecido nervoso (TN), miosepto (M), notocorda (NT) e nervo da linha lateral (NL). Notar no compartimento profundo presença de algumas fibras musculares com núcleos periféricos (NP) e aumento de massa muscular. 200x. At/FloB.

Nesse mesmo período, as larvas alimentadas exclusivamente com dieta experimental (DE) continuaram apresentando crescimento e aumento de massa muscular. As fibras musculares observadas possuíam formas arredondadas e algumas delas núcleos localizados periféricamente (Tabela 3 e Figura 13C). Aproximadamente  $42 \pm 6\%$  das fibras musculares apresentaram diâmetro superior a  $30\mu\text{m}$  (Figura 14).

Aos 31 dias não foi possível realizar as análises morfológica e morfométrica com as larvas que vinham recebendo alimento vivo. Os exemplares foram fixados inteiros, o que impossibilitou a adequada infiltração do fixador e preservação do material.



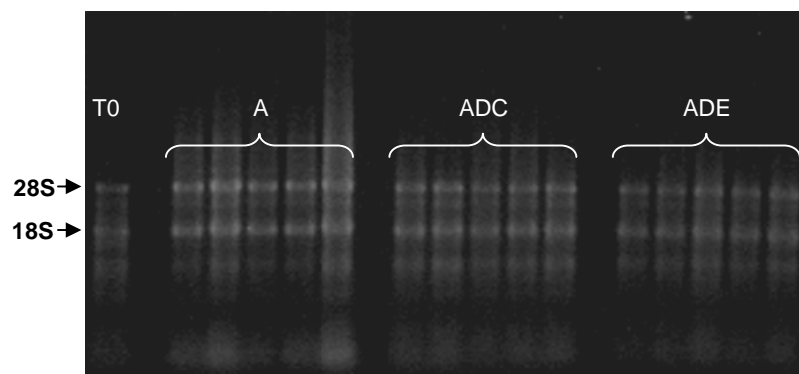
**Figura 14.** Distribuição das classes de diâmetro em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) das fibras musculares de larvas de pacu aos 31 dias de alimentação exógena. ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental; DE: dieta experimental. Comparação feita entre os tratamentos em cada classe separadamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0, 05$ ).

### 5.3 Níveis de expressão do RNAm da MyoD e Miogenina por RT-PCR semiquantitativa

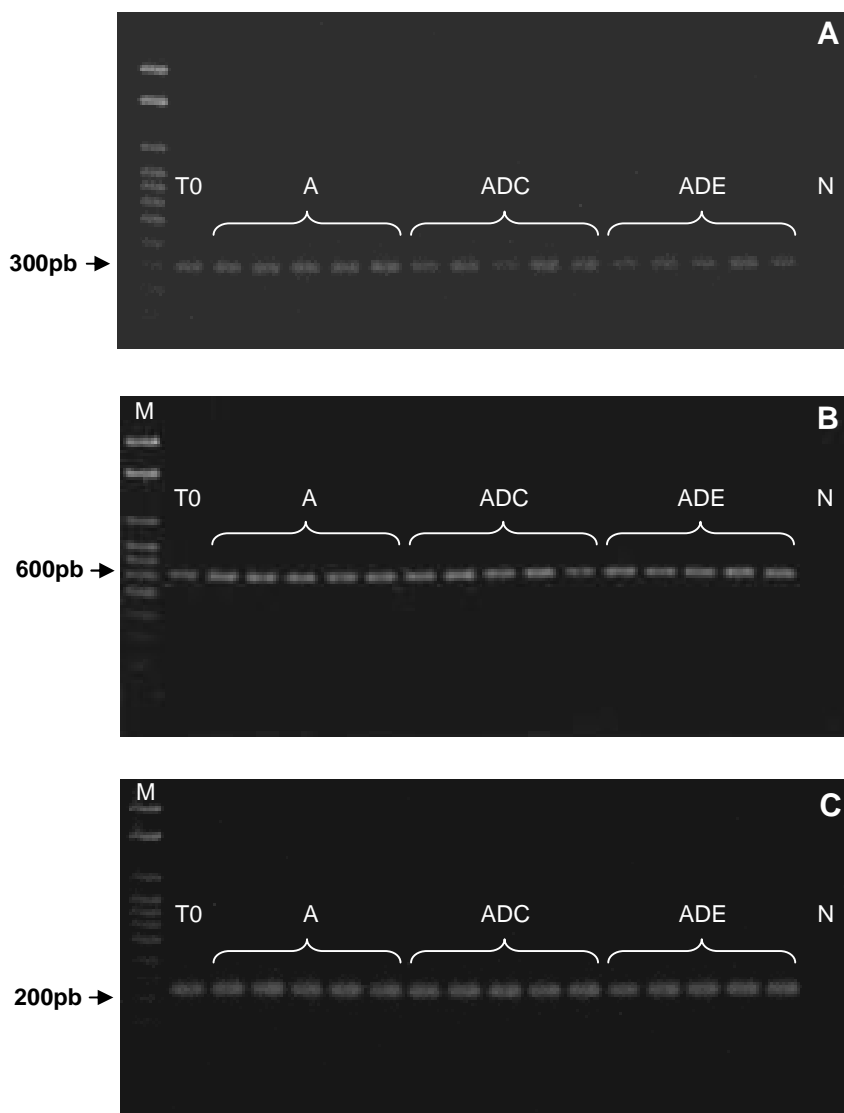
A quantificação do RNA por espectrofotometria, a 260nm forneceu uma estimativa da qualidade da extração. A pureza do RNA foi garantida pela obtenção de razão 260/280nm maior que 1,65. A integridade do RNA extraído foi constatada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S (Figura 15).

