SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO 1.8.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDA LOSI ALVES DE ALMEIDA

"EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES QUE CONTROLAM O CRESCIMENTO MUSCULAR DO PACU

(Piaractus mesopotamicus)"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Heves de Almeida e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

deli Dalia

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA **BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

AL64e	Almeida, Fernanda Losi Alves de Expressão gênica de fatores que controlam o crescimento muscular do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) / Fernanda Losi Alves de Almeida. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.
	Orientadora: Maeli Dal Pai Silva. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Músculo esquelético - Crescimento. 2. Expressão gênica. 3. Peixe - Genética. 5. Pacu (Peixe). I. Silva, Maeli Dal Pai. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Gene expression of factors that control the pacu (Piaractus mesopotamicus) skeletal muscle growth.

Palavras-chave em inglês: Skeletal muscle - Growth; Gene expression; Fishes - Genetics; Pacu (Fish).

Área de concentração: Biologia Celular. Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maeli Dal Pai Silva, Fernanda Antunes Alves da Costa, Elaine Minatel, Vander Bruno dos Santos, Gilberto Moraes.

Data da defesa: 22/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 22 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva (Orientadora)

alan Dal 2

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Assinatura

Profa. Dra. Elaine Minatel

Dr. Vander Bruno dos Santos

Prof. Dr. Gilberto Moraes

Profa. Dra. Adriana Pertille

Profa. Dra. Fernanda Antunes Alves da Costa

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

or Jel

Assinatura

andert Scn Assinatura Assinatura

Assinatura

tituti Assinatura

Assinatura

Dedicatória

À minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pela dedicação, atenção e profissionalismo, pelos preciosos ensinamentos, pelas palavras de incentivo e conforto nos momentos em que a procurei, pela confiança e paciência, pelas oportunidades para meu crescimento profissional e pessoal e pela amizade cultivada durante esses anos de convivência. Muito obrigada por tudo!

À minha mãe Silvia, por estar ao meu lado e me fazer companhia em todos os momentos, por sempre me ouvir, pelas palavras de conforto, pela torcida constante, pela comemoração a cada conquista e pelo seu amor de mãe. Muito obrigada.

Ao meu noivo Fernando, pelo seu amor, carinho e respeito, pela torcida constante, por compreender a minha ausência em nome da profissão, por me ouvir, me confortar, por estar sempre ao meu lado, em toda e qualquer situação, por ser meu porto seguro e por me tornar uma pessoa mais feliz a cada dia! Você é o amor da minha vida!

Agradecimentos especiais

A Deus, por me conceder a vida, minha família, meu noivo, meus amigos, por estar sempre ao meu lado, por ouvir minhas preces, guiar meus passos e iluminar os caminhos a serem seguidos.

Aos meus pais, Silvia e René, por toda a atenção, dedicação e carinho, por não terem medido esforços para que eu me dedicasse aos estudos, por estarem ao meu lado em todos os momentos, me apoiando nas dificuldades e vibrando a cada conquista. Muito obrigada por tudo!

À minha querida família: tias Dora e Sandra, tio Rafael e primos Gustavo, Juninho e Maria Eduarda, pelo amor, carinho, pelo apoio nos momentos de dificuldades e pela vibração em cada uma das minhas conquistas. Eu amo vocês!

Ao meu irmão Lucas e minha cunhada Juliana pelo carinho e pelos momentos compartilhados.

À minha sobrinha Angelina, pelo seu amor puro e verdadeiro, por todos os momentos de diversão compartilhados e por me fazer tão feliz.

À família do meu noivo Fernando, pela atenção, carinho e por todos os momentos compartilhados.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento desse projeto (Processo n° 06/60446-9).

À CAPES/PROEX pelo auxílio financeiro desse projeto.

Ao Prof. Dr. Cesar Martins, pela atenção e por permitir a utilização do Laboratório de Genômoca Integrativa (LGI) do Departamento de Morfologia, IB, UNESP, Botucatu.

Ao amigo Danillo Pinhal, pela amizade, dedicação e auxílio na obtenção e análise das sequências gênicas da miogenina e miostatina.

Aos docentes do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, pela dedicação e contribuição para a minha formação científica.

À Líliam Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP, pela dedicação, atenção e profissionalismo.

Às professoras Dra. Maria Júlia Marques, Dra. Evanisi Palomari e Dra. Lúcia Elvira Álvares, pela participação e valiosas contribuições no exame de qualificação.

Às professoras da pré-banca, Dra. Elaine Minatel, Dra. Adriane Pinto Wasko e Dra. Fernanda Antunes Alves da Costa, pela avaliação minuciosa que contribuiu de forma significativa para o enriquecimento desse trabalho.

À Profa. Dra Maria Júlia Marques por ter permitido a utilização do seu laboratório para a aprendizagem da técnica de *Western blot* e à Profa. Dra. Adriana Pertille e ao amigo Renato Ferretti pela intensa dedicação para ensinar a técnica e pela constante disposição no esclarecimento das dúvidas.

Aos docentes da disciplina de Histologia, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, pela dedicação, pelos ensinamentos e pela valiosa contribuição e oportunidades concedidas para meu desenvolvimento profissional.

À Luciana Cristina Montes, secretária do Departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, pela atenção, profissionalismo e disposição em sempre ajudar.

À Sueli Cruz Michelin, ex-funcionária do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, pela dedicação, pelo auxílio e pela adorável amizade.

À Profa. Dra. Irani Quagio Grassiotto, pela confiança e oportunidades para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Padovani pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados desse trabalho.

Aos amigos do Laboratorio de Biologia do Músculo Estriado (LBME), da UNESP-Botucatu, Caroline Nebo, Raquel Bertaglia, Andreo, Rachel Milanezi, Rodrigo, Ivan, Bruno, Luana, Warlen, Juliana Giusti, por todos os momentos compartilhados e por serem pessoas queridas e especiais.

Ao Prof. Dr. Marco Patruno, do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias (SperiVet), da Universidade de Pádua-Itália, por ter aceito o meu pedido de estágio, por ter organizado previamente a minha estadia e toda a parte burocrática de permanência no país e na Universidade, pela atenção constante, pelos preciosos ensinamentos, por me ensinar e corrigir com delicadeza o meu italiano, pela dedicação nos experimentos com o pacu e pela persistência na obtenção da sequência do IGF-I, por todos os momentos compartilhados e por ter participado desse momento tão marcante na minha vida. *Grazie mille per tutto!*

À Profa. Dra. Lisa Maccatrozzo, do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias (SperiVet), da Universidade de Pádua-Itália, pela receptividade, pela atenção e dedicação constantes, pelo auxílio na análise das sequências gênicas do pacu, pelos ensinamentos e por continuar sendo tão prestativa sempre que a procuro. *Grazie mille!*

À Profa. Dra. Roberta Sacchetto, do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias (SperiVet), da Universidade de Pádua-Itália, por todos os momentos compartilhados, pela sua atenção, pelos seus preciosos ensinamentos, por ter se dedicado integralmente aos meus experimentos durante o período de estágio, pela sua persistência na obtenção dos resultados, por me ensinar pacientemente o italiano e por ser um exemplo de pesquisadora. *Non ci sono parole per ringraziarti tutto chello hai fatto per me!*

Aos docentes do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias (SperiVet), da Universidade de Pádua-Itália, em especial, ao Prof. Dr. Giuseppe Radaelli, pela atenção e carinho, pelos preciosos ensinamentos e pela sua simpatia constante. *Grazie mille!*

À Dra. Tiziana Martinello, pós-doutoranda do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias (SperiVet), da Universidade de Pádua-Itália, pela atenção, pela receptividade, pelos ensinamentos e por todos os momentos compartilhados dentro e fora da Universidade. *Grazie mille!*

Aos colegas do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias (SperiVet), da Universidade de Pádua-Itália, Elena, Elisa, Eugenia e Mattia, por todos os momentos compartilhados e por terem me acolhido tão carinhosamente, e aos técnicos de laboratório Tommaso, Giovanni, Carlo e Laura, por todos os momentos divertidos vividos no laboratório e no restaurante universitário. *Mi mancano tutti*.

Aos amigos Paulo Pires, Juliana Lessa, Aline Michelin, Selma, Juliana Bardi, Flávia Dellela, Kelly Furtado, Lívia Lacorte e Jaqueline, pelos saudosos momentos compartilhados durante esses anos. Vocês são amigos muito especiais.

À minha querida amiga Fernanda Regina Carani, por todos esses anos de amizade, por todos os momentos compartilhados no laboratório, nos treinos e fora da universidade e por ter me ajudado e apoiado sempre que precisei. Muito obrigada!

À querida Nabila Scabine Pessotti, pela sua amizade, carinho e pela impecável colaboração em parte desse trabalho como seu projeto de iniciação científica.

Ao meu treinador Edson Oliveira, pelos momentos compartilhados, por me ouvir pacientemente, pelas palavras de incentivo, por ser meu exemplo de disciplina e de profissional a ser seguido e pela amizade construída nesses anos. Muito obrigada por tudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, pela atenção e carinho.

Índice

Resumo	
Abstract	12
1. Considerações iniciais	15
2. Introdução geral	
2.1 Organização da musculatura estriada esquelética nos peixes	19
2.2 Miogênese nos peixes	22
2.3 Controle molecular da miogênese	24
2.4 Crescimento muscular pós-embrionário em peixes	28
2.5 Controle molecular do crescimento muscular	31
2.5.1 Fatores de regulação miogênica (MRFs)	32
2.5.2 Miostatina	33
2.5.3 IGF-I	37
2.6 Piaractus mesopotamicus	41
3. Hipóteses	43
4. Objetivos	43
5. Material e métodos	45
5.1 Condições de criação dos animais	45
5.2 Coleta das amostras musculares	45
5.3 Morfologia e morfometria da musculatura branca	46
5.4 Obtenção das seqüências gênicas parciais da miogenina, miostatina e IGF-I	46
5.4.1 Obtenção das sequências parciais dos genes miogenina e miostatina	47
5.4.1.1 Extração do RNA total	47
5.4.1.2 Tratamento do RNA com DNase	48
5.4.1.3 Transcrição Reversa (RT) do RNA total	48
5.4.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT-PCR)	49
5.4.1.5 Clonagem e identificação dos insertos	50
5.4.1.6 Reação de PCR de següenciamento	51
5.5 Análise da expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e miostatina	52
5.6 Análise estatística dos resultados	55
6. Referências gerais	57
7. Resultados	67
7.1 Análise das sequências nucleotídicas da miogenina e miostatina	67
7.2 Artigo I	69
Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu	
(<i>Piaractus mesopotamicus</i>) skeletal muscle during growth	69
7.3 Artigo II	91
MyoD, myogenin and myostatin expression pattern in red and white skeletal muscles	of
adult pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	91
Anexo 1	. 107
Estágio de doutorado realizado na Universidade de Pádua, Itália.	. 107
Anexo 2	. 117
Análise da expressão quantitativa do gene IGF-I na musculatura branca do pacu	. 117
8. Conclusões e considerações finais	. 123

Resumo

Nos peixes, o crescimento muscular ocorre por hipertrofia e hiperplasia a partir da proliferação e diferenciação das células satélites, processos regulados pela expressão de fatores de transcrição e de crescimento. Os objetivos desse trabalho foram: (1) avaliar a morfologia, morfometria e expressão gênica da MyoD, miogenina e IGF-I na musculatura branca do pacu (Piaractus mesopotamicus) com 45, 90, 180, 400 dias pós-eclosão (dpe) e adultos (n=8) e (2) avaliar a expressão gênica da MyoD, miogenina e miostatina na musculatura branca e vermelha de pacus adultos (n=8). Em todos os grupos, fragmentos da musculatura branca foram dissecados e congelados em nitrogênio líquido. Nos adultos, também foram coletados fragmentos de músculo vermelho. Cortes histológicos (10 µm) da musculatura branca, obtidos em criostato, foram corados com hematoxilina-eosina para avaliação da morfologia e morfometria. Em cada animal, foi determinado o menor diâmetro de 100 fibras musculares brancas que foram distribuídas em classes, na dependência do seu diâmetro (<20 µm, 20-50 µm, >50 µm), para avaliar a hiperplasia e hipertrofia. A expressão gênica foi analisada por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real. A morfologia da musculatura branca foi semelhante em todos os grupos. No grupo 45 dpe, a alta freqüência de fibras brancas com diâmetro <20 µm indica intensa hiperplasia; nos adultos, a alta freqüência de fibras com diâmetro > 50 µm indica intensa hipertrofia. Nos grupos 90, 180 e 400 dpe, a alta freqüência de fibras com diâmetro entre 20 e 50 µm indica a ocorrência de hiperplasia e hipertrofia. A expressão gênica da MyoD e miogenina foi semelhante nos grupos 45, 90, 400 dpe e adultos, aumentando significativamente nos animais com 180 dpe; nos grupos 180 dpe e adultos, essa expressão foi similar. Nossos resultados sugerem que a alta expressão de MyoD e miogenina no grupo 180 dpe está relacionada com a proliferação e diferenciação de células satélites, respectivamente, contribuindo para a hiperplasia e hipertrofia. Nos adultos, essa expressão está controlando a hipertrofia. A expressão gênica de IGF-I foi semelhante nos grupos 45 e 90 dpe, diminuindo nos animais com 180 dpe e adultos; os grupos 45, 90 e 400 dpe apresentaram expressão similar. Nos grupos 45 dpe e adultos, a expressão de IGF-I está relacionada com a proliferação de células satélites durante a hiperplasia e hipertrofia, respectivamente; nos animais com 90, 180 e 400 dpe, essa expressão está controlando ambos os mecanismos de crescimento. Entre os músculos branco e vermelho dos animais adultos, a expressão de MyoD, miogenina e miostatina foi semelhante. No músculo branco, a expressão de MyoD e miogenina está relacionada com a proliferação e diferenciação das células satélites, respectivamente, durante a hipertrofia. Na musculatura vermelha, essa expressão é responsável pela manutenção do fenótipo das fibras musculares. A expressão de miostatina, nas fibras brancas e vermelhas, está relacionada com a regulação do crescimento e manutenção da massa muscular constante nesses compartimentos.

Abstract

In fish, skeletal muscle growth occurs by hypertrophy and hyperplasia and is dependent of the proliferation and differentiation of satellite cells, events regulated by the expression of transcription and growth factors. The purposes of this study were: (1) to evaluate the morphology, morphometry and MyoD, myogenin and IGF-I gene expression in white skeletal muscle from pacu (Piaractus mesopotamicus) at 45, 90, 180, 400 days post- hatching (dph) and adult (n=8) and (2) to analyze the MyoD, myogenin and myostatin gene expression in white and red muscles of adult pacu (n=8). In all groups, white skeletal muscle fragments were dissected out and frozen in liquid nitrogen. In adults, red muscle fragments were also collected. Transverse sections (10 μ m) from white muscle fragments, obtained in a cryostat, were stained with haematoxilin-eosin to evaluate muscle morphology and morphometry. In each animal fiber cross-section diameter (µm) was determined by measuring 100 white muscle fibers which were grouped into three diameter classes (<20µm, 20-50µm, and >50µm) to evaluate the hyperplasia and hypertrophy. Gene expression was analyzed by reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction. White muscle morphology was similar at all groups. The high frequency of <20µm diameter white fiber in 45 dph indicates intense hyperplasia; the high frequency of $>50\mu m$ diameter fiber in adults shows intense hypertrophy. In 90, 180, and 400 dph groups the high frequency of 20-50µm diameter fibers indicates the occurrence of hyperplasia and hypertrophy. MyoD and myogenin gene expression was similar in 45, 90, and 400 dph and adult fish, peaking at 180 dph; in 180 dpe and adult groups this expression was similar. Our results suggest that the high MyoD and myogenin expression at 180 dph is related to the satellite cells proliferation and differentiation, respectively, during hyperplasia and hypertrophy. In adult fish, this expression is controlling the hypertrophy. The IGF-I gene expression was similar in 45 and 90 dpe stages, decreasing in 180 dpe and adult fish; the 45, 90 and 400 dpe groups have showed similar expression. In 45 dpe and adult groups, IGF-I expression is related to satellite cells proliferation during hyperplasia and hypertrophy, respectively; in 90, 180 and 400 dpe fish, this expression is controlling the both muscle growth mechanims. In red and white muscles from adults the the MyoD, myogenin and myostatin gene expression was similar. In white muscle, the MyoD and myogenin expression is related to the satellite cells proliferation and differentiation, respectively, during hypertrophy. In red muscle, this expression is responsible to the maintenance of fiber-type phenotype. Myostatin expression in white and red muscles is related to the growth regulation and maintenance of constant muscle mass in these compartments.

1. Considerações iniciais

Nos peixes, a taxa de crescimento é um parâmetro importante para o sucesso da aqüicultura e está diretamente relacionada com o crescimento da musculatura estriada esquelética que corresponde à maior parte da massa corporal. Entre os peixes de grande interesse econômico na aqüicultura, destaca-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que representa a terceira espécie nativa mais cultivada no Brasil, com produção correspondendo a 4,5% da piscicultura de peixes de água doce (IBAMA, 2007). Suas excelentes características zootécnicas, como qualidade da carne e crescimento acelerado, têm despertado um grande interesse dos produtores e consumidores.

Nos peixes, a musculatura estriada esquelética apresenta-se organizada em compartimentos ou camadas, contendo diferentes tipos de fibras musculares. O compartimento vermelho é formado por fibras vermelhas de contração lenta e metabolismo oxidativo. O compartimento branco, que corresponde à maior parte do tecido muscular, é formado por fibras brancas com contração rápida e metabolismo glicolítico. Entre esses compartimentos, encontra-se o compartimento intermediário com fibras paresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias entre as das fibras brancas e vermelhas (Sänger & Stoiber, 2001). Nos peixes, a distribuição dos tipos de fibras em compartimentos difere do padrão encontrado nos demais vertebrados. Nos mamíferos, por exemplo, a maioria dos músculos é formada por uma população heterogênea de fibras, distribuídas de maneira a formar um mosaico ou pequenos grupos de fibras de um mesmo tipo (Armstrong et al., 1982; Armstrong & Pheleps, 1984).

O crescimento muscular é dependente da ativação, proliferação e diferenciação de mioblastos adultos indiferenciados, também conhecidos como células satélites (Koumans & Akster, 1995). Nos peixes, esse crescimento ocorre através dos mecanismos de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares. Na hiperplasia, a fusão entre células satélites ativadas resulta na formação de novas fibras musculares na superfície das fibras existentes. Na hipertrofia, as células satélites ativadas fundem-se com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, levando ao aumento na área da fibra muscular (Koumans & Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowlerson & Veggetti, 2001).

O crescimento muscular é controlado positiva e negativamente por uma série de fatores transcricionais e de crescimento, entre os quais estão os fatores de regulação miogênica (MRFs), a miostatina e o IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*).

Os MRFs são fatores transcricionais dos quais fazem parte a MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Weintraub, 1993; Watabe, 1999, 2001). Os MRFs ligam-se à região promotora dos genes músculo específicos, ativando sua transcrição (Murre et al., 1989, 1994; Lassar et al., 1991). Durante o crescimento, a proliferação das células satélites é controlada pela expressão dos MRFs MyoD e Myf5, enquanto a expressão de miogenina e MRF4 está relacionada com os processos de diferenciação das células satélites em fibras musculares maduras (Megeney & Rudnicki, 1995; Rudnicki & Jaenisch, 1995; Watabe, 1999, 2001).

Além dos MRFs, o IGF-I também está envolvido com o controle do crescimento muscular em peixes. O IGF-I estimula a proliferação de mioblastos e células satélites *in vitro* (Pozios et al., 2001; Castillo et al., 2004; Funkenstein et al., 2006; Bower & Johnston, 2010). No entanto, a maioria dos trabalhos, envolvendo o IGF-I, está relacionada com a caracterização do gene e seu padrão de expressão em diferentes tecidos (Reinecke et al., 1997; Moriyama et al., 2000; Patruno et al., 2006). Poucos trabalhos têm relacionado a expressão do IGF-I com o crescimento muscular em peixes (Patruno et al., 2008), embora sua ação mitogênica sobre as células satélites seja bem estabelecida em algumas espécies.

Diferentemente dos MRFs e do IGF-I, a miostatina regula negativamente o crescimento muscular (McPherron et al., 1997) pela inibição da proliferação e/ou diferenciação de células satélites (Thomas et al., 2000; Langley et al., 2002), processo bem estabelecido em mamíferos. O gene da miostatina tem sido descrito em várias espécies de peixes e sua expressão tem sido detectada predominantemente no músculo esquelético, embora níveis menores de expressão sejam observados em outros tecidos (Maccatrozzo et al., 2001a,b; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001; Roberts & Goetz, 2001; Kocabas et al., 2002; Radaelli et al., 2003). Assim, nos peixes, a função da miostatina parece ser mais ampla se comparada à dos mamíferos, não sendo restrita apenas ao controle do crescimento muscular, mas, possivelmente, participando da fisiologia e regulação de outros tecidos (Østbye et al., 2001; Acosta et al., 2005; Patruno et al., 2008).