O produto de amplificação do cDNA para os genes da MyoD e Miogenina resultou em fragmentos com aproximadamente 300 e 600pb, respectivamente (Figuras 16A e 16B) e para o produto de amplificação do controle interno RNAr 18S, um fragmento com cerca de 250pb, conforme esperado (Figura 16C).

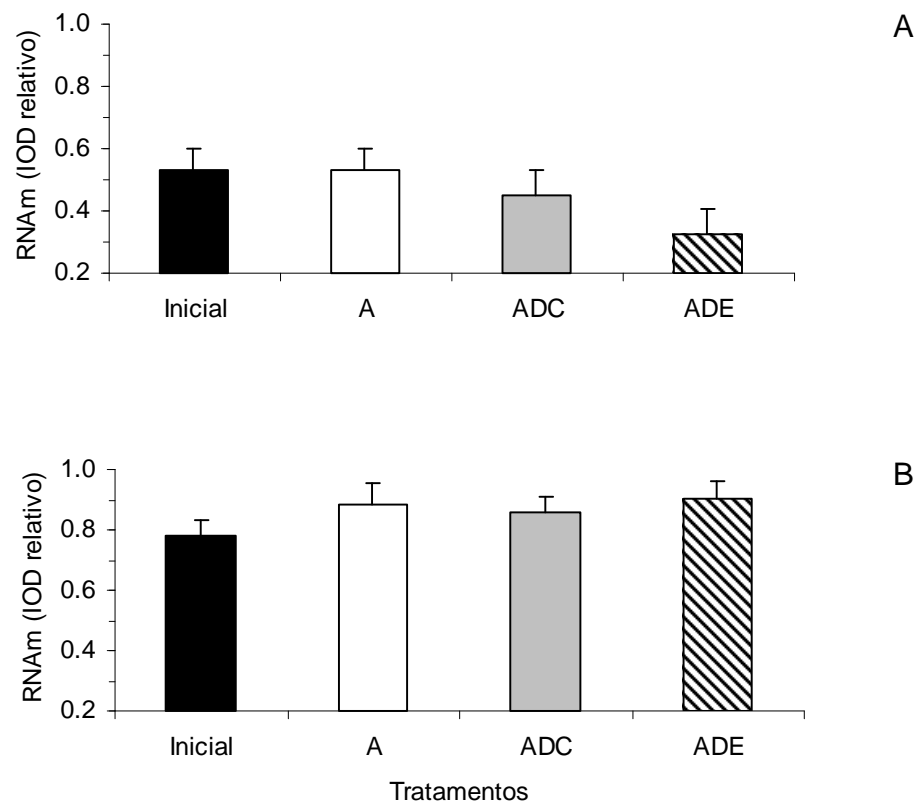
A expressão dos genes da MyoD e da Miogenina não diferiram ( $p > 0,05$ ) nos tratamentos analisados. O conteúdo médio estimado para estes genes, por RT-PCR, entre os tratamentos foi de  $0,46 \pm 0,10$  e  $0,86 \pm 0,06$  IOD relativo, respectivamente, observando-se maior expressão gênica da Miogenina (Figuras 17A e 17B).



**Figura 15.** Eletroferograma demonstrando a qualidade do RNA extraído das amostras musculares de larvas de pacu após a depleção do vitelo (T0) e aos 31 dias de alimentação exógena, constatada pela presença das bandas de RNAr 28S e 18S. A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental.



**Figura 16.** Eletroferograma do produto de amplificação do gene parcial MyoD (A), Miogenina (B) e Gene Constitutivo 18S (C) em fibras musculares de larvas de pacu após a depleção do vitelo (T0) e aos 31 dias de alimentação exógena. M: marcador molecular de 100pb; A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental; N: controle negativo.



**Figura 17.** Conteúdo estimado de MyoD (A) e Miogenina (B) por RT-PCR na musculatura esquelética de larvas de pacu. A quantificação do fragmento de PCR foi obtido por análise densitométrica do produto como Densidade Ótica Integrada (IOD). Inicial: larvas aos quatro dias após a eclosão, antes de iniciarem alimentação e demais tratamentos aos 31 dias. A: alimento vivo; ADC: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta comercial; ADE: alimento vivo por 11 dias, três dias de alimentação mista, seguida pela dieta experimental.

## 6 DISCUSSÃO

O uso de dietas inertes como alimento inicial para larvas de pacu, em substituição total ao alimento vivo, não foi um manejo alimentar eficiente em termos de sobrevivência e crescimento. O grupo de larvas alimentado com dieta comercial (DC) apresentou mortalidade total ao 18° dia de vida simultaneamente ao grupo controle de larvas em jejum (J). Resultados similares foram relatados por TESSER et al. (2005a), que verificaram ocorrência de mortalidade total ao 16° dia de vida em larvas de *P. mesopotamicus* alimentadas exclusivamente com microdietas.

Estes dois grupos de larvas (DC e J) apresentaram fibras musculares angulares e perda de massa muscular nas análises realizadas aos 11 e 14 dias de alimentação exógena. A frequência de fibras com diâmetro inferior a 10 µm também aumentou entre o primeiro e último período de avaliação, indicando diminuição do tamanho das fibras. Nos estágios iniciais de desenvolvimento há um aumento significativo do número de fibras musculares (ASSIS et al., 2004) determinado, entre outros fatores, pela disponibilidade de alimento (WEST-EBERHARD, 2003). Mas, em condições de severa restrição alimentar pode ocorrer atrofia de fibras musculares brancas (JOHNSTON, 1981) e redução das taxas de crescimento e, obviamente, do crescimento muscular (WEATHERLEY e GILL, 1987).

O grupo de larvas alimentado exclusivamente com dieta experimental (DE) apresentou médias de peso úmido e sobrevivência na ordem de 1,38mg e 3%, respectivamente. Esses valores foram muito inferiores às médias de peso e sobrevivência encontradas nos grupos que receberam alimento vivo, pelo menos no início da alimentação exógena. Estudos realizados por JOMORI et al. (2008) com larvas de *P. mesopotamicus* tinham revelado a possibilidade de substituição total do alimento vivo embora com resultados de crescimento e sobrevivência (cerca de 11%) inferiores a outros regimes alimentares testados. Além disso, observou-se atraso no desenvolvimento do trato digestório das larvas. Vários fatores contribuem para o pequeno sucesso da alimentação de larvas de peixes com dietas formuladas. A capacidade digestiva das larvas é o principal fator limitante para a utilização de

microdietas nos primeiros estágios do desenvolvimento larval (DABROWSKI, 1984). Certas espécies apresentam limitações digestivas, como aparelho digestório indiferenciado e ausência de algumas enzimas digestivas (MOYANO et al., 1996). Os alimentos vivos (rotíferos e microcrustáceos, como artêmia) podem facilitar o desenvolvimento do trato digestório, além de apresentar perfil protéico mais adequado às larvas de peixes (KOLKOVSKI, 2001; LANGDON, 2003). As larvas alimentadas exclusivamente com dieta experimental evidenciaram expressivo atraso no desenvolvimento e celularidade muscular, além de atraso no desenvolvimento ontogenético do tecido muscular em relação às demais larvas. Morfologicamente, essas larvas apresentaram fibras arredondadas, com a maioria dos núcleos centrais. Fibras musculares com estas características são indicativas de fibras muito jovens, como se observa em larvas recém eclodidas (ASSIS et al., 2004).