Trabalhos que envolvem a análise da expressão gênica dos MRFs MyoD e miogenina e do IGF-I no músculo estriado esquelético de peixes poderiam auxiliar na melhor compreensão do controle molecular da proliferação e diferenciação de células satélites durante o crescimento muscular. As análises do padrão de expressão desses genes e da contribuição da hiperplasia e hipertrofia ao longo do crescimento, podem fornecer valiosas informações para a elaboração de estratégias viáveis que potencializem o crescimento muscular em espécies de importância econômica na aqüicultura, em condições naturais ou experimentais de criação. Em relação à miostatina, são escassos os estudos descrevendo seu modo de ação da sobre a proliferação e diferenciação das células satélites e, consequentemente, sobre a hiperplasia e hipertrofia muscular. Além disso, poucos estudos descrevem as possíveis ações dessa proteína no metabolismo dos demais tecidos onde é expressa. A compreensão da função da miostatina, no controle do crescimento muscular em peixes, pode representar uma interessante ferramenta para a aquicultura. Por outro lado, muitos estudos devem ser realizados para melhor avaliar os efeitos da inibição da miostatina sobre o crescimento muscular e a fisiologia dos peixes.

2. Introdução geral

2.1 Organização da musculatura estriada esquelética nos peixes

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

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

Os miômeros apresentam formato em "W" e cada um contém uma região superficial, em formato de cunha, disposta imediatamente abaixo da linha lateral, onde as fibras musculares têm disposição paralela ao eixo corporal, e uma região mais profunda, com as fibras musculares apresentando uma disposição em hélice, formando ângulos maiores que 40° em relação ao eixo corporal (Figura 1B). Esse padrão peculiar de orientação das fibras musculares está relacionado com a necessidade de todas as fibras contraírem a uma mesma velocidade, qualquer que seja a sua posição dentro dos miômeros, para resultar na flexão do corpo (Alexander, 1969; Patruno et al., 1998; Sänger & Stoiber, 2001).



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

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



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

O compartimento vermelho, normalmente, corresponde a menos de 10% e nunca excede 30% de toda a musculatura miotomal (Greer-Walker & Pull, 1975; Sänger & Stoiber, 2001). Pode estar localizado na região subdermal, como uma camada fina e uniforme ao longo de todo o corpo do animal (Egginton & Johnston, 1982; Dal Pai-Silva et al., 1995), ou apresentar uma distribuição mais localizada, aparecendo somente na região do nervo da linha lateral, onde assume um aspecto triangular (Hoyle et al., 1986; Sänger & Stoiber, 2001). Esse compartimento é constituído por fibras musculares vermelhas, de contração lenta e metabolismo oxidativo. As fibras vermelhas apresentam pequeno diâmetro (entre 25 e 45 μ m), excelente suprimento de capilares sanguíneos, grande concentração de mioglobina, grande quantidade de mitocôndrias (na região subsarcolemal e entre as miofibrilas) e muitas gotículas de lipídios (Bone, 1978; Johnston, 1981; Sänger & Stoiber, 2001). As fibras vermelhas são recrutadas durante a realização de movimentos lentos e de sustentação, como a migração (Johnston et al., 1977; Bone, 1978).

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

Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento intermediário (musculatura intermediária), com fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias entre as das fibras musculares brancas e vermelhas, como

contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (Johnston et al., 1977; Sänger & Stoiber, 2001).

2.2 Miogênese nos peixes

Nos peixes, a formação das primeiras fibras musculares ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. O tecido muscular estriado esquelético origina-se do mesoderma paraxial que sofre segmentação, na direção rostro-caudal do embrião, formando blocos pareados de células mesodérmicas, os somitos, localizados lateralmente à notocorda e ao tubo neural. Cada somito é subdividido nas regiões esclerótomo, miótomo e dermótomo, cada uma contendo tipos celulares específicos (Christ & Ordahl, 1995). A porção ventromedial do somito, o esclerótomo, dará origem ao esqueleto axial do embrião. O dermótomo, de localização dorsal, formará a derme, enquando o miótomo, originará os músculos do tronco e da cauda (Devoto et al., 1996; Currie & Ingham, 2001). Nos peixes, o esclerótomo é altamente reduzido, pois, no ambiente aquático, o animal apresenta maior facilidade em sustentar o peso do corpo. Dessa forma, a maior parte do somito é constituída pelo miótomo (Bone, 1966; Currie & Ingham, 2001).

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

dorsal (epiaxial) (Bone, 1989). As demais células do miótomo, conhecidas como células laterais pré-somíticas ou mioblastos *fast*, fundem-se para formar miotubos, dando origem ao compartimento de músculo branco do embrião (Devoto et al., 1996; Du et al., 1997; Currie & Ingham, 2001) (Figura 3).



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

Durante a miogênese, os mioblastos mononucleados fundem-se uns aos outros, formando miotubos. Esses miotubos possuem um ou mais núcleos em posição central, miofibrilas em posição periférica e características morfológicas e fisiológicas próprias (Johnston et al., 1995; Johnston, 1999). Nos miotubos, ocorre a organização das proteínas que irão constituir a unidade contrátil do músculo, o sarcômero (Huxley, 1969). O sarcômero é constituído, principalmente, pelos filamentos grossos, formados pelas cadeias de miosina, e pelos filamentos finos, compostos pelas proteínas actina, troponina e tropomiosina. A contração muscular depende do deslizamento dos filamentos finos sobre os filamentos grossos (Huxley, 1969, 1971, 1983).

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

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

2.3 Controle molecular da miogênese

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

Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico, uma seqüência consenso no DNA conhecida como E-box (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989; Blackwell & Weintraub,

1990). A região *Helix-Loop-Helix* dos MRFs constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47 (Murre et al., 1989). A ligação do heterodímero MRF-proteína E ou de homodímeros dos MRFs à seqüência E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, levando à sua expressão (Murre et al., 1989, 1994; Lassar et al., 1991).



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

Em várias espécies de peixes, muitos estudos têm caracterizado as sequências codificantes completas dos RNAs mensageiros (RNAm) referentes à MyoD e à miogenina. Essas sequências apresentam alta similaridade com as mesmas sequências descritas em outras espécies de vertebrados, principalmente em relação ao domínio de ligação ao DNA bHLH. Na carpa, a sequência nucleotídica completa da MyoD apresenta 93, 81, 73 e 71% de similaridade com a MyoD de *zebrafish* (Weinberg et al., 1996), truta arco-íris (Rescan et al., 1994), sapo (Hopwood et al., 1989) e galinha (Lin et al., 1989), respectivamente. A sequência nucleotídica completa da miogenina apresenta 69, 55 e 51% de similaridade com a miogenina da truta arco-íris (Rescan et al., 1995), galinha (Fujisawa-Sehara et al., 1990) e camundongo (Edmondson et al., 1994), respectivamente. A comparação da sequência de aminoácidos dos MRFs da carpa com a de outros vertebrados mostrou que a sequência da MyoD é mais conservada que a da miogenina, inclusive em relação ao domínio bHLH (Kobiyama et al., 1998). No Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), do Departamento de Morfologia, da UNESP-Botucatu, foram obtidas as sequências nucleotídicas parciais referentes à MyoD e miogenina, expressas no músculo estriado esquelético do pacu (números de acesso do Genbank – MyoD:

FJ686692; miogenina: FJ810421). Essas sequências apresentaram alta similaridade com as mesmas sequências descritas em outras espécies de vertebrados, incluindo teleósteos.

Durante a miogênese, o programa miogênico é sinalizado pela expressão dos MRFs (Currie & Ingham, 2001). A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos na fase de proliferação dos mioblastos, enquanto os fatores secundários, miogenina e MRF4, são expressos em mioblastos nas fases de fusão e diferenciação em fibras musculares maduras (Megeney & Rudnicki, 1995; Rudnicki & Jaenisch, 1995; Watabe, 1999) (Figura 5).



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

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

expressão dos MRFs é semelhante ao descrito em *zebrafish* e codornas (Kobiyama et al., 1998).

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



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

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

2.4 Crescimento muscular pós-embrionário em peixes

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

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

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



Figura 7. Esquema mostrando o crescimento pós-embrionário hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares, em peixes, a partir das células satélites. As células satélites são quiescentes e indiferenciadas, permanecendo na fase G0 do ciclo celular. Quando ativadas, sofrem divisão celular assimétrica, onde uma célula-filha continua indiferenciada para manter constante o número de células satélites quiescentes na fibra muscular e, a outra célula-filha, torna-se comprometida com a diferenciação e o crescimento muscular. As células satélites ativadas podem sofrer fusão a uma fibra muscular existente, caracterizando a hipertrofia, ou podem fundir-se a outras células satélites, na superfície da fibra muscular, formando um miotubo que se diferencia em uma nova fibra muscular, caracterizando a hiperplasia. A proliferação e diferenciação das células satélites ocorrem sob o controle da expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e de fatores de crescimento (adaptado de Johnston, 1999).



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

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

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

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

2.5 Controle molecular do crescimento muscular

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

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

31

2.5.1 Fatores de regulação miogênica (MRFs)

Os MRFs são expressos durante a miogênese e o crescimento muscular. Durante o crescimento, a proliferação das células satélites é controlada pela expressão dos MRFs MyoD e Myf5, enquanto a expressão de miogenina e MRF4 está relacionada com os processos de diferenciação das células satélites em fibras musculares maduras (Megeney & Rudnicki, 1995; Rudnicki & Jaenisch, 1995; Watabe, 1999, 2001).

A maioria dos estudos envolvendo os MRFs, em peixes, é realizada para a caracterização de suas sequências nucleotídicas (Kobiyama et al., 1998; Kim et al., 2004; Gregory et al., 2004; Zhang et al., 2006; Xu et al., 2007). Alguns estudos descreveram a expressão dos MRFs durante a miogênese e início do desenvolvimento após a eclosão (Zhang et al., 2006; Steinbacher et al., 2007); outros trabalhos demonstraram a influência de fatores externos, como temperatura (Wilkes et al., 2001; Assis et al., 2004; Galloway et al., 2006; Macqueen et al., 2007) e restrição alimentar (Johansen & Overturf, 2006) na expressão dos MRFs. Poucos trabalhos têm relacionado a expressão dos MRFs com o crescimento muscular. Johansen & Overturf (2005) demonstraram uma expressão diferencial dos MRFs MyoD e miogenina ao longo do crescimento da truta arco-íris, desde o início do desenvolvimento até a fase adulta. Esses autores relacionaram a expressão de MyoD com a proliferação de células satélites e hiperplasia e, a expressão de miogenina, com a diferenciação dessas células e hipertrofia. Almeida et al. (2008) demostraram que a expressão de MyoD foi significativamente maior no músculo branco de pacus na fase juvenil, em relação à fase adulta, e que essa expressão diferencial está relacionada com o predomínio da hiperplasia na fase juvenil. Estudos realizados no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), do Departamento de Morfologia, da UNESP-Botucatu, sugerem que a MyoD e a miogenina controlam a proliferação e diferenciação de células satélites, respectivamente, as quais podem contribuir para a hiperplasia e/ou hipertrofia, dependendo da fase de crescimento considerada (Almeida et al., 2010).

2.5.2 Miostatina

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

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



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

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



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

Nos mamíferos, a miostatina apresenta duas funções regulatórias distintas e bem estabelecidas. A primeira função é regular o número final de fibras a serem formadas durante a miogênese, através do controle da proliferação e/ou diferenciação dos mioblastos. O controle da proliferação dos mioblastos ocorre pela capacidade da miostatina em aumentar os níveis da proteína p21, diminuindo os níveis do complexo ciclina-Cdk2 e a fosforilação da proteína retinoblastoma, impedindo que os mioblastos iniciem o ciclo celular e sua proliferação dos mioblastos se dá pela *down*-regulação da expressão dos MRFs MyoD, miogenina e Myf-5 (Langley et al., 2002; Ríos et al., 2002; Joulia et al., 2003). A segunda função da miostatina é regular o crescimento pós-natal das fibras musculares através da inibição da proliferação e/ou

diferenciação das células satélites durante a hipertrofia (Lee, 2004). Em condições normais, a miostatina é responsável por manter as células satélites no estado quiescente, até que, em circunstâncias nas quais o crescimento ou a regeneração são requeridos, a miostatina possa ser inibida, permitindo que as células satélites retornem ao ciclo celular (Lee, 2004) (Figura 11).



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

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

O gene da miostatina tem sido descrito em várias espécies de peixes (Maccatrozzo et al., 2001a; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001; Rodgers et al., 2001; Rodgers & Weber, 2001; Kocabas et al., 2002; Ko et al., 2007; Xu et al., 2003; Ye et al., 2007). Nesses animais, os maiores níveis de expressão do gene da miostatina foram observados no músculo esquelético; níveis menores de expressão foram detectados nos rins, pâncreas, intestino, brânquias, cérebro e coração (Maccatrozzo et al., 2001a,b; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001; Roberts & Goetz, 2001; Kocabas et al., 2002; Radaelli et al., 2003). Assim, nos peixes, a função da miostatina parece ser mais ampla se comparada à dos mamíferos, não sendo restrita apenas ao controle do crescimento muscular, mas, possivelmente, participando da fisiologia e regulação de outros tecidos (Østbye et al., 2001; Acosta et al., 2005; Patruno et al., 2008).

Em algumas espécies de peixes, a expressão gênica da miostatina foi analisada no músculo estriado esquelético ao longo do desenvolvimento e crescimento. No ínicio do desenvolvimento embrionário, onde o crescimento muscular ocorre, predominantemente, por hiperplasia, os níveis de expressão de miostatina, no músculo esquelético, são baixos, aumentando significativamente nos estágios finais de desenvolvimento, quando a hiperplasia torna-se menos intensa (Xu et al., 2003; Johansen & Overturf, 2005; Patruno et al., 2008). Esses resultados demonstram um possível envolvimento da miostatina com o controle negativo do crescimento muscular em peixes.

2.5.3 IGF-I

O sistema IGF, constituído pelo hormônio do crescimento (GH), hormônios IGF-I e IGF-II, seus receptores e pelas proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs: *IGF binding proteins*), é essencial para a formação, crescimento e manutenção do músculo esquelético (Funkenstein et al., 2006). Sob estímulo do hipotálamo, a hipófise produz e libera o hormônio do crescimento (GH) na corrente sanguínea. O GH liga-se a receptores específicos nas células-alvo,

37

estimulando a síntese e liberação de IGF-I (Moriyama et al., 2000). Dessa forma, o IGF-I é o mediador das funções de crescimento pós-natal exercidas pelo GH (Schwander et al., 1983).

A proteína IGF-I é bastante conservada entre os vertebrados (Barton, 2006). Inicialmente, o IGF-I é sintetizado como uma molécula precursora, denominada pré-pró-IGF-I, que contém (1) uma sequência sinal na região N-terminal, (2) a região madura, constituída pelos domínios A, B, C e D, e (3) uma porção denominada de domínio E, localizada na região C-terminal (Moriyama et al., 2000). A sequência sinal e o domínio E são removidos do prépró-IGF-I, por proteólise, liberando a porção madura do IGF-I, contendo 70 aminoácidos. A estrutura terciária da porção madura é mantida por pontes dissulfeto (Moriyama et al., 2000) (Figura 12).



Figura 12. Representação esquemática do pré-pró-IGF-I e da proteína madura correspondente. A sequência-sinal e o domínio E são removidos, enquanto a proteína madura é constituída pelos domínios A, B, C e D. Entre os domínios A e B são estabelecidas pontes dissulfeto entre resíduos de aminoácidos cisteína (adaptado de Moriyama et al., 2000).

O IGF-I, produzido nos tecidos, é liberado na corrente sanguínea, onde permanece complexado a proteínas de ligação específicas, as IGFBPs. As IGFBPs transportam as moléculas de IGF-I pelo plasma, controlam o seu efluxo na circulação, além de prolongarem sua meia-vida e modularem a sua interação com receptores específicos, de forma a controlar indiretamente suas ações biológicas (Jones & Clemmons, 1995).

As ações biológicas do IGF-I são mediadas pelo receptor de IGF-I (IGF-IR), expresso em uma variedade de tipos celulares. O IGF-IR apresenta estrutura tetramérica, sendo formado por duas subunidades α e duas β ($\alpha 2\beta 2$) unidas por pontes dissulfeto. As subunidades α são extracelulares e constituem o domínio de ligação ao IGF-I; as subunidades β possuem uma região extracelular, uma região transmembrana e um domínio tirosina-quinase na região citoplasmática (Jones & Clemmons, 1995; LeRoith et al., 1995).

O IGF-I está envolvido com a regulação do metabolismo celular de proteínas, lipídios, carboidratos e minerais, com a proliferação e diferenciação celular e com o crescimento corporal (Moriyama et al., 2000). Uma ampla variedade de tecidos, como o cérebro, músculo, rins e intestino produzem IGF-I localmente, embora o fígado seja o sítio primário de sua produção, fornecendo aproximadamente 75% de todo o IGF-I circulante do corpo (Schwander et al., 1983). A importância do IGF-I para o crescimento normal foi demonstrado em modelos de animais *knockout*. Camundongos *knockout* para o IGF-I mostraram um retardo severo no crescimento (Barton, 2006). Entretanto, em outros experimentos, nos quais somente a produção de IGF-I proveniente do fígado foi interrompida após o nascimento, não foi observada deficiência no crescimento corporal (Sjögren et al., 1999), mostrando que a produção local de IGF-I, por outros tecidos, e sua ação autócrina ou parácrina é suficiente para garantir o crescimento normal (Barton, 2006).

As funções do IGF-I sobre o músculo esquelético são bem estabelecidas em mamíferos. O IGF-I está envolvido com a regulação do desenvolvimento e crescimento muscular devido às suas potentes ações metabólica e mitogênica (Reinecke & Collet, 1998; Florini et al., 1993, 1996; Musarò et al., 1999). O IGF-I regula as vias anabólicas do músculo esquelético, levando ao aumento ou manutenção da massa muscular (Otto & Patel, 2010). O aumento da massa muscular (hipertrofia) pode ocorrer pela incorporação de núcleos de células satélites, após sua proliferação, às fibras musculares em crescimento ou em regeneração (Florini et al., 1993, 1996; Musarò et al., 1999) e pelo aumento nos níveis de proteínas dentro da fibra muscular (Otto & Patel, 2010). Para essas ações, a ligação do IGF-I ao seu receptor pode resultar na ativação de duas principais vias de sinalização. Primeiramente, o IGF-I pode estimular a cascata de sinalização mediada pela MAPK (*mitogen activated protein kinase*) que resulta na proliferação de mioblastos, durante a miogênese, ou de células satélites, durante o

crescimento muscular (Halevy & Cantley, 2004). A segunda via de sinalização que pode ser ativada é mediada pelas proteínas PI3K-PKB/Akt-mTOR (*phosphoinositide-3-kinase - protein kinase B* ou *Akt – mammalian target of rapamycin*), que determinam a ativação de diferentes proteínas-alvo, resultando no aumento da síntese de proteínas do músculo esquelético e hipertrofia (Lai et al., 2004) (Figura 13). A manutenção da massa muscular, mediada pelo IGF-I, ocorre pela inibição das vias da atrofia muscular, impedindo a degeneração e a perda de massa muscular (Otto & Patel, 2010).



Figura 13. Representação esquemática simplificada das duas principais vias de sinalização do IGF-I (*insulin like growth factor-I*) em mamíferos. A via de sinalização mediada pela MAPK (*mitogen activated protein kinase*) resulta na proliferação de mioblastos ou de células satélites. A via mediada pelas proteínas PI3k-PKB/Akt-mTOR (*Phosphoinositide-3-kinase - protein kinase B* ou *Akt - mammalian target of rapamycin*) determina um aumento na síntese de proteínas na fibra muscular. Essas duas ações resultam em hipertrofia muscular. O IGF-I permanece complexado às IGFBPs (*insulin like growth factor binding protein*), as quais modulam a sua interação com os receptores específicos IGF-R (*insulin like growth factor receptor*). A proteína IRS1 (*insulin receptor substrate 1*) é comum às duas vias de sinalização (baseado em Otto & Patel, 2010).

Nos teleósteos, são escassos os trabalhos que descrevem as vias de sinalização ativadas pelo IGF-I. Esses estudos utilizam modelos de cultura de mioblastos ou células satélites e mostram que as proteínas envolvidas na via de sinalização do IGF-I são conservadas entre os vertebrados. No *zebrafish*, o IGF-I estimula a proliferação de mioblastos em cultura através da ativação das vias MAPK e PI3k/Akt (Pozios et al., 2001). Em cultura de mioblastos

de truta arco-íris (Castillo et al., 2006) e de salmão (Bower & Johnston, 2010), a ativação de uma ou ambas as vias de sinalização, pelo IGF-I, é dependente do estágio de desenvolvimento dessas células. Nos mioblastos em proliferação e diferenciação da truta, o IGF-I ativa as vias da MAPK e PI3k/Akt; nos miotubos em diferenciação, ocorre ativação da via da PI3k/Akt (Castillo et al., 2006). No salmão, nos estágios iniciais de cultura de mioblastos em proliferação, ocorre ativação da via da MAPK, enquanto nos estágios mais tardios, ocorre a ativação da via PI3k/Akt (Bower & Johnston, 2010).

Além dos estudos envolvendo a via de sinalização do IGF-I em peixes, alguns trabalhos têm demonstrado seu efeito mitogênico sobre mioblastos e células satélites em cultura (Pozios et al., 2001; Castillo et al., 2004; Funkenstein et al., 2006; Bower & Johnston, 2010). No entanto, a maioria dos trabalhos, envolvendo o IGF-I, está relacionada com a caracterização do gene e seu padrão de expressão em diferentes tecidos (Reinecke et al., 1997; Moriyama et al., 2000; Patruno et al., 2006). Além do músculo esquelético, a expressão do gene IGF-I tem sido observada em outros órgãos, como cérebro, brânquias, coração, intestino, fígado e rins (Vong et al., 2003).