A constituição das microdietas também está relacionada com a baixa capacidade que esses alimentos apresentam em promover taxas de sobrevivência e crescimento adequadas. Algumas proteínas utilizadas na formulação possuem atividade inibitória de proteases digestivas (ALARCÓN et al., 1999), assim como fatores antinutricionais. A baixa umidade de muitos tipos de dietas (60 a 90% de matéria seca contra 10 a 15% apresentada pelo alimento vivo) pode dificultar a digestão dessas partículas pelas larvas (LANGDON, 2003). Além disso, a baixa aceitabilidade das dietas formuladas contribui para o insucesso da utilização desse tipo de alimento. A falta de estímulo visual (TESSER et al., 2006) e a natureza das partículas, como textura, sabor, cor, formulação e tamanho afetam a aceitabilidade, a digestibilidade e a lixiviação dos nutrientes (ÖNAL e LANGDON, 2000).

Nesse estudo evidenciou-se que as larvas de pacu não estão hábeis para aproveitar com eficiência dietas formuladas quando iniciam a alimentação exógena, comprovando o que já foi observado para essa e muitas outras espécies (PORTELLA e DABROWSKI, 2008). A utilização exclusiva de dieta formulada em substituição ao alimento vivo, não constitui uma prática viável para as larvas de pacu, pois não garante crescimento satisfatório e atrasam o desenvolvimento larval (JOMORI et al., 2008).

O tempo de uso do alimento vivo influenciou a sobrevivência e o crescimento das larvas. A maior média de sobrevivência foi obtida com larvas alimentadas exclusivamente com alimento vivo (A), 88%, seguida pelas larvas que passaram pela substituição alimentar aos 14 dias de alimentação exógena com as dietas comercial (ADC) e experimental (ADE), 56 e 62%, respectivamente. Larvas em diferentes estágios do desenvolvimento e que passam por substituição total de artêmia por microdieta apresentaram taxas de sobrevivência que variam de 11 a 76% (JOMORI, 1999). Essa variação é atribuída à eficiência da dieta e idade em que as larvas são submetidas à transição do alimento vivo para o formulado. Larvas de *P. mesopotamicus* com cerca de 10mg de peso úmido foram capazes de aproveitar com eficiência uma dieta formulada comercial específica, apresentando crescimento e sobrevivência satisfatórios (JOMORI et al., 2008).

Durante o período de alimentação mista, as larvas dos tratamentos ADC e ADE manifestaram crescimento inferior em relação ao grupo A, de larvas que receberam exclusivamente alimento vivo. As taxas médias de crescimento específico foram de 21, 12 e 2% ao dia, respectivamente para os grupos A, ADC e ADE. A interrupção momentânea do crescimento, durante o período de transição alimentar, também foi observada por HUNG et al. (2002) com larvas de *Pangasius bocourti* e por TESSER et al. (2006) e JOMORI et al. (2008) com larvas de *P. mesopotamicus*.

Os melhores resultados de crescimento aos 31 dias foram observados nas larvas que receberam alimento vivo (A) por todo período experimental (330mg), seguido pelas larvas que passaram pela substituição do alimento vivo por dietas formuladas (62 e 29mg, respectivamente para os tratamentos ADC e ADE). A eficiência da dieta comercial parece ter sido a principal responsável para o grupo ADC expressar sua habilidade para o aproveitamento desse alimento e potencial para o crescimento.

Resultados insatisfatórios quanto ao uso de dietas formuladas na larvicultura de peixes, podem ser atribuídos mais às características da dieta do que à ineficiência das larvas em digeri-las (JOMORI et al., 2008, MUKAI-CORRÊA, 2008). MUKAI-CORRÊA (2008) avaliou a substituição de artêmia por dietas microparticuladas em larvas de *P. mesopotamicus* e observou que o baixo crescimento observado nas larvas pode ter sido

comprometido em razão da limitação ou falta de nutrientes essenciais em relação aos náuplios de artêmia. Outra possibilidade seria a quebra e digestão incompleta das dietas formuladas pela larva, devido à ausência de sistema digestório diferenciado (PORTELLA e DABROWSKI, 2008). Dietas inadequadas podem atrasar o desenvolvimento do trato digestório e a organização do pâncreas e do fígado (JOMORI, 2005).

Regimes alimentares adequados e eficiência das microdietas na alimentação inicial são decisivos para as larvas de peixes expressarem seu potencial de crescimento. A composição da dieta no período de transição da alimentação endógena para a exógena reflete no aumento da massa muscular durante o desenvolvimento larval, além de afetar a sobrevivência, influenciar o crescimento somático e levar a alterações nas características morfofisiológicas do tecido muscular (KOUMANS e AKSTER, 1995). Isto é relevante, pois o início do crescimento por hiperplasia estratificada ocorre alguns dias após a eclosão e segue após a transição para a alimentação exógena (ASSIS et al., 2004). Os efeitos de dietas subótimas no desenvolvimento de larvas de peixes afetam o crescimento somático e sobrevivência, além de reduzirem o crescimento hiperplásico, como demonstrado por GALLOWAY et al. (1999) em larvas de carpa.

A morfologia da musculatura esquelética dos exemplares de pacu não apresentou diferença entre os grupos A, ADC e ADE em todos os períodos avaliados e foi semelhante à morfologia encontrada nas demais espécies de peixes (FERNANDEZ et al., 2000; AGUIAR et al., 2005). A análise morfológica possibilitou distinguir três compartimentos musculares distintos: o compartimento superficial formado por fibras vermelhas, abaixo da derme, mais espesso na região do nervo da linha lateral e de aspecto triangular; o compartimento profundo, formado por fibras musculares brancas que ocupam a maior parte da massa muscular e o compartimento intermediário, formado por fibras musculares intermediárias, observado a partir do 11º dia de alimentação exógena. O compartimento de fibras intermediárias localiza-se adjacente às zonas germinais de proliferação celular. Essas zonas germinais constituem a principal fonte de novas fibras e são responsáveis pelo espessamento das camadas

musculares nas fases iniciais do desenvolvimento (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001). Nesse tipo de crescimento, conhecido como hiperplasia estratificada, novas fibras musculares são formadas a partir das zonas de proliferação celular (JOHNSTON, 1999).

A partir 23° dia, no compartimento profundo, as fibras apresentaram um padrão em mosaico, com diferentes diâmetros, como observado em outras espécies (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001). Nas espécies de peixes de grande porte, a hiperplasia estratificada é seguida pela hiperplasia em mosaico, que resulta no aumento do número de fibras musculares, principalmente nas fases larval e juvenil (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001). Durante a hiperplasia em mosaico, fibras pequenas (diâmetro menor que 25µm) são observadas entre fibras maiores, formando um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação, melhor observado na musculatura branca (JOHNSTON, 1999).

As diferenças de ganho em peso e comprimento entre as larvas de pacu dos grupos A, ADC e ADE se refletiram no espessamento da musculatura nos tratamentos analisados. Entretanto, a morfometria da musculatura miotomal mostrou que não ocorreu diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre o diâmetro das fibras musculares brancas nos períodos avaliados. A presença de grande número de fibras com diâmetros menores que 20µm demonstrou que neste período do crescimento o recrutamento de novas fibras musculares ocorreu de forma mais efetiva e contribuiu para o aumento da massa muscular e crescimento dos animais. Fibras musculares com diâmetros inferiores a 20µm são predominantes em peixes juvenis e indicam intensa hiperplasia, enquanto que alta frequência de fibras com diâmetro superior a 50µm indicam hipertrofia e são observadas em peixes adultos (DAL PAI et al., 2000; ALMEIDA et al., 2008).

Os mecanismos de crescimento das fibras musculares nos peixes de grande porte ocorrem por hiperplasia e hipertrofia por um longo período (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001). ALMEIDA et al. (2008), estudando os mecanismos de crescimento muscular em *P. mesopotamicus* observou que tanto na fase juvenil quanto na adulta ocorre crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico. Em espécies de pequeno porte

o recrutamento de novas fibras musculares cessa nas fases iniciais do desenvolvimento (WEATHERLEY e GILL, 1987).

Como o músculo é um tecido pós-mitótico, a hiperplasia e a hipertrofia das fibras envolvem a ativação e proliferação de mioblastos indiferenciados ou CMPs (JOHNSTON, 2006). Análises ultraestruturais na musculatura do pacu mostraram que os núcleos das CMPs estão no tecido conjuntivo, entre as fibras diferenciadas (ASSIS et al., 2004). De acordo com JOHNSTON (1999), estas células podem ser indiferenciadas ou persistirem em mioblastos envolvidos no crescimento muscular. Se envolvidas no crescimento muscular, essas células podem proliferar e seus núcleos fundirem em fibras musculares existentes para síntese de miofibrilas ou podem formar novas fibras na musculatura (JOHNSTON, 2006).