2.6 Piaractus mesopotamicus

Nesse estudo foi utilizada a espécie *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), popularmente conhecida como pacu (Figura 14). O pacu apresenta grande interesse econômico, sendo extensivamente utilizado nos programas brasileiros de aqüicultura (Hernandez, 1989), com sua criação correspondendo a 4.5% da psicultura de peixes de água doce. O pacu e o híbrido *P. mesopotamicus* X *Colossoma macropomum* são responsáveis por 11.1% da produção pesqueira nacional (IBAMA, 2007).

É representante da superordem Ostariophysi, na qual se incluem os peixes de maior valor comercial na pesca e na piscicultura brasileiras, e pertence à ordem Characiforme, grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul (Urbinati & Gonçalves, 2005).



Figura 14. Piaractus mesopotamicus (imagem obtida de http://haroldopalojr.files.wordpress.com).

O pacu é originário da Bacia do Rio Prata e do Pantanal do Mato Grosso, sendo encontrado nas Bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975). Sua maior distribuição ocorre nas planícies alagadas da região Centro-Oeste, principalmente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Petrere, 1989). No entanto, a disponibilidade do pacu oriundo da piscicultura vem aumentando e pode ajudar a popularizar o seu consumo em outras regiões do Brasil. Sua carne é saborosa e pode apresentar alto teor de gordura dependendo da idade, época de captura ou tipo de alimento utilizado na criação (Bernardino & Colares de Melo, 1989). Além da carne saborosa e do alto valor comercial, suas características de precocidade, rusticidade, ótimo crescimento e adaptação à alimentação artificial propiciam o sucesso da sua criação em sistemas de criação intensiva (Castagnoli & Cyrino, 1986).

No seu habitat natural, o pacu apresenta hábito onívoro, alimentando-se de folhas, caules, flores, frutos e sementes. Havendo necessidade, ele pode alimentar-se de insetos, aracnídeos, moluscos e peixes (Bernardino & Colares de Melo, 1989; Urbinati & Gonçalves, 2005).

O pacu possui crescimento rápido, com peso variando de 1,0 a 1,5 kg no primeiro ano de criação, podendo, posteriormente, atingir até 20 kg (Bernardino & Colares de Melo, 1989). Os mecanismos de crescimento por hiperplasia e hipertrofia das fibras ocorrem ao longo de todo o período de crescimento (Dal Pai et al., 2000; Almeida et al., 2008, 2010).

Pouco é sabido sobre a expressão dos genes que controlam os mecanismos de crescimento muscular nas espécies brasileiras de peixes. A maioria dos estudos envolvendo a expressão dos MRFs, IGF-I e miostatina em peixes é realizada com espécies nativas da Europa, América do Norte e espécies modelos, como o *zebrafish*. Trabalhos, nessa mesma linha de investigação, com espécies de peixes da América do Sul são escassos. Esse estudo mostra, pela primeira vez, a expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina, IGF-I e miostatina na musculatura do pacu. Nesse estudo, a caracterização da hiperplasia e hipertrofia e do padrão de expressão de fatores que controlam esses mecanismos de crescimento podem servir como referência para pesquisas envolvendo outras espécies brasileiras de peixes de interesse econômico e contribuir para a elaboração de estratégias que potencializem o crescimento muscular.

3. Hipóteses

Considerando que os MRFs MyoD e miogenina, o IGF-I e a miostatina estão envolvidos com o controle do crescimento muscular em peixes, a primeira hipótese desse trabalho é que há uma expressão gênica diferencial dos MRFs MyoD e miogenina e do fator de crescimento IGF-I durante o crescimento muscular do pacu, desde a fase juvenil até a adulta. A segunda hipótese é que ocorre uma expressão diferencial dos genes MyoD, miogenina e miostatina entre os músculos branco e vermelho de pacus na fase adulta.

4. Objetivos

Avaliar a morfologia, os mecanismos de crescimento hiperplásico e hipertrófico e a expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e IGF-I, na musculatura branca do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes fases de crescimento.

Avaliar a expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e miostatina nos músculos branco e vermelho de pacus adultos.

43

5. Material e métodos

5.1 Condições de criação dos animais

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (protocolo nº 74/07).

Nesse estudo, foram utilizados exemplares de pacu (Piaractus mesopotamicus) provenientes do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP - Jaboticabal, SP). Larvas foram obtidas por reprodução induzida de um único casal de reprodutores no Laboratório de Reprodução de Peixes do Centro de Aqüicultura da UNESP. O experimento de larvicultura foi desenvolvido em tanques de polietileno, abastecidos com 100 litros de água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo e com aeração artificial constante. As larvas foram contadas e distribuídas em 10 tanques, na densidade de 20 larvas/litro. As larvas foram alimentadas com náuplios de artêmia, quatro vezes ao dia, em quantidades diárias crescentes ajustadas a cada três dias (250; 500; 1000; 1500 e 2000 organismos/larva). Após 15 dias de alimentação exógena, a quantidade final de náuplios foi mantida e, ao mesmo tempo, introduzida ração artificial comercial contendo 40% de proteína bruta. Diariamente, pela manhã e à tarde, foram monitorados a temperatura e, a cada três dias, os valores de pH e oxigênio dissolvido. Após 15 dias, as larvas foram transferidas para viveiros escavados com 200 m^2 de área, na densidade de 1 peixe m⁻³. A taxa de oxigenação da água foi de 4,0 mg/L. A temperatura da água variou de 25 a 28° C no verão e de 19 a 25° C no inverno (Squassoni, 2010). O fluxo de água no tanque foi em torno de 0,4 litros por segundo. Os peixes foram alimentados com ração comercial balanceada (32% PB) até saciação aparente.

5.2 Coleta das amostras musculares

Os exemplares de pacu, utilizados nesse experimento, foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- 1. Grupo com 45 dias após a eclosão (n=8);
- 2. Grupo com 90 dias após a eclosão (n=8);
- 3. Grupo com 180 dias após a eclosão (n=8);
- 4. Grupo com 400 dias após a eclosão (n=8);

5. Grupo de animais adultos, com dois anos de idade (n=8).

Os peixes foram trazidos para o Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), do Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP, Botucatu. Em cada coleta, os peixes foram sacrificados por uma overdose de anestésico MS-222 (*Tricaine Methanensulfonate* – SIGMA) colocado na água. Em seguida, foram determinados o peso (g) e o comprimento total (cm) dos exemplares.

Os exemplares de 45 dias foram seccionados para separar a região corporal dorsal (com predominância do tecido muscular estriado esquelético) da cabeça, cauda e cavidade abdominal. Nos demais grupos, foram retirados fragmentos da musculatura branca dorsal, na proximidade da linha lateral. Nos animais adultos, também foram retirados fragmentos de músculo vermelho, na região dorsal próxima à linha lateral. Todas as amostras musculares foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C.

5.3 Morfologia e morfometria da musculatura branca

Cortes histológicos (10 μ m) dos fragmentos de músculo branco coletados foram obtidos em criostato a -20° C e submetidos à coloração hematoxilina-eosina (Bancroft & Steven, 1990) para a avaliação da morfologia das fibras musculares. Utilizando um sistema de análise de imagens (Leica Qwin, Germany), foi determinado o menor diâmetro de todas as fibras musculares brancas presentes em campos aleatórios da lâmina histológica até que aproximadamente 100 fibras musculares fossem analisadas, por animal, em cada grupo experimental (Dubowitz & Brooke, 1973). Após a mensuração, as fibras musculares foram distribuídas em classes, na dependência de seu diâmetro (<20 μ m; entre 20 μ m e 50 μ m; >50 μ m), de acordo com Almeida et al. (2008). Essa classificação das fibras permite avaliar o grau de crescimento hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares.

5.4 Obtenção das seqüências gênicas parciais da miogenina, miostatina e IGF-I

Em espécies brasileiras de peixes, como o pacu, não há estudos que descrevam a expressão quantitativa de genes que controlam o crescimento muscular, como os MRFs, a miostatina e o IGF-I. Antes da análise quantitativa da expressão gênica, foi necessário obter as

sequências desses genes expressos na musculatura do pacu. Nesse estudo, foram obtidas as seqüências gênicas parciais da miogenina, miostatina e IGF-I. As sequências gênicas parciais da miogenina e miostatina foram obtidas no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME) e no Laboratório de Genômica Integrativa (LGI) do Departamento de Morfologia, do Instituto de Biociências, da UNESP-Botucatu. A sequência gênica parcial do IGF-I foi obtida, durante realização de estágio no exterior, no Laboratório de Anatomia e Fisiologia do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias da Universidade de Pádua, na cidade de Pádua-Itália. A metodologia utilizada para a obtenção da sequência do gene IGF-I está descrita no anexo 1.

5.4.1 Obtenção das sequências parciais dos genes miogenina e miostatina

Foram utilizadas as seguintes metodologias:

5.4.1.1 Extração do RNA total

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

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

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

O RNA total obtido foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (*Nanodrop Technologies* - EUA) a 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi confirmada pela obtenção da razão 260/280 nm, aproximadamente, igual a 2.0. A qualidade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese de uma alíquota de 1 µL de cada amostra, em gel de agarose 1%, a 110 volts por 1h30. Após a corrida, o gel foi corado com *SYBR Safe (Life Technologies* - EUA), durante 40 minutos, e a integridade das amostras foi confirmada pela visualização das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

5.4.1.2 Tratamento do RNA com DNase

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

5.4.1.3 Transcrição Reversa (RT) do RNA total

Para a reação de RT do RNA total, foi utilizado o *High Capacity cDNA Archive Kit* (*Life Technologies* - EUA). A cada reação de RNA total tratado, foram adicionados 10 μ L de Tampão para Transcrição Reversa (10X), 4 μ L de dNTPs (25X), 10 μ L de *random primers* (10X), 2.5 μ L da enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase* (50 unidades/ μ L), 2.5 μ L de Inibidor de RNases (40 unidades/ μ L) (*Ambion, Life Technologies* - EUA) e volume de água

ultrapura suficiente para completar 100 μ L de solução. Cada amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 42°C por duas horas e, em seguida, estocadas em freezer a -20°C.

5.4.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para a obtenção das sequências parciais dos genes miogenina e miostatina, foram realizadas as reações de RT-PCR tradicional, conforme as instruções descritas no protocolo *Platinum PCR SuperMix (Life Technologies* - EUA). Alíquotas de 1 μ L da reação de RT (cDNA) foram adicionadas a 24 μ L de uma mistura contendo 22.5 μ L de *Platinum PCR SuperMix*, 0.5 μ L de *primer* senso (10 μ M), 0.5 μ L de *primer* antisenso (10 μ M) e 0.5 μ L de água ultrapura, totalizando 25 μ L de reação.

Cada amostra foi submetida às seguintes condições: denaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de denaturação por 30 segundos, com temperatura de anelamento dos *primers* a 55°C durante 30 segundos e 1 minuto de extensão a 72°C, seguidos de uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os *primers* utilizados para a amplificação do cDNA, referente aos genes miogenina e miostatina, foram construídos a partir das sequências nucleotídicas codificantes desses genes descritas em diferentes espécies de vertebrados, incluindo os teleósteos. Para cada gene, foram desenhados vários conjuntos de *primers* senso e antisenso, utilizando-se o *software* Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2001). Os *primers* foram sintetizados comercialmente (*Life Technologies* - EUA) e diluídos em água ultrapura para uma concentração final de 10 µM. Para cada gene, foram testadas todas as possíveis combinações entre os *primers* senso e antisenso adquiridos, variando diferentes parâmetros da reação, como a concentração de cDNA e *primers* e diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* ao cDNA-alvo.

Após o término dos ciclos da RT-PCR, 7 μ L de cada produto de reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1x (Tris - Ácido bórico - EDTA), a 110 volts por 1h30. Após a corrida, o gel foi corado com *SYBR Safe (Life Technologies* - EUA) durante 40 minutos e os produtos visualizados foram clonados e seqüenciados para confirmar a amplificação específica dos genes de interesse.

5.4.1.5 Clonagem e identificação dos insertos

A clonagem dos produtos referentes aos genes miogenina e miostatina foi realizada conforme as instruções do kit *pGEM-T Easy Vector System I* (*Promega Corporation* - EUA).

Para a reação de ligação dos fragmentos de cDNA ao plasmídeo, em um tubo esterilizado foi preparada a reação contendo 2 μ L do inserto de interesse, 1 μ L da enzima DNA ligase, 1 μ L de tampão de reação 10X, 1 μ L do plasmídeo *pGEM-T* (50 ng) e 5 μ L de água ultrapura. Essa solução foi misturada cuidadosamente com uma micropipeta e incubada à 4°C de 12 a 16 horas.

Para a reação de transformação, em um tubo esterilizado foram colocados 50 μ l de bactérias *Escherichia coli* competentes (acondicionadas a -80°C) e 10 μ L da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Os tubos foram mantidos a 4°C por 30 minutos, seguido de um choque térmico a 37°C por 45 segundos e nova incubação a 4°C por 2 minutos. Em cada amostra, foram adicionados 950 μ L de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7.5), à temperatura de 25°C, seguida de uma incubação a 37°C por 1 hora, sob agitação a 225 rpm. Os tubos foram centrifugados por 5 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O produto de transformação foi espalhado em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7.5), contendo 2 μ l de ampicilina (50 mg/mL de LB) e 50 μ L de X-Gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil-(-D-galactoside) - 50mg/mL], para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). As placas foram incubadas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37°C, por um período de 16 horas.

Para verificar a incorporação dos insertos de interesse nos clones obtidos, as colônias brancas (potencialmente portadoras do inserto de interesse) foram repicadas em meio sólido LB e submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nessa reação, foram utilizados os *primers* M13F (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') e M13R (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') que anelam nas regiões flanqueadoras do local de inserção do fragmento no plasmídeo. Os clones de interesse, depois de identificados, foram estocados em freezer a -80°C.

50

Para a PCR, em um tubo esterilizado foram adicionados uma fração de cDNA, obtido diretamente da colônia, 2.5 μ L de tampão de PCR 10X, 1.25 μ L (200 mM) de dNTPs, 1.25 μ L de primer M13F (10 μ M), 1.25 μ L de primer M13R (10 μ M), uma unidade de DNA polimerase e 18.5 μ L de água ultrapura, totalizando um volume final de 25 μ L. As condições da reação foram: denaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 34 ciclos a 95°C por 30 segundos (denaturação), 50°C por 1 minuto (anelamento dos *primers*) e 72°C por 2 minutos (extensão da fita de DNA), seguidos de um passo de extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os produtos de PCR dos clones foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X, a 110 V por 1h30 para confirmar a incorporação dos insertos, em cada amostra. Após a corrida, o gel foi corado com *SYBR Safe (Life Technologies* - EUA) por 40 minutos.

5.4.1.6 Reação de PCR de seqüenciamento

Após a confirmação da presença dos produtos de PCR, referentes aos genes miogenina e miostatina, em algumas colônias, um total de dez clones, para cada gene, foi seqüenciado. Para a reação de PCR de seqüenciamento, foi preparada uma solução contendo 1 μ L do produto de PCR dos clones, 2 μ L de primer senso (M13F) ou antisenso (M13R), na concentração de 3 μ M, e 2 μ L do pré-mix fornecido pelo kit *DYEnamic Terminator Cycle Sequencing* (*GE Healthcare Bio-Sciences Corporation* - EUA). Em seguida, essas amostras foram incubadas a 95°C por 2 minutos para a denaturação inicial, seguida de 35 ciclos com denaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento dos *primers* a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Para a limpeza (purificação) da reação de PCR de seqüenciamento, em cada amostra foram adicionados 2 μ L de acetato de sódio (4.5 mM) e 80 μ L de etanol 95%. Em seguida, cada amostra foi centrifugada por 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Seguida a centrifugação, o sobrenadante foi removido por aspiração e o pellet de cDNA (invisível) foi lavado com 400 μ L de etanol 70%. Essa amostra foi novamente levada à centrífuga a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido por aspiração e o pellet foi levado à estufa a 37°C por 1 hora, protegido da luz, até que secasse completamente. Após esse

período, cada amostra foi dissolvida em solução de formamida e *blue dextran (Formamide Loading Dye* 5:2).

A placa dupla de vidro do sequenciador foi limpa com álcool, antes da colocação do gel de poliacrilamida e, em seguida, colocada em forno de luz ultravioleta. O gel de poliacrilamida (RapidGeITM-XL6% - *GE Healthcare Bio-Sciences Corporation*, EUA) foi inserido na placa e polimerizado com irradiação de luz ultravioleta durante 3 minutos. A placa de vidro foi novamente limpa, para evitar erros de leitura no seqüenciamento, e o gel foi colocado no seqüenciador automático (Perking-Elmer ABI Prism 377 DNA Sequencer, *Life Technologies* - EUA) com as cubas imersas em tampão TBE 1X (Tris - Ácido bórico - EDTA).

As amostras de cDNA foram denaturadas a 80°C por 4 minutos, em termociclador, e colocadas imediatamente a 4°C. A voltagem (1400 volts) e a intensidade do laser de leitura das bases (100) foram determinadas no programa computacional e as linhas de leitura foram identificadas com o número correspondente das amostras. Cerca de 2 μ L de cada amostra foram aplicados na sua linha correspondente no gel. Em seguida, foram realizadas a corrida do gel e a leitura dos resultados.

5.5 Análise da expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e miostatina

A análise da expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina foi realizada pela RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). O RNA ribossomal 18S (RNAr 18S) foi utilizado como gene de referência para a normalização dos resultados de expressão dos genesalvo. Para cada gene, foi desenhado um conjunto de *primers* senso e antisenso, com base na respectiva sequência parcial codificante expressa na musculatura do pacu, utilizando-se o software *Primer Express* 3.0 (*Life Technologies* - EUA) (Tabela 1). **Tabela 1.** *Primers* utilizados na RT-PCR quantitativa em tempo real para a amplificação dos genes MyoD, miogenina, miostatina e do gene de referência RNA ribossomal 18S (RNAr 18S).

Gene	Seqüência do primer (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
MyoD	S: TACTACCCCGTCCTGGATCA	140
	A: GTCAGAGCCGCTTCAGTGTC	
miogenina	S: AGCGCAGCACATTGATGAAC	57
	A: TCCTCAGGATTTCCACTTTTGG	
miostatina	S: GACGGAAGGAGGCACATAAGAA	60
	A: CGTGACCCCAGCGTTCAC	
RNAr 18S	S: CGGAATGAGCGTATCCTAAACC	64
	A: GCTGCTGGCACCAGACTTG	

S: primer senso; A: primer antisenso

Os *primers* foram sintetizados comercialmente (*Life Technologies* - EUA) e diluídos em água ultrapura para uma concentração final de 5 µM.

A eficiência de cada conjunto de *primers* foi testada construindo-se curvas-padrão para os genes-alvo e o gene de referência (RNAr 18S), a partir de um *pool* de cDNA de todas as amostras, na ordem de diluição 1:2. Para cada amostra, a reação de amplificação foi constituída por 2 µL de um *pool* de cDNA (20 ng/µL), 12.5 µL de *Power SYBR Green Master Mix* 2.5X (*Life Technologies* - EUA) e 2 µL de cada primer (400 nM), em um volume final de 25 µL. Para cada gene, foram incluídos um controle negativo da PCR (amostra de cDNA substituída por água ultrapura) e um controle negativo para a reação de transcrição reversa (amostra substituída por mistura inicial contendo quantidades iguais de RNA de todas as amostras). As reações para cada gene foram realizadas, em duplicatas, no Sistema *Real Time* PCR 7300 (*Life Technologies* - EUA), utilizando-se as condições de termociclagem universal (configuradas no software): 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a corrida, foi analisada a curva de dissociação para confirmar a amplificação específica dos produtos de RT-qPCR de cada gene. Para cada reação de RT-qPCR, foram determinados, manualmente, os parâmetros *baseline* e *threshold*, gerando para cada amostra um ciclo *threshold* (Ct). O Ct corresponde ao ciclo da RT-qPCR no qual a fluorescência gerada cruza o limiar *threshold*. A partir das curvas-padrão construídas foi determinada a eficiência de amplificação de cada conjunto de *primers* de forma a obter um valor de $100\% \pm 5\%$, com os valores de inclinação das retas (*slope*) inclusos no intervalo de -3.32 a -3.4, de acordo com o *User Bulletin #2 (Applied Biosystems*, 2001).

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

Após a validação do Método do $\Delta\Delta$ Ct para todos os genes-alvo, a expressão gênica relativa, em cada animal, foi obtida a partir da construção de placas de reação contendo 2 µL de cDNA do respectivo animal, 12.5 µL de *Power SYBR Green Master Mix* 2.5X (*Life Technologies* - EUA) e 2 µL de cada primer (400 nM), em um volume final de 25 µL. Os parâmetros da reação foram os mesmos descritos na reação para teste de eficiência dos *primers*, descrito anteriormente. Cada placa de reação foi construída de modo a permitir a amplificação de um gene-alvo e do gene de referência, além de conter um controle negativo para a reação de PCR. Os valores de expressão obtidos para cada gene-alvo foram normalizados pelos valores obtidos para a expressão do gene de referência RNAr 18S. A estabilidade do gene de referência foi confirmada pela sua expressão constante entre todas as amostras (p = 0.56).

Para cada animal foi obtido o valor de Ct para o gene-alvo e o valor de Ct para o gene de referência a partir da média dos Cts de cada reação em duplicata. Para cada animal, foi calculado o valor de Δ Ct (Ct _{gene-alvo} – Ct _{gene de referência}). Todos os valores foram normalizados

pelo valor de Δ Ct do calibrador para obter o valor de $\Delta\Delta$ Ct (Δ Ct _{obtido para cada animal} - Δ Ct _{calibrador}). O calibrador é definido como uma amostra utilizada como base de comparação dos resultados, podendo representar um animal não tratado ou um estágio particular de desenvolvimento animal (*User Bulletin #2, Applied Biosystems*, 2001). Pelo Método do $\Delta\Delta$ Ct, a quantificação relativa da expressão gênica é dada pela fórmula 2^{- $\Delta\Delta$ CT}, expressa em unidades arbitrárias (*User Bulletin #2, Applied Biosystems*, 2001) e normalizada pelo gene de referência RNAr 18S.

5.6 Análise estatística dos resultados

Os resultados referentes ao peso e comprimento total dos animais foram expressos como valor mínimo, mediana e valor máximo. Os dados referentes à freqüência de fibras brancas em cada classe de diâmetro e à expressão gênica relativa da MyoD, miogenina, miostatina e IGF-I foram expressos como valor mínimo, 1º quartil, mediana, 3º quartil e valor máximo. Para a análise de todos os resultados foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado com o teste de comparações múltiplas de Dunn. Uma diferença de 5% (p<0,05) foi considerada estatisticamente significativa.

6. Referências gerais

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., Estrada, M.P., 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. J. Biotechnol. 119, 324-331.
- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L.E., Dal Pai-Silva, M., 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. J. Fish. Biol. 67, 1-12.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A.M., Bergot, P., 1997. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth rate. J. Fish Biol. 50, 1285-1302.
- Alexander, R., 1969. The orientation of muscle in the myomers of fishes. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 49, 263-290.
- Alfei, L., Onali, A., Spanò, L., Colombari, P.T., Altavista, P.L., De Vita, R., 1994. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L). Eur. J. Histochem. 38, 151-162.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. Micron 39, 1306-1311.
- Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. Micron 41, 997-1004.
- Armstrong, R.B., Pheleps, R.O., 1984. Muscle fiber type composition on the rat hindlimb. Am. J. Anat. 171, 259-272.
- Armstrong, R.B., Saubert, C.W., Seeherman, H.J., Taylor, C.R., 1982. Distribuition of fiber types in locomotory muscles of dogs. Am. J. Anat. 163, 87-98.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- Ashby, P.R., Pincon-Raymond, M., Harris, A.J., 1993. Regulation of myogenesis in paralysed muscles in the mouse mutants peroneal muscular atrophy and muscular dysgenesis. Dev. Biol. 156, 529–536.
- Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Aquaculture 237, 251-267.
- Bancroft, J.D., Steven, A., 1990. Theory and Practice of Histological Techniques, third ed. Churchill Livingstone, New York.
- Barton, E.R., 2006. The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 31, 791-797.
- Bernardino, G., Colares de Melo, J.S., 1989. Estimativa do tamanho mínimo da amostra de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em monocultura, em viveiros experimentais. Boletim Técnico do CEPTA 2:75-89.
- Blackwell, T., Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. Science 250, 1104-1110.
- Blagden, C.S., Currie, P.D., Inghan, P.W., Hughes, S.M., 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. Genes Dev. 11, 2163-2175.
- Bone, Q., 1966. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 46, 321-349.

- Bone, Q., 1978. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology. Academic Press, New York, pp. 361-424.
- Bone, Q., 1989. Evolutionary patterns of axial muscle systems in some invertebrates and fish. Am. Zool. 29, 5-18.
- Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and Insulin-Like Growth factors during myogenesis in atlantic salmon. PLoS ONE 5, e11100.
- Campion, D.R., 1984. The muscle satellite cells. Int. Ver. Cytol. 87, 225-251.
- Castillo, J., Ammendrup-Johnsen, I., Codina, M., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2006. IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290, 1683-1690.
- Castillo, J., Codina, M., Martínez, M.L., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2004. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 286, 935-941.
- Castagnolli, N., Cyrino, J.E.P., 1986. Piscicultura nos Trópicos. Ed. Manole, São Paulo.
- Christ, B., Ordahl, C.P., 1995. Early stages of chick somite development. Anat. Embryol. 191, 381-396.
- Cole, N.J., Hall, T.E., Chrsitopher, I.M., Chapman, M.A., Kobiyama, A., Nihei, Y., Watabe, S., Johnston, I.A., 2004. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. J. Exp. Biol. 207, 4239-4248.
- Currie, P.D., Ingham, P.W., 2001. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: Johnston IA (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 1-17.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). Anat. Histol. Embriol. 29, 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.I., Rodrigues, A.C., 1995. Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* (Boch, 1795). Ann. Anat. 177, 65-70.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C., 2003. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. Arch. Fish Mar. Res. 50, 149-160.
- Devoto, S.H., Melançon, E., Eisen, J.S., Westerfield, M., 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. Development 122, 3371-3380.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W., 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol. 230, 579-582.
- Du, S.J., Devoto, S.H., Westerfield, M., Moon, R.T., 1997. Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the *hedgehog* and TGF-β gene families. J. Cell Biol. 139, 145-156.
- Dubowitz, V., Brooke, M.H., 1973. Muscle biopsy: A modern approach. WB Saunders Company, London.
- Edmonson, D.G., Olson, E.N., 1993. Helix loop helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. J. Bio. Chem. 268, 755-758.
- Edmonson, D.G., Lyons, G.E., Martin, J.F., Olson, E.N., 1994. *Mef2* gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. Development 120, 1251-1263.
- Eggington, S., Johnston, I.A., 1982. Muscle fiber differentiation and vascularisation in the juvenile European eel (*Anguilla anguilla* L). Cell Tissue Res. 222, 563-577.
- Fauconneau, B., Paboeuf, G., 2001. Muscle satellite cells in fish. In: Johnston IA (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 73-98.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., Coolican, S.A., 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. Endocr. Rev. 17, 481-517.

- Florini, J.R., Ewton, D.Z., Magri, K.A., Mangiacapra, F.J., 1993. IGFs and muscle differentiation. Adv. Exp. Med. Biol. 343, 319-326.
- Flutcher, B.E., Phillips, J.L., Powell, J.A., Andrews, S.B., Daniels, M.P., 1992. Coordinated development of myofibrils sarcoplasmic reticulum and transverse tubules in normal and dysgenic mouse skeletal muscle, in vivo and in vitro. Dev. Biol. 155, 266-280.
- Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y., Hosoda, Y., Obinata, T., Nabeshima, Y., 1990. Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors. J. Biol. Chem. 265, 15219-15223.
- Funkenstein, B., Rebhan, Y., 2007. Expression, purification, renaturation and activation of fish myostatin expressed in *Escherichia coli*: facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. Protein Expr. Purif. 54, 54-65.
- Funkenstein, B., Balas, V., Skopal, T., Radaelli, G., Rowlerson, A., 2006. Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. Tissue and Cell 38, 399-415.
- Galloway, T.F., Bardal, T., Kvam, S.N., Dahle, S.W., Nesse, G., Randøl, M., Kjørsvik, E., Øivind, A., 2006. 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. J. Exp. Biol. 209, 2432-2441.
- Godoy, M.P., 1975. Peixes do Brasil: subordem Characoidei: bacia do rio Mogi-Guaçu. Franciscana Piracicaba.
- Greer-Walker, M., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. J. Fish. Biol. 7, 295-300.
- Gregory, D.J., Waldbieser, G.C., Bosworth, B.G., 2004. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species. Anim. Genet. 35, 425-430.
- Grobet, L., Royo Martin, L.J., Poncelet, D.A., 1997. Deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. Nat. Genet. 17, 71-74.
- Halevy, O., Cantley, L.C., 2004. Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells. Exp. Cell Res. 297, 224–234.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Nucl. Acids Symp. Ser. 41, 95-98.
- Harris, A.J., 1988. Critical periods in the development of motoneurons. Rev. Neurol. 144, 643-647.
- Hernandez, R.A., 1989. Cultivo de Colossoma. Guadalupe, Bogotá.
- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H., 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellunge, *E masquinongy* (Mitchill). J. Fish. Biol. 28, 393-401.
- Hopwood, N.D., Pluck, A., Gurdon, J.B., 1989. MyoD expression in the forming somites is na early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. EMBO J. 8, 3409-3417.
- Huxley, H.E., 1969. The mechanism of muscular contraction. Science 164, 1356-1365.
- Huxley, H.E., 1971. The structural basis of muscular contraction. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 178, 131-149.
- Huxley, H.E., 1983. Molecular basis of contraction in cross-striated muscles and relevance to motile mechanisms in other cells. In: Stracher A (Ed.), Muscle and Nonmuscle Motility. Academic Press, London.
- IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2007. Estatística da pesca 2005. IBAMA, Brasília.
- Ji, S.Q., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.L., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F.S., Spurlock, M.E., 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specifity and developmental and postnatal regulation. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 44, 1265-1273.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mar. Biotechnol. 7, 576-587.

- Johansen, K.A., Overturf, K., 2006. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout. Comp. Bioch. Physiol. 144, 119–127.
- Johnston, I.A., 1981. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. Cell Tissue Res. 214, 369-379.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. Aquaculture 177, 99-115.
- Johnston, I.A., Davison, W., Goldspink, G., 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. J. Comp. Physiol. 114, 203-216.
- Johnston, I.A., Vieira, V.L.A., Abercromby, M., 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring, *Clupea harengus*. J. Exp. Biol. 198, 1389-1403.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickel, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., Burt, M.L., 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). J. Exp. Biol. 203, 2539-2552.
- Jones, J.I., Clemmons, D.R., 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr. Rev. 16, 3-34.
- Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., Cabello, G., 2003. Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. Exp. Cell Res. 286, 263-275.
- Joulia-Ekaza, D., Cabello, G., 2007. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. Curr. Opin. Pharmacol. 7, 310-315.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., Bass, J.J., 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in doublemuscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Res. 7, 910-916.
- Katz, S.L., 2002. Design of heterothermic muscle in fish. J. Exp. Biol. 205, 2251-2266.
- Kelly, A.M., 1971. Sarcoplasmatic reticulum and T tubules in differentiating rat skeletal muscle. J. Cell Biol. 49, 335-344.
- Kilarski, W., 1990. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilis rutilis* (L). J. Fish Biol. 36, 353-362.
- Kim, J.A., Jonsson, C.B., Calderone, T., Unguez, G.A., 2004. Transcription of MyoD and myogenin in the non-contractile electrogenic cells of the weakly electric fish, *Sternopygus macrurus*. Dev. Genes Evol. 214, 380–392.
- Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, T.T., Wu, J.L., Chen, J.C., Lu, J.K., 2007. Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Mar. Biotechnol. 9, 20-32.
- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, Y., Suetake, H., Johnston, I.A., Watabe, S., 1998. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. J. Exp. Biol. 201, 2801-2813.
- Kocabas, A.M., Kucuktas, H., Dunham, R.A., Liu, Z., 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Biochim. Biophys. Acta. 1575, 99-107.
- Kollias, H.D., McDermott, J.C., 2008. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. J. Appl. Physiol. 104, 579-87.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. Comp. Biochem. Physiol. 110, 3-20.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Booms, G.H.R., Lemmens, C.J.J., Osse, J.W., 1991. Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). Am. J. Anat. 192, 418-424.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5,150-163.

- Lai, K.M., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, N.A., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2004. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. Mol. Cell Biol. 24, 9295-9304.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. J. Biol. Chem. 277, 49831-49840.
- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. Cell 58, 823-831.
- Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D., Weintraub, H., 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires heterooligomerization with E12/E-47- like proteins *in vivo*. Cell 66, 305-315.
- Lee, S.J., 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 20, 61-86.
- Lee, S.J., McPherron, A.C., 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98, 9306-9311.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., Roberts, C.T.Jr., 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. Endocr. Rev. 16,143-163.
- Lin, Z.Y., Dechesne, C.A., Eldridge, J., Paterson, B.M., 1989. An avian muscle factor related to MyoD1 activates muscle-specific promoters in nonmuscle cells of different germ-layer origin and in BrdU-treated myoblasts. Genes Dev. 3, 986-996.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25, 402-408.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., Pabo, C.O., 1994. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. Cell 77, 451-459.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., Patarnello, T., 2001a. Characterization of the myostatin gene in the gillhead seabream (*Sparus aurata*): sequence and genomic structure, and expression pattern. Mar. Biotechnol. 3, 224-230.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G., Patarnello, T., 2001b. A novel second myostatin gene is present in teleost fish. FEBS Lett. 509, 36-40.
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Bioph. Biochem. Cytol. 9, 493-494.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.-J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member. Nature 387, 83-90.
- Macqueen, D.J., Robb, D., Johnston, I.A., 2007. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J. Exp. Biol. 210, 2781-94.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. Comp. Bioch. Physiol. 129, 207-219.
- Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem. Cell Biol. 73, 723-732.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 1553-1562.
- Murre, C., Bain, G., Van Dijk, M.A., Engel, I., Furnari, B.A., Massari, M.E., Matthews, J.R., Quong, M.W., Rivera, R.R., Stuiver, M.H., 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. Biochim. Byophys. Acta 1218, 129-135.
- Murre, C., Mccaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Yan, J.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell 58, 537-544.
- Musarò, A., Mccullagh, K.J., Naya, F.J., Olson, E.N., Rosenthal, N., 1999. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. Nature 400, 581-585.

- Nicoll, C.S., Rodgers, B.D., Kelley, K.M., 1999. Hormonal regulation of growth and development of nonmammalian vertebrates. In: Kostyo, J.L., Goodman, H.M. (Eds.), Handbook of Physiology. The endocrine systems: hormonal control of groth. Oxford University Press, New York, pp. 73-98.
- Ontell, M., Kozeka, K., 1984. The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. Am. J. Anat. 171, 133–148.
- Østbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., Andersen, Ø., 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. Eur. J. Biochem. 268, 5249-5257.
- Ott, M. –O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., Buckingham, M., 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. Development 111, 1097-1107.
- Otto, A., Patel, K., 2010. Signalling and the control of skeletal muscle size. Exp. Cell Res. 316, 3059-3066.
- Patruno, M., Maccatrozzo, L., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2006. Cloning and expression of insulinlike growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 137, 137–151.
- Patruno, M., Radaelli, G., Mascarello, F., Candia Carnevali, M.D., 1998. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. Anat Embryol. 198, 487-504.
- Patruno, M., Caliaro, F., Maccatrozzo, L., Sacchetto, R., Martinello, T., Toniolo, L., Reggiani, C., Mascarello, F., 2007. Myostatin shows a specific expression pattern in pig skeletal and extraocular muscles during pre- and post-natal growth. Differentiation 76, 168-81.
- Patruno, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). Cell Tissue Res. 331, 643-58.
- Petrere Jr., M., 1989. River fisheries in Brazil: a review. Regulated Rivers: Research and Management 4, pp.1-16.
- Pownall, M.E., Emerson, C.P., 1992. Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. Dev. Biol. 151, 67-79.
- Pozios, K.C., Ding, J., Degger, B., Upton, Z., Duan, C., 2001. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280, 1230–1239.
- Radaelli, G., Rowlerson, A., Mascarello, F., Patruno, M., Funkenstein, B., 2003. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. Cell Tissue Res. 311, 239-50.
- Reinecke, M., Collet, C., 1998. The phylogeny of the insulin-like growth factors. Int. Rev. Cytol. 183, 1–94.
- Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., Loffin-Cueni, D., 1997. Insulin like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene sequence, tissue expression, and cellular localization. Endocrinology 138, 3613–3619.
- Rescan, P.-Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., 1995. A gene of homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and *in vitro* during the conversion of myosatellite cells to myotubes. FEBS Lett. 362, 89-92.
- Rescan, P.-Y., Jutel, I., Rallière, C., 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 204, 3523-3529.
- Rescan, P.-Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., Fauconneau, B., 1994. Identification of a muscle factor related to MyoD in fish species. Biochim. Biophys. Acta 1218, 202-204.
- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M., Devesa, J., 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282, 993-999.

- Roberts, S.B., Goetz, F.W., 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. FEBS Lett. 491, 212-216.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 129, 597-603.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., Levine, M.A., 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. Endocrinology 142, 1412-1418.
- Rome, L.C., Funke, R.P., Alexander, R.M., Lutz, G., Aldridge, H., Scott, F., Freadman, M., 1988. Why animals have different muscle fibre types. Nature 335, 824-827.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 103-139.
- Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G., Veggetti, A., 1995. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L.): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. J. Muscle Res. Cell. Motil. 16, 223–236.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- Rudnicki, M.A., Jaenish, R., 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. Bioessays 17, 203-209.
- Sänger, A.M., 1992. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. Environ. Biol. Fishes 33, 97-104.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press London, pp. 187-250.
- Sänger, A.M., Kim, Z.S., Adam, H., 1990. The fine structure of muscle fibers of roach, *Rutilus rutilus* (L.), and chub, *Leusciscus ceplhalus* (L.), Cyprinidae, Teleostei: interspecific differences and effects of habitat and season. J. Fish Biol. 36, 205-213.
- Schiaffino, S., Margreth, A., 1969. Coordinated development of the sarcoplasmatic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. J. Cell Biol. 41, 855-875.
- Schwander, J.C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E.R., 1983. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. Endocrinology 113, 297-305.
- Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J., Bass, J.J., 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. J. Cell Physiol. 180, 1-9.
- Sinha-Hikim, I., Roth, S.M., Lee, M.I., Bhasin, S., 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, 197-205.
- Sjögren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Törnell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., Ohlsson, C., 1999. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 7088-7092.
- Squassoni, G.H., 2010. Avaliação econômica e produtiva de tilapia do Nilo, revertida e não revertida, na fase de recria. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, pp. 41.
- Steinbacher, P., Haslett, J.R, Obermayer, A., Marschallinger, J., Bauer, H.C., Sanger, A.M, Stoiber, W., 2007. MyoD and Myogenin Expression During Myogenic Phases in Brown Trout: A Precocious Onset of Mosaic Hyperplasia Is a Prerequisite for Fast Somatic Growth. Dev. Dyn. 236, 1106–1114.

- Stoiber, W., Sänger, A.M., 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. Anat. Embryol. 194, 569-579.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R., 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 275, 40235-40243.
- Ticho, B.S., Stainier, D.Y.R., Fishman, M.C., Breitbart, R.E., 1996. Three zebrafih MEF2 genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos. Mech. Dev. 59, 205-218.
- Urbinati, C.U., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B. & Gomes, L.C. (Eds.), Espécies nativas para a psicultura no Brasil. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 225-255.
- van Raamsdonk, W., Pool, C.W., te Kronnie, G., 1978. Differentiation of muscle fiber types in the teleost *Brachydanio rerio*. Anat. Embryol. 153, 137-155.
- van Raamsdonk, W., Tekronnie, G., Pool, C.W., van de Laarse, W., 1980. An immune histochemical and enzymic characterization of the muscle fibres in myotomal muscle of the teleost *Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan. Acta Histochem. 67, 200-216.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapollo, P.A., 1990. Hyperplastic and hypertophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax:* an ultrastructural and morphometric study. Anat. Embryol. 182, 1-10.
- Vong, Q.P., Chan, K.M., Cheng, C.H., 2003. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. J. Endocrinol. 178, 513-521.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. J. Fish Biol. 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press London, pp. 19-41.
- Weatherley, A., Gill, H.S., 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. Experientia 41, 353-354.
- Weatherley, A., Gill, H., 1989. The role of muscle in determination growth and size in teleost fish. Experientia 45, 875-878.
- Weatherley, A., Gill, H., Lobo, A.F., 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. J. Fish Biol. 33, 851-859.
- Weinberg, E.S., Allende, M.L., Kelly, C.S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O.G., Grunwald, D.J., Riggleman, B., 1996. Developmental regulation of zebrafish MyoD in wildtype, *no tail* and *spadetail* embryos. Development 122, 271-280.
- Weintraub, H., 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. Cell 75, 1241–1244.
- Wilkes, D., Xie, S.Q, Stickland, N.C., Alami-Durante, H., Kentouri, M., Sterioti, A., Koumoundouros, G., Fauconneau, B., Goldspink, G., 2001. Temperature and myogenic factor transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Exp. Biol. 204, 2763–2771.
- Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S., Lee, S.J., 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 15842-15846.
- Xu, C., Wu, G., Zohar, Y., Du, S.J., 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. J. Exp. Biol. 206, 4067-4079.
- Xu, P., Tan, X., Zhang, Y., Zhang, P.J., Xu, Y., 2007. Cloning and expression analysis of myogenin from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and promoter analysis of muscle-specific expression. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 147, 135–145.
- Ye, H.Q., Chen, S.L., Sha, Z.X., Liu, Y., 2007. Molecular cloning and expression analysis of the myostatin gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*). Mar. Biotechnol. 9, 262-272.

- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C., 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. J. Morphol. 229, 71-81.
- Zhang, Y., Tan, X., Zhang, P.J., Xu, Y., 2006. Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis. Mar. Biotechnol. 8, 139-148.
- Zimmerman, A.M., Lowery, M.S., 1999. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). J. Exp. Zoo. 284, 299-308.

7. Resultados

7.1 Análise das sequências nucleotídicas da miogenina e miostatina

A seqüência parcial da miogenina foi obtida utilizando-se os *primers* senso (5'-GCTTACAGGGGGGATTTGATC-3') e antisenso (5'-TGGAGCTTTTYGAGACCAAC-3') desenhados com base nas seqüências codificantes de *Cyprinus carpio* (número de acesso no Genbank: AB012881.1) e *Ictalurus furcatus* (número de acesso no Genbank: AY540993.1), respectivamente. Para a obtenção da seqüência parcial da miostatina, foram desenhados *primers* senso (5'-TTCTCCTTCAGCCCGAAGAT-3') e antisenso (5'-GGGATCTTGCCGTAGATGAT-3') a partir das seqüências codificantes de *Ictalurus furcatus* (número de acesso no Genbank: AY540992.1).