As análises morfométrica e morfológica dos fragmentos musculares das larvas dos grupos A, ADC e ADE indicaram que não ocorreu diferença entre esses tratamentos e que o crescimento muscular, nos períodos de avaliação, ocorreu predominantemente por hiperplasia estratificada e em mosaico. A ocorrência de hipertrofia e hiperplasia na musculatura do pacu contribuiu para o aumento significativo do peso e comprimento entre os exemplares de pacu. Da mesma forma que a substituição do alimento vivo por dietas formuladas não comprometeu o potencial para o crescimento muscular nesses grupos de larvas, não ocorreu diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para os resultados referentes à expressão da MyoD e Miogenina, no músculo esquelético dos exemplares de pacu.

Durante o crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico, a proliferação e a diferenciação das CMPs nas fibras musculares maduras ocorre sob o controle dos MRFs, pertencentes à família MyoD, da qual fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5, MRF4 e MEF2. O gatilho que faz um mioblasto se diferenciar é determinado por sinais antagonistas para a proliferação e diferenciação que precisam ser melhores compreendidos (JOHNSTON, 2006). As proteínas membros da família MyoD de fatores de crescimento são expressas especificamente em mioblastos e em células da musculatura esquelética e exercem papel central na determinação do músculo esquelético (TAN e DU, 2002).

A expressão dos MRFs tem sido avaliada em diferentes condições experimentais. Alguns estudos demonstraram que a temperatura é um importante fator na determinação da taxa de miogênese e expressão gênica dos MRFs (ASSIS et al., 2004; COLE et al., 2004; GALLOWAY et al., 2006; JOHNSTON, 2006). GALLOWAY et al. (2006) estudando diferentes temperaturas de incubação de embriões de *Hippoglossus hippoglossus* verificaram que a expressão da MyoD e Miogenina aumenta com o aumento da temperatura. ASSIS et al. (2004) observaram que embriões de *P. mesopotamicus* originam peixes maiores quando incubados a temperaturas mais elevadas (29°C), devido a mais alta taxa de miogênese. Outras variáveis como exercício (SANGER, 1992) e dieta (FAUCONNEAU e PABOEUF, 2001; BARRETO, 2006) também podem influenciar a expressão dos MRFs em peixes. Nesta linha de investigação, a suplementação de dieta com ácido ascórbico promoveu aumento da proliferação e diferenciação das CMPs (BARRETO et al., 2006). FAUCONNEAU e PABOEUF (2001) observaram que CMPs extraídas de peixes em inanição distinguem-se em termos de tamanho, morfologia e taxa de proliferação em comparação aos peixes alimentados.

Neste estudo, a alimentação a base de alimento vivo favoreceu o crescimento das larvas de pacu e produziu, ao final do experimento, um peixe maior. Entretanto, os resultados morfológicos, morfométricos e moleculares obtidos mostram que a substituição do alimento vivo por dietas formuladas não comprometeu o desenvolvimento muscular devido à intensa hiperplasia muscular verificada nas larvas desses grupos. Estes resultados abrem perspectivas de investigação quanto ao crescimento compensatório posterior e utilização de estratégias alimentares mais eficientes e econômicas na produção comercial de peixes que impliquem no aumento da musculatura esquelética que é o compartimento do peixe mais importante em termos de aquicultura, pois constitui a fração comestível desses animais.

## 7 CONCLUSÕES

- O fornecimento exclusivo de alimento formulado desde o início da alimentação exógena não é um manejo alimentar eficiente para as larvas de pacu, pois não garante sobrevivência e compromete o crescimento, desenvolvimento e celularidade muscular;
- Os náuplios de artêmia propiciam melhor crescimento final e sobrevivência (88%) em relação aos demais alimentos e esquemas alimentares testados;
- As taxas de sobrevivência das larvas ao final de 31 dias não são influenciadas pelo tipo de microdieta fornecida, e nesse estudo foram consideradas satisfatórias (cerca de 56 e 62%) para larvas de pacu nesta fase e sistema de cultivo;
- Neste estudo, a alta frequência de fibras musculares com diâmetro menor que 20µm indica recrutamento de novas fibras musculares e a contribuição da hiperplasia no aumento da massa muscular e crescimento do pacu no período avaliado;
- A desnutrição das larvas de pacu, observada nos animais em jejum ou nos que receberam exclusivamente dieta comercial, acarreta atrofia das fibras musculares, evidenciada por fibras angulares e perda de massa muscular, fato corroborado pela perda simultânea de peso;