Os produtos de RT-PCR referentes aos genes miogenina e miostatina, visualizados em gel de agarose, foram clonados em bactérias *E. coli*. A incorporação dos insertos, em cada amostra, foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X, a 110 V por 1h30, dos produtos de PCR dos clones. Após a corrida, o gel foi corado com *SYBR Safe* (*Life Technologies* - EUA) por 40 minutos. Os clones contendo o inserto de interesse apresentaram peso de molecular de 200 pares de bases (correspondente ao peso molecular do plasmídeo) acrescido do peso molecular de cada produto de PCR.

Para cada gene, foram obtidas as seqüências nucleotídicas dos dez clones selecionados contendo os insertos referentes aos produtos de PCR da miogenina e miostatina. Essas següências foram alinhadas, utilizando-se como ferramentas os softwares Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) e Molecular Evolutionary Genetics Analysis – MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004). Para cada gene, esse alinhamento revelou uma alta similaridade entre as sequências obtidas dos clones. Essas sequências foram submetidas ao banco de dados BLASTN (Altschul et al., 1997) do site NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para confirmar a sua similaridade com as sequências dos genes miogenina e miostatina previamente publicadas e expressas em diferentes vertebrados, incluindo teleósteos. Para cada gene, o alinhamento das següências dos clones resultou em uma sequência consenso parcial para cada gene. Essas sequências foram dados submetidas à publicação no banco de GenBank do site NCBI (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore*). Os números de acesso para as sequências da miogenina e miostatina são FJ810421 e HM561964, respectivamente.

Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth

Fernanda Losi Alves de Almeida ^{a,b}, Nabila Scabine Pessotti ^a, Danillo Pinhal ^a, Carlos Roberto Padovani ^c, Natália de Jesus Leitão ^d, Robson Francisco Carvalho ^a, Cesar Martins ^a, Maria Célia Portella ^d, Maeli Dal Pai-Silva ^e.

^a UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil;

^b UNICAMP, Institute of Biology, Department of Anatomy, Cellular Biology and Physiology and Biophysics, 13084-971, Campinas, São Paulo, Brazil

^c UNESP, Department of Biostatistics, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil

^d UNESP, College of Agricultural and Veterinarian Sciences and CAUNESP, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil

^e UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology and CAUNESP, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil

Publicado no periódico Micron, 41: 997-1004, 2010

Abstract

Skeletal muscle growth is regulated by differential expression of myogenic regulatory factors (MRFs). We evaluated hyperplasia, hypertrophy and quantitative expression of MRFs MyoD and myogenin in 45, 90, 180, and 400 days post- hatching (dph) and adult pacu (Piaractus mesopotamicus) skeletal muscle. Transverse sections of white dorsal muscles were obtained to evaluate hypertrophy and hyperplasia. MyoD and myogenin gene expression was determined by reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RTqPCR). Pacu skeletal muscle had similar morphology at all stages. The highest and the lowest frequencies of fiber diameters <20µm were found at the 45 dph and adult stages, respectively. Their frequency was similar in the 90, 180, and 400 dph stages. The highest percentage of >50µm diameter fibers were found in 180 and 400 dph, and adult fish. Hyperplasia was the main mechanism observed in pacu skeletal muscle growth at 45 dph; this declined through 90, 180, and 400 dph and remained low in adult fish; the latter presented hypertrophy as the main mechanism responsible for skeletal muscle growth. The high frequencies of 20-50µm diameter fibers at 90, 180, and 400 dph can be related to intense hypertrophy. The mRNA levels for MyoD and myogenin were similar in 45, 90, and 400 dph and adult fish, peaking at 180 dph. The high MyoD expression at 180 dph can be related to intense myoblast proliferation and hyperplasia, while high myogenin expression can be related to intense myoblast differentiation and fusion during hypertrophy. MyoD and myogenin expression patterns in adults can respectively be associated with myoblast proliferation and differentiation, which both contribute to hypertrophy. Differential MyoD and myogenin expression in pacu white muscle probably is associated with differences in growth patterns during the stages analyzed. In this study, the 180 dph pacu could represent an interesting phase to investigate suitable strategies in commercial fish production focusing on skeletal muscle growth improvement to raise healthy, fast-growing fish.

Keywords: Piaractus mesopotamicus; skeletal muscle growth; hyperplasia; hypertrophy; myogenic regulatory factor; quantitative gene expression.

1. Introduction

Skeletal muscle makes up 40–60% of body mass in most fishes. As well as being a specific mechanical adaptation to aquatic life (Bone, 1978), this muscle mass is also a major protein source for man (Weatherley and Gill, 1985).

Fish skeletal muscle is predominantly composed of white muscle, which never comprises less than 70% of the bulk of myotomal muscle and constitutes the edible part of the fish (Zhang et al., 1996). Increasing body size in fish is mainly due to the growth of white muscle fibers (Zimmerman and Lowery, 1999). White muscle is made up glycolytic metabolism and fast-contracting muscle fibers (Driedzic and Hochachka, 1976) used in fast swimming such as predation and escape behavior (Altringham and Johnston, 1988). Red muscle forms a thin superficial layer, generally making up less than 30% of total musculature (Greer-Walker and Pull, 1975; Hoyle et al., 1986; Luther et al., 1995). Red muscle fibers display aerobic metabolism and foraging (Bone, 1966; Johnston et al., 1977). There is an intermediate layer between red and white musculature which has intermediate characteristics (Sänger and Stoiber, 2001).

Fish muscle growth is a plastic mechanism involving populations of myogenic precursor cells, also called adult myoblast or myosatellite cells (Johnston, 1999). These cells provide the essential nuclei for new muscle fiber formation (hyperplasia) and hypertrophy (Koumans and Akster, 1995). During hypertrophic growth, as fibers expand they absorb myoblast nuclei in order to maintain a relatively constant ratio between the nucleus and the cytoplasm (Koumans et al., 1994). In hyperplastic growth, new fibers form on the surface of existing fibers by myoblasts that fuse to form multinucleated myotubes (Johnston, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001). The relative contributions of hypertrophy and hyperplasia to muscle growth vary markedly during ontogeny (Greer-Walker, 1970; Stickland, 1983; Weatherley et al., 1979, 1980a, 1980b), in different species (Greer-Walker, 1970; Weatherley and Gill, 1984; Weatherley et al., 1983). For example, in large fast-growing fishes, that have non-determinated growth, hyperplasia is particularly active during the larval and juvenile stages (Weatherley and Gill, 1984) and continues in the adult stage past the age of sexual

maturity (Zimmerman and Lowery, 1999). However, in small slow-growing species, that have determinated growth, hyperplasia during adult life is low and muscle growth primarily involves the hypertrophy of fibers formed in the embryo and during the early larval stage (Weatherley and Gill, 1984; Weatherley et al., 1988).

Hyperplasia and hypertrophy are regulated by the sequential expression of members of the the myogenic regulatory factors (MRFs) family which include MyoD, Myf5, myogenin, and the MRF4 (Watabe, 1999; Watabe, 2001). MRFs are transcription factors that share a highly conserved central region termed the basic helix-loop-helix (bHLH) domain (Edmonson and Olson, 1993) which mediates sequence-specific DNA binding called E-box, which is found in the promoters regions of many skeletal muscle-specific genes (Blackwell and Weintraub, 1990; Lassar et al, 1989; Murre et al., 1989).

The primary MRFs, MyoD and Myf5, direct proliferating myogenic progenitor cells towards a myogenic lineage, whereas the secondary MRFs, myogenin and MRF4, control the differentiation and fusion of myoblasts to form myofibers (Megeney and Rudnicki, 1995; Rudnicki and Jaenisch, 1995; Watabe, 1999).

Since myotomal muscle is the largest tissue fraction in most fish species (Weatherley et al., 1979), fish growth plasticity implies a corresponding responsiveness in muscle growth dynamics (Weatherley and Gill, 1984). However, little is known about factors that affect the balance between hyperplastic muscle development and hypertrophic muscle growth. Understanding molecular control of post-embryonic muscle growth in fish could contribute to successful aquaculture, which accounts for almost half of global fish production (Naylor et al, 2009).

The freshwater neotropical characid pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is extensively used in Brazilian aquaculture programs (Hernandez, 1989; Urbinati and Gonçalves, 2005). It is an omnivorous fish and one of the most important food species farmed in the Pantanal wetland areas of the Parana-Paraguay basin (Godoy, 1975; Oliveira et al, 2004). It is of immense economic importance in South American commercial fisheries (Goulding, 1981). It reproduces between October and March when temperatures are hot and rain is frequent (Romagosa et al., 1990). Pacu is a fast growing fish with a large final size and can reach 1.2 kg in its first culture year (Bernardino and Colares de Melo, 1989). This fast growth depends
on both hyperplastic and hypertrophic muscle growth mechanisms (Almeida et al., 2008; Dal Pai et al., 2000).

As there are few studies focusing on the molecular basis of muscle growth regulation in pacu, the aim of this study was to investigate contributions by hyperplasia and hypertrophy and the molecular control by MyoD and myogenin in pacu skeletal muscle during growth. In addition to its biological interest, the results could provide valuable information for producers on pacu skeletal muscle growth improvement.

2. Materials and methods

2.1 Fish samples

Juvenile (45, 90, 180, and 400 days post hatching [dph], n=8 at each growth stage), and adult (2 years, n=8) pacu were obtained from the Aquaculture Center, UNESP, in Jaboticabal, São Paulo State, Brazil. All samples were taken from the same group of fertilized eggs followed through development. They were sacrificed by an overdose of MS-222 anesthetic (tricaine methanensulfonate; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). Body weight (g) and total length (cm) were measured at each growth stage. This experiment was approved by the Ethics Committee of the Biosciences Institute, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

2.2 Morphological and morphometric analysis

White skeletal muscle fragments from the dorsal region (n=8 at each growth stage) were collected from all samples, immersed in n-hexane, cooled in liquid nitrogen (-159°C), and then stored at -80°C in a freezer until sectioning. Transverse 10 µm thick sections were obtained in a -20°C cryostat and stained with haematoxilin-eosin (HE) (Bancroft and Steven, 1990). This was used to evaluate muscle morphology and calculate fiber diameter (Dubowitz and Brooke, 1973).

Fiber cross-section diameter (μm) was estimated by measuring 100 white muscle fibers from each animal per group using a compound microscope attached to a computerized imaging analysis system (Leica Qwin, Wetzlar, Germany). The smallest fiber diameter was

used to avoid any errors that might have been caused by cross-sections not being completely true (Dubowitz and Brooke, 1973). White muscle fibers were grouped into three diameter classes: $<20\mu$ m, 20-50 μ m, and $>50\mu$ m, based on Almeida et al. (2008). Muscle fiber frequency was expressed as the number of fibers from each diameter class relative to the total number of fibers measured.

2.3 MyoD and Myogenin mRNA expression

Total RNA was isolated from dorsal white muscle samples using TRIzol Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Extracted RNA integrity was confirmed by electrophoresis on 1% agarose gel stained with SYBR Safe (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). The amount of RNA extracted was determined using a NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA purity was ensured by obtaining a 260/280nm OD ratio equal to 2.0. Total RNA (2µg) was treated with Amplification Grade Deoxyribonuclease I according to the protocol provided by Invitrogen (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Purified total RNA were reverse transcribed with random hexamer primers and a High-Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), in a total volume of 100µl, according to the manufacturer's protocol. A sample without reverse transcriptase (NoRT) was used to verify DNase treatment efficiency.

MyoD and myogenin gene expression levels at each growth stage were detected by reverse transcription quantitative real-time polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) using an ABI 7300 Real Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). A sample without cDNA template (NTC) was used to verify that the master mix was free from contaminants. Two microliters of cDNA ($20ng/\mu l$) then was amplified using Power SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), and 400 nM of each primer (Table 1), to yield a final volume of 25 µl. Real-time conditions were: 10 min at 95°C, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s, and annealing/extension at 60°C for 1 min. The 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene was used as a reference to normalize quantification of mRNA targets; this gene showed invariant expression across all samples (P=0.58).

Primer pairs for MyoD, myogenin, and 18S rRNA were designed with reference to the cDNA nucleotide sequence from *Piaractus mesopotamicus* using Primer Express 3.0 software (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) (Table 1).

Table 1

RT-qPCRs for target and reference genes were run in the same RT reaction using two replicates of each sample and reference gene. The fluorescence signal baseline and threshold were set manually for each detector (MyoD, Myogenin and 18S rRNA), generating a threshold cycle (Ct) for each sample. An amplification plot graphically displayed the fluorescence detected over the number of cycles that were performed.

The PCR efficiency of each individual assay was determined by creating standard curves for both targets and the reference gene. Standard curves were obtained by using serial dilutions (1:2) of sample cDNA and represented a semi-log regression line plot of Ct value vs. the logarithm of the starting amount of cDNA. The standard curve slope showed acceptable values, included between -3.4 and -3.32, as reported by Patruno et al., 2008.

Before using the $\Delta\Delta$ CT method (comparative method) for relative quantification (Livak and Schmittgen, 2001), a validation experiment was performed to demonstrate that the efficiency of the target amplification and that of the reference amplification were approximately equal, according to Applied Biosystems User Bulletin #2 (P/N 4303859). The absolute value of the slope of log input cDNA vs. Δ CT was < 0.1.

The difference between Ct values was calculated for each mRNA by taking the mean Ct of duplicate reactions and subtracting the mean Ct of duplicate reactions for the reference RNA measured on an aliquot from the same RT reaction (Δ Ct= Ct_{target gene} – Ct_{reference gene}). All samples were then normalized to the Δ Ct value of a calibrator sample to obtain a $\Delta\Delta$ Ct value (Δ Ct_{target} – Δ Ct_{calibrator}). The 45 dph stage was chosen as the calibrator sample to evaluate target gene putative differential mRNA expression relative to this stage.

For the comparative method, relative quantifications were calculated in relation to calibrator sample $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ concentrations, expressed in arbitrary units and normalized to reference gene (18S rRNA). Therefore, by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, data were recorded as the fold-change in gene expression normalized with the reference gene and relative to the

calibrator sample (Livak and Schmittgen, 2001). The specificity of each primer was confirmed by the presence of a single peak in the dissociation curve analysis.

2.4 Statistical analysis

Body weight and total length data were expressed as median, minimum, and maximum values. Non-parametric ANOVA (Krushal-Wallis Test), complemented with the Dunn Multiple Comparisons Test, was utilized to analyze weight and total length data (Zar, 1999). White muscle fiber diameter data were expressed as minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum values, using non-parametric variance analysis for repeated measurement models / independent groups model, complemented with the Dunn Multiple Comparisons Test (Zar, 1999).

Relative gene expression data were expressed as minimum, 1^{st} quartile, median, 3^{rd} quartile and maximum values, using the Kruskal-Wallis Test complemented by the Dunn Multiple Comparisons Test (Zar, 1999). Statistical significance level was set at *P*<0.05 for all analyses.

3. Results

3.1 Anatomical data

Body weight (g) and total length (cm) of the respective growth stages are presented in Table 2. These display direct proportionality with a high Spearman correlation coefficient (r=0.99; P<0.001).

Table 2

3.2 Morphological and morphometric analysis

HE stain showed white skeletal muscle making up most of the muscle mass in all growth stages. Muscle mass increased throughout the experimental period. This muscle

consisted of round or polygonal muscle fibers separated by a fine septum of connective tissue, the endomysium. Thicker septa of connective tissue separated muscle fibers into fascicles and made up the perimysium. Muscle fibers were distributed in a mosaic pattern characterized by fibers of different diameters (Figure 1).

Figure 1

The frequency distribution of $<20\mu$ m diameter white muscle fiber in 45 dph fish was significantly higher than in the other stages studied; the frequency was statistically similar among the 90, 180, and 400 dph stages. Adult fish had a lower frequency of $<20\mu$ m diameter fibers than the other stages (Figure 2a). The frequency distribution of $>50\mu$ m diameter fibers was significantly low in 45 dph and then increased through 90, 180, and 400 dph stages, remaining statistically similar, but higher than observed in 45 dph fish. The frequency of $>50\mu$ m diameter fibers were statistically similar in 180 and 400 dph and adult stages, but significantly higher than in 45 and 90 dph stages (Figure 2c). All stages showed a high frequency of 20-50 μ m diameter fibers (Figure 2b). However, adult fish 20-50 μ m and $>50\mu$ m muscle fiber frequencies were statistically similar (Figure 2b and 2c).

Figure 2

3.3 MyoD and Myogenin mRNA expression

RT-qPCR results showed that MyoD mRNA levels were similar in the 45 and 90 dph stages, peaked in the 180 dph, and then declined through the 400 dph stage, which was similar to those seen in the 45 and 90 dph stages. MyoD mRNA expression in adult fish remained at the same level as in the 45, 90, 180, and 400 dph stages (Figure 3a). Myogenin mRNA levels were similar in 45, 90, 400 dph, and adult fish, but peaked at 180 dph (Figure 3b).

Figure 3

According to the Wilcoxon non-parametric test, MyoD expression was always higher than myogenin expression in all growth stages. Median, minimum, and maximum gene expression levels at all studied stages were 3.33 (1.00; 14.69) for MyoD and 0.95 (0.08; 4.95) for myogenin. In addition, there was a strong direct association between the mRNA levels expression of MyoD and myogenin during the growth stages studied (Spearman correlation coefficient, r=0.897, P<0.001).

4. Discussion

This is the first study to report the quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in reference to hypertrophic and hyperplastic muscle growth mechanisms in pacu. We evaluated if during pacu skeletal muscle growth, analyzed by measuring white muscle fibers diameter, could occur a differential expression of MyoD and myogenin genes. We have observed that the MyoD and myogenin mRNA levels were similar in 45, 90, and 400 dph and adult fish, peaking at 180 dph.

4.1 Morphological and morphometric analysis

Morphological examination of skeletal muscle showed the majority of musculature to be composed of the white compartment, at all stages. This muscle mass has considerable economic significance (Zhang et al., 1996), similar to other fish species (Aguiar et al., 2005; Dal Pai-Silva et al., 2003a, 2003b; Fernandez et al., 2000). Although compartmentalized muscle fiber distribution is common in fish (Galloway et al., 1999; Johnston, 1999; Scapolo et al., 1988; Veggetti et al., 1993), fiber distribution pattern can vary among species (Dal Pai Silva et al., 1995a, 1995b; Te Kronnie et al., 1983) and growth stage (Dal Pai Silva et al., 2003a, 2003b). In our study, all stages showed muscle fibers in a mosaic distribution pattern characterized by different fiber diameters, as previously reported by Almeida et al. (2008) and Dal Pai et al. (2000); this characteristic has also reported in others fish species (Rowlerson and Veggetti, 2001).

Morphometric analysis of pacu skeletal muscle showed the highest and lowest frequencies of $<20\mu$ m diameter fiber in 45 dph and adult fish, respectively. The frequency distribution of $<20\mu$ m diameter muscle fibers was similar at 90, 180, and 400 dph fish. The presence of $<20\mu$ m diameter fibers indicates an active hyperplastic growth mechanism

(Rowlerson and Veggetti, 2001; Valente et al., 1999; Zimmerman and Lowery, 1999), which contributed to pacu skeletal muscle growth at 45 dph, followed by a decline through 90, 180, and 400 dph, and which was significantly low in the adult stage (Rowlerson and Veggetti, 2001; Valente et al., 1999; Zimmerman and Lowery, 1999).

Hyperplastic growth in teleosts mainly occurs in two waves (Rowlerson and Veggetti, 2001). The first is a continuation of embryonic myogenesis and takes place during part of larval life generating new fibers along a germinal or proliferative zone (Usher et al., 1994); it is responsible for thickening muscle mass in early developmental stages (Johnston et al., 2003; Rowlerson and Veggetti, 2001). This event is known as stratified hyperplasia and occurs in most fish species (Johnston, 1999). In pacu at 45 dph, muscle mass thickening was from muscle tissue growth by stratified hyperplasia, as reported by Assis et al. (2004). The second, mosaic hyperplasia, occurs in fish which grow to large sizes, such as the pacu, and new fiber production is found across the whole myotome. This results in a mosaic pattern of different fiber diameters, as seen in pacu skeletal muscle morphological analysis. Mosaic hyperplasia causes a large increase in fiber numbers during juvenile growth and is very important for commercial aquaculture species including pacu; this characteristic is not seen in small species (Rowlerson and Veggetti, 2001).

Fibers with diameter >50 μ m were less frequent in 45 dph fish than in other stages studied. This shows that muscle fiber hypertrophy was less intense than hyperplasia at this stage (Almeida et al., 2008; Dal Pai et al., 2000). In 90, 180, and 400 dph fish the frequency was statistically similar, while in 180 and 400 dph and adult stages, the highest percentage of >50 μ m diameter fibers denoted intense muscle fiber hypertrophy (Rowlerson and Veggetti, 2001; Valente et al., 1999). On the other hand, a high frequency of 20-50 μ m diameter fibers at 90, 180 and 400 dph also contributes to a muscle fiber hypertrophy, which contributes to the skeletal muscle growth during these stages.

New fiber recruitment during muscle growth stops when fish reach about 44% of their final size, although this can vary among specie; subsequent muscle growth is mainly driven by fiber hypertrophy (Johnston et al., 2003; Weatherley et al., 1988; Zimmerman and Lowery, 1999). Although the adult pacu used in this study were not indicative of their final size and the commercially accepted size of this fish is not fixed, our study showed that muscle

fiber recruitment in the adult stage was lower than seen in the juvenile stages, which includes 45, 90, 180 and 400 dph fish.

4.2. MyoD and Myogenin mRNA expression

In our study, mRNA levels for MyoD and myogenin were similar in 45, 90, 400 dph and adult fish stages, and peaked at 180 dph. The highest levels of MyoD and myogenin mRNA at the same development stage have also been described by Johansen and Overturf (2005) in rainbow trout.

The MRFs MyoD and myogenin gene expression could be related to the hyperplasia and hypertrophy in muscle growth, events that depend on activation, proliferation, and differentiation of adult myoblast or myosatellite cells (Johnston, 1999; Koumans and Akster, 1995). These processes are regulated by the sequential expression of the MRFs (Watabe, 1999; Watabe, 2001).

During skeletal muscle growth, MyoD directly controls proliferating undifferentiated myoblasts (myosatellite cells), whereas myogenin controls myoblast differentiation and fusion which form myofibers (Megeney and Rudnicki, 1995; Rudnicki and Jaenisch, 1995; Watabe, 1999). These proliferating cells provide the essential nuclei for new muscle fiber formation (hyperplasia) and hypertrophy (Koumans and Akster, 1995). The high MyoD expression at 180 dph could be associated with an intense myoblast proliferation which mainly contributes to the hyperplastic skeletal muscle growth, according to Johansen and Overturf (2005). On the other hand, the high myogenin expression at this stage may be related to an intense differentiation and fusion of myoblasts to existing myofibers during hypertrophy, as reported by Johansen and Overturf (2005). In this stage morphometric analysis showed similar frequencies of <20µm diameter muscle fibers which characterize hyperplastic muscle growth and >50µm diameter fibers which characterize hypertrophy (Rowlerson and Veggetti, 2001; Valente et al., 1999).

The MyoD and myogenin mRNA levels observed in adult were similar to those seen at 45, 90, 180, and 400 dph; this could reflect myoblast proliferation and differentiation, respectively, which contribute to hypertrophic muscle growth. In adult morphometric analysis revealed the lowest frequency of $<20\mu$ m diameter fibers indicating low hyperplasia, and high frequencies of 20-50 μ m and $>50\mu$ m fiber diameter revealing an intense hypertrophic muscle

growth mechanism; this has also been observed in other fish species (Aguiar et al., 2008; Johansen and Overturf, 2005). Although the high percentage of $<20\mu$ m at 45 dph indicates intense hyperplasia, this was not followed by a high MyoD mRNA level. It is possible that keeping these fish a long time in aquaculture tanks could have decreased their myoblast proliferation intensity and limited their skeletal muscle growth.

MyoD expression was higher than myogenin expression in pacu white skeletal muscle in all studied stages. This gene expression pattern was similar to that reported by Johansen and Overturf (2005) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Hughes et al. (1999) reported an accumulation of myogenin in rat slow fibers, while MyoD was found to be more concentrated in fast fibers. Rescan et al. (1995) showed that the red and white fibers in rainbow trout present different levels of myogenin mRNA accumulation because myogenin mRNA does not accumulate in white muscle fibers, but is more concentrated in red fibers. We suggest that the difference between MyoD and myogenin mRNA levels in pacu skeletal muscle could play a role in controlling fiber phenotype and fiber type-specific gene expression and the strong direct association between the mRNA levels expression of MyoD and myogenin during the growth stages studied could be related to the contributions of hyperplasia and hypertrophy mechanisms in pacu skeletal muscle growth.

In summary, the MyoD and Myogenin mRNA levels observed during pacu skeletal muscle growth could be associated with the hyperplastic and hypertrophic growth mechanisms. The differential MyoD and myogenin expression observed at 180 dph juvenile pacu could represent an interesting growth stage to investigate suitable strategies in commercial fish production, as different feeding protocols and application of growth factors focusing on skeletal muscle growth improvement, which is the most important component in terms of aquaculture. Pacu makes up 4.5% of Brazilian freshwater fisheries (IBAMA, 2007). In aquaculture, pacu and hybrid *P. mesopotamicus X Colossoma macropomum* are responsible for 11.1% of Brazilian production (IBAMA, 2007). Our results could provide information for both developmental biologists and those seeking to refine pacu musculature for aquaculture.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Proc. n° 06/60446-9 and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Proc. n° 309295/2006-8. It is part of a PhD Thesis which will be presented by FLAA to the Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

References

- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L.E., Dal Pai-Silva, M., 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. J. Fish Biol. 67(5), 1287-1298.
- Aguiar, D.H., Bock, C., Padovani, C.R., Dal Pai-Silva, M., 2008. Myod, Myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquacult. Res. 39, 1673-1679.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. Micron 39, 1306-1311.
- Altringham, J.D., Johnston, I.A., 1988. The mechanical properties of polyneuronally myotomal muscle fibres isolated from a teleost fish (*Myoxocephalus scorpius*). Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 412, 524-529.
- Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Aquaculture 237, 251-267.
- Bancroft, J.D., Steven, A., 1990. Theory and Practice of Histological Techniques. third ed. Churchill Livingstone, New York.
- Bernardino G., Colares de Melo, J.S., 1989. Estimativa do tamanho mínimo da amostra de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em monocultura, em viveiros experimentais. Boletim Técnico do CEPTA, 2:75-89.
- Blackwell, T., Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. Science 250, 1104-1110.
- Bone, Q., 1966. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 46, 321-349.
- Bone, Q., 1978. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish physiology VII. Academic Press, New York, pp. 361-424
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.L., Rodrigues, A.C., 1995a. Histochemical study of muscle fibre types in *Synbranchus marmoratus* (Boch, 1795). Ann. Anat. 177, 65-70.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.L., 1995b. Características morfológicas e histoquímicas do tecido muscular do *Synbranchus marmoratus (Pisces, Synbranchidae*), com fenótipo I e II. Rev. Bras. Biol. 55, 685-691.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). Anat. Histol. Embryol. 29(5), 283-289.

- Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R.F., Pellizzon, C.H., Dal Pai, V., 2003a. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. Tissue Cell. 35, 179-187.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C., 2003b. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. Arch. Fish Mar. Res. 50, 149-160.
- Dubowitz, V., Brooke, M.H., 1973. Muscle biopsy: A modern approach. WB Saunders Company, London.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W., 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol. 230, 579-582.
- Edmonson, D.G., Olson, E.N., 1993. Helix loop helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. J. Biol. Chem. 268, 755-758.
- Fernandez, D.A., Calvo, J., Franklin, C.E., Johnston, I.A., 2000. Muscle fibre types and size distribution in sub-Antartic notothenoid fishes. J. Fish Biol. 56, 1295-1311.
- Galloway, T.F., Kjorsvik, E., Kryvi, H., 1999. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. J. Exp. Biol. 202, 2111-2120.
- Godoy, M.P., 1975. Peixes do Brasil Subordem Characoidei, bacia do rio Mogi-Guaçu. Franciscana, Piracicaba.
- Goulding, M., 1981. Man and fisheries on an Amazonian frontier. The Rague, Boston.
- Greer-Walker, M., 1970. Growth and development of the skeletal muscle fibres of cod (*Gadus morhua* L.). J. Cons. Int. Explor. Mer. 33, 228-244.
- Greer-Walker, M.G., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. J. Fish Biol. 7, 295-300.
- Hernandez, R.A., 1989. Cultivo de Colossoma. Guadalupe, Bogotá.
- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H., 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickerel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSeuer), and the muskellunge, *E. masquinongy* (Mitchell). J. Fish Biol. 28, 393-401.
- Hughes, S.M., Chi, M.-Y., Lowry, O.H., Gundersen, K., 1999. Myogenin Induces a Shift of Enzyme Activity from Glycolytic to Oxidative Metabolism in Muscles of Transgenic Mice. J. Cell Biol. 145(3), 633-642.
- IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2007. Estatística da pesca 2005. IBAMA, Brasília.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mar. Biotechnol. 7(6), 576-587.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. Aquaculture 177, 99-115.
- Johnston, I.A., Davison, W., Goldspink, G., 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. J. Comp. Physiol. 114, 203-216.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickel, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., Burt, M.L., 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). J. Exp. Biol. 203, 2539-2552.
- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T., 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*O. mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. Aquaculture 93, 335-356.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Witkam, A., Osse, J.W.M., 1994. Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). J. Fish Biol. 44, 391-408.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. Comp. Biochem. Physiol. 110(A), 3-20.

- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. Cell 58, 823-831.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25(4), 402-408.
- Luther, P.K., Munro, P.M.G., Squire, J.M., 1995. Muscle ultrastructure in the teleost fish. Micron 26, 431-459.
- Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Bioch. Cell Biol. 73, 723-732.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell 58(3), 537-544.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldburg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106(36), 15103-15110.
- Oliveira, A.M.B.M.S.; Conte, L.; Cyrino, J.E.P., 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M; Castagnolli, N. (Eds.), Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, 533p.
- Patruno, M., Sivieri S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). Cell Tissue Res. 331:643-658.
- Rescan, P.Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., 1995. A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and in vitro during the conversion of myosatellite cells into myotubes. FEBS Lett. 362: 89–92.
- Romagosa, E., Paiva, P., Godinho, H.M., 1990. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) = *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), induced to spawn. Aquaculture 86, 105-110.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species, in: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 103-140.
- Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. Bioassays 17, 203-209.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity, in: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 187-250.
- Scapolo, P.A., Veggetti, A., Mascarello, F., Romanello, M.G., 1988. Developmental transitions of myosin isoforms and organization of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). Anat. Embryol. 178, 287-295.
- Stickland N., 1983. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Anat. 137, 323-333.
- Te Kronnie, G., Tatarczuch, L., Van Raamsdonk, W., Kilarski, W., 1983. Muscle fibre types in the myotome of stickleback *Gasterosteus aculeatus* L.; a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. J. Fish Biol. 22(3), 303-316.
- Urbinati, C.U., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), Espécies nativas para a psicultura no Brasil. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 225-255.
- Usher, M.L., Stickland, N.C., Thorpe, J.E., 1994. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. J. Fish Biol. 44(6), 953-964.
- Valente, L.M.P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., Silva, M.W., Oliveira, M.H., Monteiro, R.A.F., Fauconneau, B., 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. J. Fish Biol. 55(4), 675-691.

- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P. A., Rowlerson, A., Carnevali, C., 1993. Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish, *Poecilia reticulata* (Peters) (Atheriniformes, Poeciliidae): a histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. Anat. Embryol. 187, 353-361.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. J. Fish Biol. 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors, in: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 19-41.
- Weatherley, A., Gill, H., Rogers S., 1979. Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Zoo. 57, 2385-2392.
- Weatherley, A., Gill, H., Rogers S., 1980a. Growth dynamics of mosaic muscle fibres in fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to somatic growth rate. Can. J. Zool. 58, 1535-1541.
- Weatherley, A., Gill, H., Rogers S., 1980b. The relationship between mosaic muscle fibres and size in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Biol. 17, 603-610.
- Weatherley, A., Gill, H., 1984. Growth dynamics of white myotomal muscle fibres in the bluntnose minnow, *Pimephales notatus* Rafinesque, and comparison with rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 25(1), 13-24.
- Weatherley, A., Gill, H., 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. Experientia 41, 353-354.
- Weatherley, A., Gill, H., Lobo, A.F., 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. J. Fish Biol. 33(6), 851-859.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice-Hall, New Jersey.
- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C., 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. J. Morphol. 229, 71-81.
- Zimmerman, A.M., Lowery, M.S., 1999. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). J. Exp. Zoo. 284(3), 299-308.

Appendices

Tables

Table 1. GenBank accession numbers and primers used for Real-Time RT-PCR amplification of MyoD, Myogenin and 18S ribosomal RNA (18S rRNA) genes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle.

Gene	GenBank	Sequence (5'-3')		
	accession no.			
MyoD	FJ686692	Forward	CGCCATCAGCTACATCGAG	
		Reverse	ATCCAGGACGGGGGTAGTAGG	
Myogenin	FJ810421	Forward	TCCCAGACCAGAGGTTTTATGAA	
		Reverse	TCTTGGTATCCTGCTTGGTCAA	
18S rRNA	GQ337002	Forward	CGGAATGAGCGTATCCTAAACC	
		Reverse	GCTGCTGGCACCAGACTTG	

Table 2. Body weight (g) and total length (cm) in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) at 45, 90,180 and 400 days post hatching (dph) and in adult fish.

Growth Stage	Body Weight (g)	Total Length (cm)
45 dph (<i>n</i> =8)	0.12 (0.05; 0.18) ^a	2.2 (1.7; 2.5) ^a
90 dph (<i>n</i> =8)	22.85 (21.46;27.58) ^b	10.5 (10.4; 11.4) ^b
180 dph (<i>n</i> =8)	31.7 (24.0; 39.1) ^b	12.25 (11.0; 13.0) ^b
400 dph (<i>n</i> =8)	126.1 (97.0; 242.0) ^c	19.0 (18.0; 26.5) ^c
Adult (<i>n</i> =8)	950.0 (807.0;1080.0) ^d	38.5 (35.0; 40.5) ^d

Values expressed as median, minimum and maximum values.

Values in column with the same letter are not statistically significant.

Figures



Fig. 1. Transverse sections of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) white skeletal muscle at 45 (a), 90 (b), 180 (c), 400 (d) days post-hatching (dph) and in adult (e) fish. A mosaic pattern of different muscle fiber diameters composed of small fibers (arrows) between large fibers (arrowhead) can be observed. Muscle fibers are separated by the endomysium (e). Perimysium (*) separates muscle fibers into fascicles. Haematoxilin-eosin stain. Bars: 50 μ m.



Fig. 2. The frequency distribution of $\langle 20\mu m (a), 20-50\mu m (b) and \rangle 50\mu m (c)$ white muscle fiber diameter in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) at 45, 90, 180 and 400 dph and in adult fish (*n*=8 at each growth stage). Data were expressed as minimum value, lower quartile, median, upper quartile and maximum value. Small letters compare stages in the same diameter class. Capital letters compare the diameter classes at the same stage. Values with the same letters are not statistically significant.



Fig. 3. MyoD (a) and myogenin (b) mRNA levels, detected by reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR), expressed in white skeletal muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) at 45, 90, 180 and 400 days post hatching (dph) and in adult fish (*n*=8 for each growth stage). The Ct (Threshold cycle) is the cycle number at which the fluorescence generated within a reaction crosses the threshold line. Ct values are logarithmic and were used directly for the quantitative analysis by the $\Delta\Delta$ Ct Method after a validation experiment. Δ Ct was calculated (Δ Ct= Ct_{target gene} - Ct_{reference gene}) for all samples using 18S ribosomal RNA as reference gene. These results were normalized to the Δ Ct value of a calibrator sample to obtain a $\Delta\Delta$ Ct value (Δ Ct_{target} - Δ Ct_{calibrator}); the 45 dph stage was chosen as the calibrator sample. Relative quantification in relation to calibrator was obtained by the formulae 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, expressed in arbitrary units. Data were expressed as minimum value, lower quartile, median, upper quartile and maximum value. Values with the same letters are not statistically significant.

7.3 Artigo II

MyoD, myogenin and myostatin expression pattern in red and white skeletal muscles of adult pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Fernanda Losi Alves de Almeida ^{a,b}, Nabila Scabine Pessotti ^a, Fernanda Regina Carani ^{a,b}, Carlos Roberto Padovani ^c, Marco Patruno ^d, Maeli Dal Pai-Silva ^a.

^a UNESP, Institute of Biosciences, Department of Morphology, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil;

^b UNICAMP, Institute of Biology, Department of Anatomy, Cellular Biology and Physiology and Biophysics, 13084-971, Campinas, São Paulo, Brazil

^c UNESP, Department of Biostatistics, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil

^d University of Padua, Department of Experimental Veterinary Sciences, Viale dell'Università, 16 – 35020, Legnaro (PD), Italy.

Submetido para publicação ao periódico Aquaculture Research

Abstract

Myotomal muscle is the largest tissue fraction in most fish species and fish growth implies a corresponding responsiveness in muscle growth dynamics. Skeletal muscle growth is regulated by a several molecules, including the myogenic regulatory factors (MRFs) and myostatin. The aim of this study was evaluate the MyoD, myogenin and myostatin expression in white and red skeletal muscles of pacu (Piaractus mesopotamicus) during adult growth stage. Adult fish (2 years, n=8) were anesthetized, sacrificed and body weight (g) and total length (cm) were determined. White and red muscle fragments from the dorsal region were dissected out from all samples, cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C. MyoD, myogenin and myostatin mRNA levels were determined by reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). The MyoD, myogenin and myostatin mRNA levels were similar between red and white muscle fibers. MyoD and myogenin mRNA levels detected in white muscle could be related, respectively, to the proliferation and differentiation of satellite cells which have contributed to the hypertrophy, the main growth mechanism in adult pacu. In red muscle, the MyoD and myogenin expression could be also involved to the control of red muscle fiber-type phenotype. The myostatin mRNA levels detected in white and red fibers could be related to the regulation of the muscle fiber growth until it reaches a functional maximum diameter. Although no differences in Myod, myogenin and myostatin expression have been observed in red and white muscles of adult pacu with 2 years, our results suggest that these genes could be involved in the regulation of somatic growth in this specie. These results could provide information for understanding the pacu skeletal muscle physiology during adult growth stage.

Keywords: Piaractus mesopotamicus; fiber types; myogenic regulatory factor; myostatin; quantitative gene expression.

1. Introduction

The swimming muscle of teleost fish comprises 40–60% of the total body mass (Bone, 1978). The main fish locomotor muscles are represented by the metameric myotomal lateral muscles which consist of a number of almost identical units, the myotomes, separated from each other by connective tissue sheets called myosepta (Alexander, 1969).

In contrast to mammalian muscle, which is characterized by a mixture of fiber types, the myotomal muscle of teleosts shows anatomically separated zones of muscle fiber types arranged in layers or compartments: white (deep), intermediate and red (superficial). Red muscle, near the lateral line, generally comprises less than 30% of total musculature (Greer-Walker and Pull, 1975). Red muscle fibers have small diameters, are relatively homogeneous in size and display aerobic metabolism and slow contraction; they are associated with slow cruise swimming such as migration and foraging (Bone, 1978). The white fibers represent the bulk of myotomal muscle, never less than 70%, and show the largest fiber diameters (Sänger and Stoiber, 2001). White muscle is made up glycolytic metabolism and fast-contracting muscle fibers used in fast swimming such as predation and escape behavior (Driedzic and Hochachka, 1976; Bone, 1978). There is an intermediate layer between red and white musculature which has intermediate characteristics (Sänger and Stoiber, 2001).

The growth of axial muscle in fish is a plastic process involving populations of myosatellite cells, also called adult myoblasts (Koumans and Akster, 1995; Johnston, 1999). These cells are activated and they proliferate and differentiate, providing the essential nuclei for new muscle fiber formation (hyperplasia) and hypertrophy (Koumans and Akster, 1995). In hyperplastic growth, new fibers form on the surface of existing fibers by satellite cells that fuse to form multinucleated myotubes (Johnston, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001). During hypertrophic growth, as fibers expand they absorb satellite cell nuclei in order to maintain a relatively constant ratio between the nucleus and the cytoplasm (Koumans et al., 1994). The relative contributions of hypertrophy and hyperplasia to muscle growth vary markedly during ontogeny, in different species and in different muscle types and growth stages (Dal Pai et al., 2000; Johansen and Overturf, 2005; Aguiar et al., 2008; Almeida et al., 2008, 2010).

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

Myostatin, also known as "growth and differentiation factor-8" (GDF-8), is a member of the "transforming growth factor- β " (TGF- β) superfamily proteins and has been demonstrated to negatively regulate skeletal muscle growth in several mammalian species (McPherron et al., 1997). *In vitro* studies have showed that myostatin functions by inhibiting satellite cell proliferation and differentiation (Thomas et al., 2000; Langley et al., 2002). In fish, myostatin is mainly expressed in skeletal muscle and at a lower level in several organs, such as brain, eyes, exocrine and endocrine pancreas, gills, gonads, heart, intestine, kidney, liver, oesophagus, pharynx, skin, spleen, and stomach (Maccatrozzo et al., 2001; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001; Roberts and Goetz, 2001; Kocabas et al., 2002; Radaelli et al., 2003; Garikipati et al., 2006; Ko et al., 2007). Then, in fish, the role of myostatin may not be restricted to muscle growth regulation, but may have other possible functions in the fish muscle or in other tissues in which it is expressed (Østbye et al., 2001; Acosta et al., 2005; Patruno et al., 2008).

Fish growth rate is one of the most important aspects for successful aquaculture. The freshwater neotropical characid pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is extensively used in Brazilian aquaculture programs (Urbinati and Gonçalves, 2005) and makes up 4.5% of Brazilian freshwater fisheries (IBAMA, 2007). It is a large fish (weight up to 20 kg) that exhibits a rapid growth rate, reaching 1.2 kg within the first 12 months (Urbinati and Gonçalves, 2005). This fast growth depends on both hyperplastic and hypertrophic muscle growth mechanisms (Almeida et al., 2008, 2010; Dal Pai et al., 2000). In juvenile pacu, the hyperplasia is the main mechanism which contributes to the skeletal muscle growth, whereas

in adult is observed a predominance of the hypertrophy (Dal Pai et al., 2000; Almeida et al., 2008, 2010).

Myotomal muscle in pacu is composed of the white or deep compartment which shows a mosaic distribution pattern characterized by different fiber diameters (Dal Pai et al., 2000; Assis et al., 2004; Almeida et al., 2008, 2010). The red or superficial compartment forms a thin layer in the subdermal region which is more developed in the lateral line nerve region; between red and white musculature there is an intermediate muscle compartment (Assis et al., 2004). These locomotor muscles are very highly specialized to meet the wide range of force production during sustained economical cruising and also in high velocity bursts (Sänger and Stoiber, 2001).