- A expressão da MyoD e Miogenina na musculatura esquelética de larvas de pacu não é influenciada pela substituição do alimento vivo por dietas formuladas, apesar desse manejo alimentar provocar diferenças no crescimento em peso e comprimento desses animais;

- A substituição do alimento vivo por dietas formuladas induz diferenças no crescimento, porém não compromete o potencial para desenvolvimento muscular que é a fração comestível do peixe e o compartimento mais importante em termos de aquicultura. Estes resultados abrem perspectivas de investigação sobre o crescimento compensatório posterior.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLARCÓN, F. J.; MOYANO, F. J.; DÍAS, M.; FERNÁNDEZ-DÍAS, C.; YÚFERA, M. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using in vitro digestibility techniques. **Aquaculture Nutrition**, v. 5, p. 107-113, 1999.

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

ALMEIDA, F. L.; CARVALHO, R. F.; PINHAL, D.; PADOVANI, C. R.; MARTINS, C.; DAL PAI-SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Mícron**, p. 1-6, 2008.

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

BARRETO, J. M. F. de A. **Plasticidade e crescimento da musculatura miotomal em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetida à dieta com suplementação de vitamina C**. 86 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CERICATO, L. **Substituição do alimento vivo pelo artificial e morfologia do sistema digestório de larvas de piau, *Leporinus macrocephalus***. 72 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

COLE, N. J.; HALL, T. E.; MARTIN, C. I.; MARK, A.; CHAPMAN, M. A.; KOBIYAMA, A.; NIHEI, Y.; WATABE, S.; JOHNSTON, I. A. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 4239-4248, 2004.

COMPANIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETC, 2000. 144 p.

DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present "state of art" and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, v. 24, n. 6, p. 807-833, 1984.

DABROWSKI, K; LEE, K.; RINCHAR, J. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 4225-4229, 2003.

DAL PAI, V.; DAL PAI SILVA, M.; CARVALHO, E. D.; FUJIHARA, C. Y.; GREGÓRIO, E. A.; CURI, P. R. Morphological, Histochemical and Morphometric Study of the Myotomal Muscle Tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887): Serrasalminae, Characidae, Teleostei. **Anatomy Histology Embriology**, v. 29, n. 5, p. 283-889, 2000.

DAL PAI-SILVA, M.; DAL PAI, V.; MOTA, D. L.; RODRIGUES, A. C. Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* Boch, 1795. **Annal of Anatomy**, v. 177, p. 65-70, 1995.

DUBOWITZ, V. **Normal muscle**. Muscle Biopsy: A Practical Approach, 2 ed. Bailliere Tindal, London, p. 41-81, 1985.

FAUCONNEAU, B.; PABOEUF, G. Muscle fiber diversity and plasticity. In: **Muscle Development and Growth**, JOHNSTON, I. A. (Ed) London: Academic Press, 2001. 318 p.

FERNANDEZ, D. A.; CALVO, J.; FRANKLIN, C. E.; JOHNSTON, I. A. Muscle fibre types and size distribution in sub-Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 1295-1311, 2000.

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

GALLOWAY, T. F.; BARDAL, T.; KVAM, S. N.; DAHLE, S. W.; NESSE, G.; RANDØL, M.; KJØRSVIK, E.; ANDERSEN, O. Somite formation and expression of MyoD, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: transient asymmetric expression of MyoD. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2432-2441, 2006.

GUERRERO-ALVARADO, C. E. **Treinamento alimentar de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

HOYLE, J.; GILL, H. S.; WEATHERLEY, A. H. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellunge, *E. masquinongy* (Mitchill). **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 393-401, 1986.

HUNG, L. T.; TUAN, N. A.; CACOT, P.; LAZARD, J. Larval rearing of the Asian catfish, *Pangasius bocourti* (Siloroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. **Aquaculture**, v. 212, p. 115-127, 2002.

HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, p. 1356-1365, 1969.

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

JOHNSTON, I. A. Specialization of fish muscle. In: **Development and specializations of muscle**. GOLDSPINK, D. F. (Ed.) Cambridge: Cambridge University Press, 1980. p. 123-148.

JOHNSTON, I. A. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. **Cell Tissue Research**, v. 214, p. 369-379, 1981.

JOHNSTON, I. A.; HOME, Z. Immunocytochemical investigations of muscle differentiation in the Atlantic herring (*Clupea harengus*, Teleostei). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 74, p. 79-91, 1994.

JOHNSTON, I. A.; VIEIRA, V. L. A.; ABERCROMBY, M. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring, *Clupea harengus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1389-1403, 1995.