The growth dynamics of red and white muscles can be related to the muscle physiology responses that may be regulated by the expression of several molecules, as MyoD, myogenin and myostatin. The aim of this study was to investigate the expression of these factors in white and red fibers present in the lateral muscle of adult pacu. In Brazilian fish species, as pacu, there are no studies focusing the MRFs and myostatin expression patterns in the two distinct fiber types. The initial characterization of MRFs and myostatin expression pattern in both muscle types could help to understand the basis of molecular mechanisms that are involved in the regulation of white and red muscles functions in pacu.

2. Materials and methods

2.1 Fish samples

Adult fish (2 years, n=8) were obtained from the Aquaculture Center, UNESP, in Jaboticabal, São Paulo State, Brazil. They were sacrificed by an overdose of MS-222 anesthetic (tricaine methanensulfonate; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). Body weight (g) and total length (cm) were measured in all specimens.

White and red skeletal muscle fragments from the dorsal region were dissected out from all samples, cooled in liquid nitrogen (-159°C), and then stored at -80°C in a freezer until molecular analysis.

This experiment was approved by the Ethics Committee of the Biosciences Institute, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol nº 74/07).

2.2 MyoD, Myogenin and myostatin mRNA expression

Total RNA was isolated from the white and red muscle samples using TRIzol Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). The quality of the RNA was assessed by 1% agarose gel electrophoresis. The amount of RNA extracted was determined using a NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA purity was ensured by obtaining a 260/280nm OD ratio equal to 2.0. Total RNA (2 µg) was treated with Amplification Grade Deoxyribonuclease I (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and reverse transcribed with random hexamer *primers* and a High-Capacity cDNA Archive Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocols. A sample without reverse transcriptase (NoRT) was used to verify DNase treatment efficiency.

MyoD, myogenin and myostatin mRNA levels were detected by reverse transcription quantitative real-time polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) using an ABI 7300 Real Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). A sample without cDNA template (NTC) was used to verify that the master mix was free from contaminants. Reactions were prepared containing the following components: 20 ng/µl of cDNA, Power SYBR Green PCR Master Mix 1X (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), and 400 nM of each primer (Table 1), to yield a final volume of 25 µl. Real-time conditions were: 10 min at 95°C, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s, and annealing/extension at 60°C for 1 min. The 18S ribosomal RNA (18S rRNA) gene was used as a reference gene to normalize the quantification of mRNA targets; this gene showed invariant expression across all samples (p = 0.1184).

Primer pairs for MyoD, myogenin, myostatin and 18S rRNA were designed with reference to the cDNA nucleotide sequence from *Piaractus mesopotamicus* using Primer Express 3.0 software (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) (Table 1). The specificity of each primer was confirmed by the presence of a single peak in the dissociation curve analysis.

Table 1. GenBank accession numbers and *primers* used for Real-Time RT-PCR amplification of MyoD, myogenin, myostatin and 18S ribosomal RNA (18S rRNA) genes in white and red skeletal muscles from adult pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Gene	GenBank	Sequence (5'-3')		
	accession no.			
MyoD	FJ686692	Forward	CGCCATCAGCTACATCGAG	
		Reverse	ATCCAGGACGGGGTAGTAGG	
myogenin	FJ810421	Forward	TCCCAGACCAGAGGTTTTATGAA	
		Reverse	TCTTGGTATCCTGCTTGGTCAA	
myostatin	HM561964	Forward	GACGGAAGGAGGCACATAAGAA	
		Reverse	GTGAACGCTGGGGGTCACG	
18S rRNA	GQ337002	Forward	CGGAATGAGCGTATCCTAAACC	
		Reverse	GCTGCTGGCACCAGACTTG	

RT-qPCRs for target and reference genes were run in the same RT reaction using two replicates of each sample and reference gene. Ct (threshold cycle) determinations were performed by the instrument for each reaction using default parameters. The Ct is the cycle number at which the fluorescence generated within a reaction crosses the threshold line. The PCR efficiency of each individual assay was determined by creating standard curves for both targets and the reference gene. Standard curves were obtained by using serial dilutions (1:2) of sample cDNA and represented a semi-log regression line plot of Ct value vs. the logarithm of the starting amount of cDNA. The standard curve slope showed acceptable values, included between -3.4 and -3.32, as reported by Patruno et al. (2008).

Before using the $\Delta\Delta$ Ct method for relative quantification, a validation experiment was performed to demonstrate that the efficiency of the target and reference genes amplification was approximately equal, according to Applied Biosystems *User Bulletin* #2 (P/N 4303859). The Δ Ct was plotted against logarithm of the dilution factor, and the slope absolute value was < 0.1.

The difference between Ct values was calculated for each mRNA by taking the mean Ct of duplicate reactions and subtracting the mean Ct of duplicate reactions for the reference RNA measured on an aliquot from the same RT reaction (Δ Ct=Ct_{target gene} – Ct_{reference gene}). All samples were then normalized to the Δ Ct value of a calibrator sample to obtain a $\Delta\Delta$ Ct value

 $(\Delta Ct_{target} - \Delta Ct_{calibrator})$. The white muscle was chosen as the calibrator sample to evaluate target gene putative differential mRNA expression relative to this muscle type.

For the comparative method, relative quantifications were calculated in relation to calibrator sample $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ concentrations, expressed in arbitrary units and normalized to reference gene (18S rRNA). Therefore, by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, data were recorded as the fold-change in gene expression normalized with the reference gene and relative to the calibrator sample (Livak and Schmittgen, 2001).

2.3 Statistical analysis

Relative gene expression data were expressed mean \pm SD. Student's t-test for dependent samples was used to evaluate significant differences in MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression between the two muscle types. Statistical significance level was set at p < 0.05 for all analyses.

3. Results

3.1 Anatomical data

Mean and S.D. of weight and total length for adult fish were 953.1 ± 97.9 g and 38.1 ± 2.0 cm, respectively.

3.2 MyoD, myogenin and myostatin mRNA expression

RT-qPCR results showed that the mRNA levels of MyoD were not statistically different between red and white muscle in pacu adult $(2.72 \pm 1.75 \text{ and } 5.24 \pm 2.3 \text{ for white and}$ red muscle, respectively; p = 0.09) (Figure 1a). Similarly, estimated myogenin mRNA levels were not different between the two muscle fiber types $(0.62 \pm 0.28 \text{ and } 0.95 \pm 0.33 \text{ for white}$ and red muscle, respectively, p > 0.05) (Figure 1b). Myostatin mRNA levels were also similar between red and white muscle fibers $(0.73 \pm 0.33 \text{ and } 0.50 \pm 0.13 \text{ for white}$ and red muscle, respectively, p > 0.05) (Figure 1c).



Figure 1 – MyoD (a), myogenin (b) and myostatin (MSTN) (c) mRNA levels expressed in white (WM) and red muscles (RM) of adult pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (n=8). Δ Ct was calculated (Δ Ct= Ct_{target gene} – Ct_{reference gene}) for all samples using 18S ribosomal RNA as reference gene. These results were normalized to the Δ Ct value of a calibrator sample to obtain a $\Delta\Delta$ Ct value (Δ Ct_{target} – Δ Ct_{calibrator}); the white muscle was chosen as the calibrator sample. Relative quantification in relation to calibrator was obtained by the formulae 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, expressed in arbitrary units. Relative gene expression data were expressed as mean ± S.E.M. Statistical significance level was set at p < 0.05 for all analyses.

4. Discussion

This study is the first description of MyoD, myogenin and myostatin expression pattern in white and red muscles of pacu during adult growth phase. These molecules have showed similar mRNA levels in red and white muscle fibers from adult pacu.

White and red muscles show differences in distribution, contractile/metabolic properties, initial development and growth dynamics (Sänger and Stoiber, 2001). White muscle makes up 70% of myotomal muscle bulk, being the edible part of the fish that reflects in the economic importance in the aquaculture (Zhang et al., 1996); red muscle is less important in terms of aquaculture production. White and red muscle fibers are recruited in specific and different situations; the red or slow fibers are associated with sustained speeds of long duration, such as migration and foraging, whereas the white or fast fibers are associated with short but intense bursts of speed, such as predation and escape behavior (Bone, 1978).

Pacu is a fast-growing fish and has non-determined growth. This fast growth depends on both hyperplastic and hypertrophic muscle growth mechanisms which remain active for a long time, since initial developmental stages (Dal Pai-Silva et al, 2003; Assis et al., 2004) until adult phase (Dal Pai et al., 2000; Almeida et al., 2008, 2010). In adult pacu, skeletal muscle grows predominantly by hypertrophy and the hyperplasia is less intense (Dal Pai et al., 2000; Almeida et al., 2008, 2010).

In adult pacu, MyoD mRNA levels were similar between red and white muscles. Delalande and Rescan (1999) have also showed in adult rainbow trout a similar MyoD mRNA expression between red and white muscle fibers, by using Northern Blot, according to our results. However, by the same technique, Tan and Du (2002) and Zhang et al. (2006) have showed differences in the MyoD expression between the both muscle fiber types. In rodents, MyoD protein is differently accumulated in fast and slow muscle fibers and is required for normal fiber type balance (Hughes et al., 1997). In the literature there are few studies reporting the quantitative MyoD mRNA expression between red and white muscles separately; the most studies have conducted this analysis using Northern Blot during embryogenesis and the data are not quantitative. In our study, we have analysed MyoD mRNA expression by using RT-qPCR, a highly sensitive technique to detect mRNA levels expression of specific transcripts. MyoD expression pattern observed in red and white muscles of adult fish could be characteristic of this specie in adult stage of 2 years and may be related to the physiological

and locomotor properties of both muscle types to best adapt this specie to its ecological environment (Tan and Du, 2002).

During skeletal muscle growth, MyoD directly controls proliferating satellite cells, whereas myogenin controls satellite cells differentiation and fusion which form myofibers (Watabe, 1999, 2001). These proliferating satellite cells provide the essential nuclei for new muscle fiber formation (hyperplasia) and hypertrophy (Koumans and Akster, 1995). The MyoD mRNA levels detected in white muscle from adult pacu could be associated to the satellite cells proliferation during the intense hypertrophic muscle growth in this growth stage (Almeida et al., 2010). During hypertrophy, muscle fibers absorb proliferating satellite cells nuclei in order to maintain a relatively constant ratio between the nucleus and the cytoplasm, increasing the fiber diameter (Koumans et al., 1994).

Red and white muscles have different growth patterns and the MyoD mRNA levels detected in red muscle from adult pacu could not be attributed only to the hypertrophy; this mechanism is more intense in white muscle (Dal Pai et al., 2000). We suggest that MyoD mRNA expression in red muscle from adult pacu could be related to the control of fiber phenotypic characteristics and fiber type-specific gene expression, as reported in rodents by Hughes et al. (1997).

The myogenin mRNA levels were similar between red and white muscle in adult pacu. Similarly to that reported for MyoD expression above, there are few studies analyzing the myogenin mRNA expression between red and white muscles separately and the data are scarce and not quantitative. Rescan et al. (1995) showed by using Northern Blot that the red and white fibers in adult rainbow trout present different levels of myogenin mRNA because myogenin mRNA does not accumulate in white muscle fibers, but is more concentrated in red fibers. Using the same methodology, Hughes et al. (1999) reported an accumulation of myogenin in rat slow fibers. Similarly to that discussed for MyoD expression results, we suggest that the differences found between our myogenin expression results and those reported by Rescan et al. (1995) and Hughes et al. (1999) could be related to the methodology utilized (Northern blot x RT-qPCR). Then the myogenin expression pattern observed in adult pacu could be also related to the physiological characteristics of both red and white muscle to best adapt this specie to its ecological environment (Tan and Du, 2002).

In adult pacu, the myogenin mRNA levels detected in white muscle could be related to the intense process of satellite cells differentiation in mature myofibers (Watabe, 1999, 2001), after their proliferation have been stimulated by MyoD expression, during the intense hypertrophy (Almeida et al., 2010). Similarly to MyoD, the myogenin expression observed in red muscle fibers could be related to maintenance of phenotypic identity and the regulation of fiber-type specific gene expression in this fiber type as reported in rodents (Hughes et al., 1993). In mouse, changes in the levels of MyoD and myogenin induced by manipulation of hormone or innervation parallel change the fiber phenotype (Hughes et al., 1993). Then muscle phenotypic variation between red and white muscle fibers may depend in part on the ratio of individual myogenic regulatory factors, as MyoD and myogenin (Delalande and Rescan, 1999).

Similarly to MyoD and myogenin, the mRNA levels of myostatin were similar between white and red muscle fibers in adult pacu. In mammals, protein and mRNA myostatin levels have been characterized in slow and fast-fiber-type dominated muscles. In rats, myostatin protein level was higher in the slow-fiber-type dominated muscles (soleus) than in fast-fiber-type dominated muscles (tibialis anterior) (Sakuma et al., 2000). In contrast, myostatin mRNA and protein level were higher in fast-fiber-dominated muscles (gastrocnemius/plantaris) than in slow-fiber dominated muscles (soleus) of mice (Carlson et al., 1999) and rats (Wehling et al., 2000). In humans, there was no difference between fast-fiber-dominated and slow-fiber-dominated muscles in terms of their myostatin gene expression (Gonzalez-Cadavid et al., 1998).

Roberts and Goetz (2001) have reported by using Northern analysis that myostatin mRNA was higher in the red muscle of adult brook trout, king mackerel and yellow perch. In little tunny, myostatin was expressed predominately in white muscle, whereas in mahi-mahi the expression was similar in both fibers. Using PCR assays, Østbye et al. (2001) have demonstrated that, in salmon, the mRNA of myostatin is detectable in red muscle only. Patruno et al. (2008) have reported a similar level of myostatin mRNA between white fibers and red fibers from juveniles of sea bass, whereas adults (3 years) showed a higher value for myostatin mRNA in the red muscle fibers.

The myostatin mRNA levels observed in the two muscle types of pacu, together with previous results obtained in other fish species (Østbye et al., 2001; Roberts and Goetz, 2001;

Patruno et al., 2008), suggest that myostatin expression pattern can vary markedly according to the fiber types, vertebrate specie and growth stage. The myostatin mRNA levels detected in white and red muscle of pacu may be involved to the regulation of the muscle fiber growth and to the maintenance of muscle mass in these compartments. Although muscle growth in this phase occurs mainly by hypertrophy, white and red fibers always reach a functional maximum diameter (Rowlerson and Veggetti, 2001), process which could be controlled by the myostatin expression.

In conclusion, MyoD and myogenin mRNA levels detected in white muscle could be related to the proliferation and differentiation of satellite cells respectively, which have contributed to the hypertrophy, the main growth mechanism in adult pacu. Furthermore, in red muscle, the MyoD and myogenin expression could also be controlling the fiber-type phenotype. The myostatin mRNA levels detected in white and red fibers could be related to the maintenance of muscle mass.

Adult fish represent the main interested growth stage in commercial fish production. Researches in this stage could contribute to application of suitable strategies in commercial fish production, focusing on skeletal muscle growth improvement, which is the most important component in terms of aquaculture. Pacu makes up 4.5% of Brazilian freshwater fisheries (IBAMA, 2007). In aquaculture, pacu and hybrid *P. mesopotamicus X Colossoma macropomum* are responsible for 11.1% of Brazilian production (IBAMA, 2007). Our results could provide valuable information for understanding the pacu skeletal muscle physiology during adult growth stage.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Proc. n° 06/60446-9 and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Proc. n° 309295/2006-8. It is part of a PhD Thesis which will be presented by FLAA to the Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

References

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., Estrada, M.P., 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. J. Biotechnol. 119, 324-331.
- Aguiar, D.H., Bock, C., Padovani, C.R., Dal Pai-Silva, M., 2008. Myod, Myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Aquacult. Res. 39, 1673-1679.
- Alexander, R., 1969. The orientation of muscle in the myomers of fishes. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 49, 263-290.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. Micron 39, 1306-1311.
- Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. Micron 41, 997-1004.
- Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Aquaculture 237, 251-267.
- Blackwell, T., Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. Science 250, 1104-1110.
- Bone, Q., 1978. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish physiology VII. Academic Press, New York, pp. 361-424.
- Carlson, C.J., Booth, F.W., Gordon, S.E., 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fibertype specific and increases during hindlimb unloading. Am. J. Physiol. 277, 601-606.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). Anat. Histol. Embryol. 29, 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C., 2003. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. Arch. Fish Mar. Res. 50, 149-160.
- Delalande, J.M., Rescan, P.-Y., 1999. Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). Dev. Genes Evol. 209, 432-437.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W., 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol. 230, 579-582.
- Edmonson, D.G., Olson, E.N., 1993. Helix loop helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. J. Biol. Chem. 268, 755-758.
- Garikipati, D.K., Gahr, S.A., Rodgers, B.D., 2006. Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. J. Endocrinol. 190, 879–888.
- Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G., Arver, S., Bhasin, S., 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 14938-14943.
- Greer-Walker, M.G., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. J. Fish Biol. 7, 295-300.

- Hughes, S.M., Taylor, J.M., Tapscott, S.J., Gurley, C.M., Carter, W.J., Peterson, C.A., 1993. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. Development 118, 1137-1147.
- Hughes, S.M., Koishi, K., Rudnicki, M., Maggs, A.M., 1997. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. Mech Dev. 61, 151-163.
- Hughes, S.M., Chi, M.-Y., Lowry, O.H., Gundersen, K., 1999. Myogenin Induces a Shift of Enzyme Activity from Glycolytic to Oxidative Metabolism in Muscles of Transgenic Mice. J. Cell Biol. 145, 633-642.
- IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2007. Estatística da pesca 2005. IBAMA, Brasília.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mar. Biotechnol. 7, 576-587.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. Aquaculture 177, 99-115.
- Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, T.T., Wu, J.L., Chen, J.C., Lu, J.K., 2007. Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Mar. Biotechnol. 9, 20–32.
- Kocabas, A.M., Kucuktas, H., Dunham, R.A., Liu, Z., 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Biochim. Biophys. Acta. 1575, 99-107.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Witkam, A., Osse, J.W.M., 1994. Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). J. Fish Biol. 44, 391-408.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. Comp. Biochem. Physiol. 110, 3-20.
- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. Cell 58, 823-831.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. J. Biol. Chem. 277, 49831-49840.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25, 402-408.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., Patarnello, T., 2001. Characterization of the myostatin gene in the gillhead seabream (*Sparus aurata*): sequence and genomic structure, and expression pattern. Mar. Biotechnol. 3, 224-230.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.-J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member. Nature 387, 83-90.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell 58, 537-544.
- Østbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., Andersen, Ø., 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. Eur. J. Biochem. 268, 5249-5257.
- Patruno, M., Sivieri S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). Cell Tissue Res. 331, 643-658.

- Radaelli, G., Rowlerson, A., Mascarello, F., Patruno, M., Funkenstein, B., 2003. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. Cell Tissue Res. 311, 239-50.
- Rescan, P.-Y., Jutel, I., Rallière, C., 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 204, 3523-3529.
- Rescan, P.-Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., 1995. A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and in vitro during the conversion of myosatellite cells into myotubes. FEBS Lett. 362, 89–92.
- Roberts, S.B., Goetz, F.W., 2001. Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. FEBS Lett. 491, 212-216.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species, in: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 103-140.
- Sakuma, K., Watanabe, K., Sano, M., Uramoto, I., Totsuka, T., 2000. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. Biochim. Biophys. Acta. 1497, 77-88.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity, in: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 187-250.
- Tan, X., Du, S.J., 2002. Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Dev. Genes Evol. 212, 207–217.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R., 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 275, 40235-40243.
- Urbinati, C.U., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), Espécies nativas para a psicultura no Brasil. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 225-255.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. J. Fish Biol. 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors, in: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 19-41.
- Weintraub, H., 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. Cell 75, 1241–1244.
- Wehling, M., Cai, B., Tidball, J.G., 2000. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. FASEB J. 14, 103-110.
- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C., 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. J. Morphol. 229, 71-81.
- Zhang, Y., Tan, X., Zhang, P.J., Xu, Y., 2006. Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis. Mar. Biotechnol. 8, 139-148.

Anexo 1

Estágio de doutorado realizado na Universidade de Pádua, Itália.

1. A Universidade

A Universidade de Pádua (*Università degli Studi di Padova* - UNIPD), localizada na cidade de Pádua-Itália (em italiano, Padova), é a segunda universidade mais antiga da Europa e uma das mais antigas do mundo. Foi fundada em 1222 por um grupo de estudantes e docentes que deixaram a Universidade de Bolonha em busca de uma maior "liberdade acadêmica" para ensinar, sem ser alvo de repressão pela igreja católica. A partir do século XV e até século XVIII, a universidade era conhecida pela pesquisa nas áreas de medicina, astronomia, filosofia e direito. Um de seus docentes ilustres foi o italiano Galileu Galilei, físico, matemático, astrônomo e filósofo.

A universidade possui um teatro anatômico, um dos mais antigos da Europa, que, desde 1595, atraiu artistas e cientistas para o estudo do corpo humano durante dissecções públicas. Por ele, passaram anatomistas importantes como Andreas Vesalius, Gabriele Falloppio e William Harvey. Além disso, em 1678, Elena Lucrezia Cornaro Piscopia se tornou a primeira mulher no mundo a receber um diploma de graduação.

Em 2009, a Universidade de Pádua foi considerada a melhor universidade da Itália. Nesse ano, a universidade contava com 66000 estudantes, dos quais 12000 formandos por ano, e 2396 docentes. A universidade possui uma ampla variedade de cursos distribuídos em 13 escolas ou faculdades, como a Faculdade de Ciências Agrárias, Economia, Engenharia, Direito, Farmácia, Letras e Filosofia, Medicina e Cirurgia, Medicina Veterinária, Psicologia, Matemática/Física/Ciências Naturais, Ciências Humanas, Ciências Políticas e Ciências Estatísticas. Além disso, a universidade conta com 62 cursos de especialização e 34 cursos de doutorado.