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

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

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

JOMORI, R. K. **Estudos sobre a alimentação de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e a sua substituição por dieta artificial**. 70 f. (Trabalho de graduação em Zootecnia.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, p. 277-287, 2003.

JOMORI, R. K. **Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono (d13C) e nitrogênio (d15N) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval**. 121 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M. I. E. G.; PORTELLA, M. C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v. 243, p. 175-183, 2005.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Stable carbon (d13C) and nitrogen (d15N) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, p. 1-12, 2008.

KILARSKI, W. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach *Rutilus rutilus* (L.). **Journal of Fish Biology**, v. 36, p. 353-362, 1990.

KOLKOVSKI, K. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implication and applications to formulated diet. **Aquaculture**, v. 200, p. 181-201, 2001.

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

LANGDON, C. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 259-275, 2003.

LUZ, R. K.; JOMORI, R. K.; FABREGAT, T. E. H. P; AYRES, T. J. S.; PORTELLA, M. C. Larvicultura do matrinxã *Brycon cephalus*: efeitos da água salinizada e do manejo alimentar. **III Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura**, 2004.

MOMMSEN, T.; MOON, T. W. Hormonal regulation of muscle growth. In: **Muscle Development and Growth**, JOHNSTON, I. A. (Ed) London: Academic Press, 2001. 318 p.

MOYANO, F. J.; DIAZ, M.; ALARCÓN, F. J.; SERASQUETE, M. C. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream *Sparus aurata*. **Fish Physiology Biochemistry**, v. 15, p. 121-130, 1996.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixes: Estudos em Sistema-Modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e Teste *in vivo***. 151 f. (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L.; CYRINO, J. E. P. Produção de Characiformes autóctones. In: **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**, CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed) Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. 533 p.

ÖNAL, U.; LANGDON, C. Characterization in two microparticulate types for delivery of food to altricial fish larvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, n. 3, p.159-170, 2000.

PORTELLA, M. C.; DABROWSKI, K. Diets, Physiology, Biochemistry and Digestive Tract Development of Freshwater Fish Larvae. In: **Feeding and Digestive Functions in Fishes**, CYRINO, J. E. P.; BUREAU, D.; KAPOOR, B. G. (Eds) USA: Science Publisher, 2008. 580 p. (in press)

RESCAN, P. Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130B, p. 01-12, 2001.

RESCAN, P. Y. Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, p. 111-116, 2005.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: **Muscle Development and Growth**, JOHNSTON, I. A. (Ed) London: Academic Press, 2001. 318 p.

SÄNGER, A. M. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. **Environmental Biology of Fishes**, v. 33, p. 97-104, 1992.

SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: **Muscle Development and Growth**, JOHNSTON, I. A. (Ed) London: Academic Press, 2001. 318 p.

TAN, X.; DU, S. J. Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Development Genes and Evolution**, v. 212, p. 207–217, 2002.

TESSER, M. B.; PORTELLA, M. C. Degradation analysis of microencapsulated diet in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) larvae intestine through scanning electron microscopy (SEM). **Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 49-50. 2003.

TESSER, M. B. **Alimentação de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holberg, 1887)**. 86 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

TESSER, M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887), larvae with *Artemia* nauplii and a microencapsulated diet. **Jornal of Applied Aquaculture**, v. 17, n. 2, 2005a.

TESSER, M. B.; TERJESEN, B. F.; ZHANG, Y.; PORTELLA, M. C.; DABROWSKI, K. Free- and peptide-based dietary arginine supplementation for the South American fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 443-453, 2005b.

TESSER, M. B.; FLORES-QUINTANA, C. I.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO JR., J. M.; PORTELLA, M. C. Suplementação de enzimas exógenas e eficiência de dieta microparticulada na larvicultura do pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2211-2218, 2006.

TOM, M.; CHEN, N.; SEGEV, M.; HERUT, B.; RINKEVICH, B. Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an environmental biomarkers. **Marine Pollution Bulletin**, n. 48, p. 705-710, 2004.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, p. 225-246, 2005.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. **The biology of fish growth**, London: Academic Press, 1987.

WEST-EBERHARD, M. J. **Developmental Plasticity and Evolution**. New York: Oxford University Press, 2003.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Editora prentice - Hall, 1999. 930 p.

ZHANG, Y.; TAN, X.; ZHANG, P. J.; XU, Y. Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of Its expression patterns during embryogenesis. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 139-148, 2005.