A parte física da Universidade conta com 64 departamentos, 51 bibliotecas, 51 centros de pesquisa e serviços, um hospital clínico e uma fazenda agrária.

2. Prof. Dr. Marco Patruno

O Prof. Dr. Marco Patruno é Professor Associado do Departamento de Ciências Experimentais Veterinárias da Universidade de Pádua. Possui 110 publicações internacionais, entre as quais, 38 artigos científicos, nove capítulos de livros e, em colaboração com outros pesquisadores, um livro-texto de Embriologia.

Entre suas linhas de pesquisa estão: (a) Biologia de células-tronco isoladas de animais de interesse veterinário e (b) Expressão de miostatina e fatores de crescimento durante a miogênese e crescimento de diferentes espécies de peixes e mamíferos.

O Prof. Dr. Patruno, juntamente com outros docentes do Departamento, publicaram trabalhos de referência na literatura para o estudo dos padrões de crescimento muscular em peixes (Veggetti et al, 1990, 1993; Patruno et al, 1998) e da expressão de genes envolvidos com a miogênese e o crescimento muscular, como miostatina, IGF-I e IGF-II (Maccatrozzo et al., 2001; Radaelli et al., 2003, 2008; Patruno et al., 2006, 2008).

3. Estágio de doutorado

O estágio de doutorado no exterior ocorreu no período de 19 de janeiro a 6 de maio de 2009. Além do Prof. Dr. Patruno, esse estágio foi orientado pela Dra. Roberta Sacchetto.

Esse estágio permitiu vivenciar a rotina dos laboratórios do Departmento, acompanhando as diferentes metodologias desenvolvidas como técnicas histológicas de rotina (inclusão de tecidos em parafina, cortes e colorações), reações imunohistoquímicas, western blot, cultura celular e técnicas de biologia molecular, como as reações em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) tradicional e quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).

O objetivo desse estágio foi determinar a sequência nucleotídica parcial dos genes IGF-I e beta-actina (gene de referência) expressos na musculatura branca do pacu.

4. Material e métodos

Amostras de músculo branco foram retiradas da região dorsal de exemplares juvenis de pacu e mantidas em solução de RNA Later (Ambion – Life Technologies Corporation,
Carlsbad, CA, USA), à temperatura ambiente, até o processamento no Laboratório de Anatomia e Fisiologia da Universidade de Pádua.

As etapas de extração e análise do RNA total e seu tratamento com a enzima DNase foram realizadas conforme a metodologia descrita anteriormente. A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando-se o kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Para cada amostra, em uma alíquota de 2 µg do RNA total tratado com DNase, foram adicionados 1 µL de dNTP mix (10 mM) e 1 µL de *random primers* (50 ng/µL), com o volume final de 10 µL ajustado com água ultrapura (Gibco - Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Essa reação foi incubada por 5 minutos a 65°C e, em seguida, por 1 minuto a 4°C. Posteriormente, foi adicionado, à cada amostra, 9 µL de uma solução contendo 2 µL de tampão RT 10X, 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT (0.1 M) e 1 µL de Inibidor de RNase. Cada reação foi levemente agitada e incubada a 25°C por 2 minutos, sendo, em seguida, adicionado 1 µL da enzima *SuperScript II RT* com incubações sucessivas por 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C.

Para a realização da RT-PCR, foram utilizados 1 μ L do cDNA, 2 μ L de tampão para PCR 10X, 0.4 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de primer senso (10 μ M), 1 μ L de primer antisenso (10 μ M), 0.1 μ L de Taq polimerase e 12.7 μ L de água ultrapura, totalizando um volume de 20 uL de reação. Os parâmetros da reação foram uma incubação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos (denaturação), 58°C por 40 segundos (anelamento) e 72°C por 40 segundos (extensão), com uma etapa de extensão final a 72°C durante 2 minutos.

Para a amplificação de um segmento do gene do IGF-I, foram testados dois conjuntos de *primers* senso e antisenso (*primers* A-B e C-D, Tabela 1), disponíveis no laboratório, desenhados a partir da seqüência codificante do RNAm expressa nos teleósteos *Sparus aurata* (número de acesso no GenBank: AY996779) e *Dicentrarchus labrax* (número de acesso no GenBank: AY800248), respectivamente. Também foram testados conjuntos de *primers* degenerados construídos a partir das regiões conservadas do RNAm (*primers* senso: E e F e antisenso: H e I) e da proteína IGF-I (*primers* senso G e antisenso J) entre diferentes espécies de vertebrados, incluindo os teleósteos (Tabela 1). Em relação aos conjuntos de *primers* E e F e H e I, foram testadas as combinações E-H, E-I, F-H e F-I.

Para a amplificação de um segmento do gene da beta-actina, foi utilizado um conjunto de *primers* senso e antisenso, disponível no laboratório, desenhado com base na seqüência codificante do RNAm expressa no teleósteo *Sparus aurata* (número de acesso no GenBank: AF384096) (Tabela 2).

Primers	Orientação	Seqüência nucleotídica (5'→3')	Baseado em	Posição inicial
А	Senso	AGCCCAGAGACCCTGTGC	Sparus aurata	405
В	Antisenso	GGCAGGTGCACAGTACATC	Sparus aurata	587
С	Senso	GTGTGTGGAGAGAGAGGCTTTTA	Dicentrarchus labrax	181
D	Antisenso	GTGACCGCCGTGCATTGG	Dicentrarchus labrax	247
Е	Senso	GGTGCNGARYTNGT5GA5AC	Degenerado	
F	Senso	YTNCARTTYGTNTGYGG5GA	Degenerado	
G	Senso	CARTTYGTGTGYGGNGA	Degenerado	
Н	Antisenso	YTCRCANSWYTGRAARCARCA	Degenerado	
Ι	Antisenso	YTCRCANSWYTGRAARCA5CA	Degenerado	
J	Antisenso	TGRAARCARCAYTCRTC	Degenerado	

Tabela 1. Primers utilizados na reação de RT-PCR tradicional para o gene IGF-I.

S: primer senso, A: primer antisenso, bases degeneradas - Y: C+T; R: A+G; N: A+T+C+G; S: C+G; W: A+T

Tabela 2. *Primers* utilizados na padronização da reação de RT-PCR tradicional para o gene beta-actina.

Primers	Seqüência de nucleotídeos (5'→3')	Posição inicial
Senso	ACCCTGTCCTGCTCACAGAG	76
Antisenso	GGGAGTCCATAACAATACCAGTG	240

Os produtos de PCR referentes aos genes IGF-I e beta-actina, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris - ácido bórico - EDTA), contendo 3 μ L de brometo de etídio, durante 40 minutos a 100V.

Para confirmar se os produtos da RT-PCR, visualizados no gel de agarose, correspondiam à seqüência parcial do gene IGF-I, foi realizada a clonagem e seqüenciamento nucleotídico desses produtos. O produto da RT-PCR referente ao gene beta-actina, visualizado no gel de agarose, foi diretamente sequenciado, não sendo realizada a clonagem desse produto.

Para a clonagem do produto de PCR, referente a um segmento do gene do IGF-I, foi utilizado o kit *TOPO TA Cloning* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Para a reação de ligação dos insertos (produto de PCR correspondente ao gene IGF-I) ao plasmídeo, em um tubo esterilizado foram adicionados 4 μ L do inserto, 1 μ L de *Salt Solution* e 1 μ L do vetor *pCR 2.1-TOPO*. Essa solução foi misturada cuidadosamente com uma micropipeta e incubada a 25°C durante 10 minutos.

Para as reações de transformação bacteriana, em um tubo esterilizado foram adicionados 50 μ L de bactérias *Escherichia coli* competentes (acondicionadas a -80°C) e 2 μ L da reação de ligação inserto-plasmídeo, misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Os tubos foram mantidos a 4°C por 5 minutos, seguido de um choque térmico a 42°C por 30 segundos. Os tubos foram novamente incubados a 4°C durante 2 minutos. Em cada amostra, foram adicionados 250 μ L de meio S.O.C. (2% Triptona, 10 mM NaCl, 0,5% de extrato de levedura, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM de glicose), à temperatura ambiente, seguida de uma incubação a 37°C por 1 hora, sob agitação horizontal a 200 rpm. O produto de transformação foi espalhado em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0.17 M, extrato de levedura 0.5%, ágar 1.5%, pH 7.5), contendo 50 μ g de ampicilina por mililitro de meio LB e 40 μ L de X-Gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil-(-D-galactoside) - 40mg/mL], para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). As placas foram incubadas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37°C por um período de 16 horas.

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, as colônias brancas (potencialmente portadoras do inserto de interesse) foram repicadas em meio sólido LB e submetidas às reações de amplificação (PCR). Nessa reação, foram utilizados os *primers* M13F (5'- AGCGGATAACAATTTCACACAGG- 3') e M13R (5'- CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') que anelam nas regiões flanqueadoras do local de inserção do fragmento no plasmídeo. Os clones de interesse, depois de identificados, foram estocados em freezer -80°C. Para a PCR dos clones, foram preparadas reações contendo uma fração de DNA, obtido diretamente da colônia, com auxílio de uma ponteira, 1 μ L de tampão de PCR 10X, 0.2 μ L de dNTPs (200 mM), 0.5 μ L de primer M13F (10 μ M), 0.5 μ L de primer M13R (10 μ M), 0.5 μ L de Taq DNA polimerase e 7.35 μ L de água estéril, totalizando um volume final de 20 μ L. A reação de amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos a 95° C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos (extensão da fita de DNA), seguidos de uma etapa de extensão final a 72° C por 5 minutos. A incorporação dos insertos, em cada amostra, foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X, contendo 3 μ L de brometo de etídio, durante 40 minutos a 100V.

O produto da RT-PCR para o gene beta-actina e os produtos da PCR de sequenciamento para o gene IGF-I foram enviados ao Serviço de Seqüenciamento disponível na Universidade.

5. Resultados parciais

Para a obtenção da sequência parcial do gene IGF-I, a RT-PCR foi realizada utilizando-se as combinações A-B, C-D, E-H, E-I, F-H, F-I, G-J entre os *primers* senso e antisenso, disponíveis para esse gene. Apenas a combinação de *primers* degenerados G-J resultou na amplificação de um produto de peso molecular esperado (aproximadamente 100 pares de bases) (Figura 1a). Esse produto de RT-PCR, referente ao IGF-I e visualizado em gel de agarose, foi clonado e sequenciado.

Para a obtenção da sequência parcial do gene beta-actina, a combinação dos *primers* senso e antisenso específicos resultou na amplificação de um produto de peso molecular esperado (aproximadamente 200 pares de bases) (Figura 1b). Esse produto de PCR foi diretamente seqüenciado.

Figura 1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (a) Produto da RT-PCR para o gene IGF-I, com aproximadamente 100 pares de bases (pb), obtido a partir dos *primers* G-J.
(b) Produto da RT-PCR para o gene beta-actina, com aproximadamente 200 pb. L: marcador de peso molecular (*ladder*) de 100 pb, N: controle negativo da reação.



Para o gene IGF-I, foram selecionadas oito colônias brancas, como prováveis portadoras de inserto. Após a eletroforese dos produtos de PCR dos oito clones para o IGF-I, apenas os clones 3 e 7, com peso correspondente a 300 pares de bases (referentes ao produto de PCR de 100 pares de bases e o peso do plasmídeo de 200 pares de bases) foram seqüenciados (Figura 2).

Figura 2. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, para confirmar a presença de insertos nos clones obtidos (1 a 8) para o gene IGF-I, expresso na musculatura branca do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Ladder (L) de 100 pares de base, N: controle negativo da reação.



Para o gene IGF-I, as sequências nucleotídicas obtidas, a partir dos clones 3 e 7, foram idênticas. Essas sequências e a sequência parcial obtida para o gene beta-actina foram submetidas ao banco de dados BLASTN (Altschul et al., 1997) do site NCBI (*National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast*), confirmando amplificação específica e alta similaridade com os mesmos genes descritos em outras espécies de vertebrados, incluindo os teleósteos.

As seqüências nucleotídicas $(5' \rightarrow 3')$ do IGF-I e beta-actina, expressas na musculatura do pacu, apresentaram 108 e 156 pares de bases, respectivamente. A sequência parcial do gene IGF-I foi submetida ao banco de dados do *Genbank* e seu número de acesso é HM561965. A sequência parcial do gene da beta-actina também foi submetida ao *Genbank*, mas seu número de acesso ainda não está disponível. Essa sequência está representada a seguir.

Seqüência parcial codificante do RNAm referente ao gene beta-actina

ACCCTGTCCTGCTCACAGAGGCTCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGA CCTTCAACGTCCCCGCCATGTATGTGGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTCTACGCCTCTGGCCGTACCACTGGTA TTGTTA

6. Conclusões sobre o estágio

O estágio de aperfeiçoamento no exterior me possibilitou conhecer diferentes metodologias utilizadas nos laboratórios do departamento, a rotina de trabalho, além de aprofundar meus conhecimentos na área de biologia molecular, com enfoque na técnica de RT-qPCR, clonagem e análise de sequências nucleotídicas. Esses conhecimentos contribuíram de forma significativa na execução dos experimentos de biologia molecular dessa tese de doutorado, além de permitir que eu contribuísse com alguns experimentos desenvolvidos no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado na UNESP-Botucatu. Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Marco Patruno por ter aceitado meu pedido de estágio, à Dra. Lisa Maccatrozzo pela dedicação na análise das sequências obtidas para o pacu e à Dra. Roberta Sacchetto por ter se

dedicado intensamente aos meus experimentos durante esses quatro meses. Além da experiência científica, agradeço pela inesquecível experiência de vida.

7. Referências

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., Patarnello, T., 2001. Characterization of the Myostatin Gene in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*): Sequence, Genomic Structure, and Expression Pattern. Mar. Biotechnol. 3, 224–230.
- Patruno, M., Maccatrozzo, L., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2006. Cloning and expression of insulinlike growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). Comp. Biochem. Physiol, 144 (B), 137–151.
- Patruno, M., Radaelli, G., Mascarello, F., Candia Carnevali, M.D., 1998. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. Anat Embryol. 198, 487-504.
- Patruno, M., Sivieri S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). Cell Tissue Res. 331, 643-658.
- Radaelli G., Rowlerson. A., Mascarello, F., Patruno, M., Funkenstein, B., 2003. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. Cell Tissue Res. 311, 239–250.
- Radaelli, G., Poltronieri, C., Bertotto, D., Funkenstein, B., Simontacchi, C., 2008. Cellular localization of insulin-like growth factor-II protein in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from hatching to adult. Histol. Histopathol. 23, 523-530.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapollo, P.A., 1990. Hyperplastic and hypertophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax:* an ultrastructural and morphometric study. Anat. Embriol. 182, 1-10.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A., Carnevali, C., 1993. Muscle growth and myosin isoform transitions during development of a small teleost fish, *Poecilia reticulata* (Peters) (Atheriniformes, Poeciliidae): a histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and morphometric study. Anat. Embryol. 187, 353-361.

Sperimentali Veterinarie Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie Università degli Studi di Padova

Legnaro, 6/05/2009

To whom it may concern.

This letter is written on behalf of Dr. Fernanda Losi who has spent almost four months in the laboratory of Anatomy and Physiology at the Department of Experimental Veterinary sciences from 19-01-09 to 6-05-09.

She has been supervised by Prof. Marco Patruno, lecturer at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Padua (Italy), in performing experiments regarding molecular and cellular biology useful for the improvement of her PhD thesis.

Sincerely,

Dr. Marco Patruno

Howsterro

Dr. M. Patruno Ph.D. (University of London) Dip. di Scienze sperimentali veterinarie (Agripolis) Viale dell'università16, 35020 Legnaro (Padova) e-mail: marco.pat@unipd.it

DIREZIONE E SEGRETERIA: Tel. 049.8272796 - Fax 049.8272669 POLO AMMINISTRATIVO: Tel. 049.8272601 - 049.8272961 - Fax 049.8272602 - Cod. Fise. 80006480281 - Part. IVA 00742430283

Agripolis - Strada Romea, 16 - 35020 LEGNARO (PD)

http://www.medvet.unipd.it/strutture/scienze_vet/index.htm

Anexo 2

Análise da expressão quantitativa do gene IGF-I na musculatura branca do pacu

Após a finalização das atividades de estágio no exterior, que resultou na obtenção da sequência parcial do gene IGF-I, expresso na musculatura branca do pacu, foi analisada a expressão quantitativa desse gene, por RT-qPCR, nas amostras de cDNA obtidas do músculo branco de pacus com 45, 90, 180, 400 dias após a eclosão e adultos (n=8 para cada grupo experimental), coletadas previamente. A partir da sequência do IGF-I obtida, foi desenhado um conjunto de *primers* senso (5'-TGTGTGGAGACAGAGGCTTTT-3') e antisenso (5'-GAAGGAGGGCCATAACCTGT-3'), utilizando-se o software *Primer Express* 3.0 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Os *primers* foram sintetizados comercialmente (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e diluídos em água ultrapura (Gibco - Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) para uma concentração final de 5 μ M.

A padronização da RT-qPCR e a análise da expressão gênica do IGF-I foram realizadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente para a expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e miostatina.

Resultados parciais e discussão

Os resultados referentes à expressão gênica do IGF-I, na musculatura branca do pacu, estão apresentados na Figura 1.

Os níveis de expressão do RNAm para o IGF-I foram semelhantes nos animais com 45 e 90 dias, diminuindo significativamente nos animais com 180 dias e adultos. Nos animais com 180 e 400 dias e adultos, a expressão do IGF-I foi semelhante. No grupo de 400 dias, a expressão de IGF-I também foi semelhante à dos animais com 45 e 90 dias (Figura 1).



Figura 1 – Expressão gênica quantitativa do IGF-I, na musculatura branca de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) com 45, 90, 180 e 400 dias (d) e adultos de dois anos de idade (n=8 para cada fase de crescimento). Os níveis de RNAm do IGF-I, obtidos por RT-qPCR, estão expressos em unidades arbitrárias. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene de referência RNA ribossomal 18S e o grupo de 45 d foi utilizado como calibrador.

As funções do IGF-I sobre o músculo esquelético são bem estabelecidas em mamíferos. O IGF-I está envolvido com a regulação do desenvolvimento e crescimento muscular devido às suas potentes ações metabólica e mitogênica (Reinecke & Collet, 1998; Florini et al., 1993, 1996; Musarò et al., 1999). O IGF-I regula as vias anabólicas do músculo esquelético, levando ao aumento ou manutenção da massa muscular (Otto & Patel, 2010). O aumento da massa muscular (hipertrofia) pode ocorrer pela incorporação de núcleos de células satélites, em proliferação, às fibras musculares em crescimento ou em regeneração (Florini et al., 1993, 1996; Musarò et al., 1999) e pelo aumento nos níveis de proteínas dentro da fibra muscular (Otto & Patel, 2010). A manutenção da massa muscular, mediada pelo IGF-I, ocorre pela inibição das vias da atrofia muscular, impedindo a degeneração e a perda de massa muscular (Otto & Patel, 2010).

O gene do IGF-I tem sido caracterizado em várias espécies de peixes (Reinecke et al., 1997; Moriyama et al., 2000; Patruno et al., 2006) e sua expressão tem sido observada em vários órgãos, como cérebro, brânquias, coração, intestino, fígado, rins (Vong et al., 2003), e

fases de crescimento, desde larvas até adultos (Patruno et al., 2008). Em relação ao músculo esquelético, o efeito mitogênico do IGF-I foi descrito em modelos de cultura de mioblastos ou células satélites do *zebrafish* (Pozios et al., 2001), truta arco-íris (Castillo et al., 2004), *Sparus aurata* (Funkenstein et al., 2006) e salmão (Bower & Johnston, 2010).

De acordo com a análise morfométrica, apresentada nesse trabalho, a hiperplasia foi o principal mecanismo de crescimento muscular nos animais com 45 dias, onde foi observada uma alta frequência de fibras brancas com diâmetro menor que 20 µm, caracterizando o recrutamento de novas fibras musculares (Rowlerson & Veggetti, 2001). Os níveis de RNAm para o IGF-I, observados nesse período, podem estar relacionado com a ação mitogênica do IGF-I em estimular a proliferação de células satélites, que sofreriam fusão para formar novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em novas fibras musculares (Koumans & Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowlerson & Veggetti, 2001).

Durante a fase juvenil, como nos animais com 45 dias, a hiperplasia é o mecanismo de crescimento predominante, em relação à hipertrofia (Almeida et al., 2008). Nessa fase, foram observadas a hiperplasia estratificada, responsável pelo espessamento dos compartimentos musculares, e a hiperplasia em mosaico, onde a formação de novas fibras musculares ocorre por toda a extensão do miótomo a partir da proliferação, fusão e diferenciação das células satélites. A hiperplasia em mosaico contribui para o crescimento muscular de espécies de peixes de interesse comercial na aqüicultura que atingem um grande tamanho final (Rowlerson & Veggetti, 2001), como o pacu. A evidência da ocorrência da hiperplasia em mosaico, de acordo com a análise morfométrica, é a observação, em cortes transversais do músculo esquelético, de um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação (Johnston, 1999; Rowlerson & Veggetti, 2001). De acordo com nossos resultados, Patruno et al. (2006) observaram um pico de expressão do RNAm do IGF-I no teleósteo *Umbrina cirrosa* com 15 dias após a eclosão, sugerindo a contribuição do IGF-I no crescimento muscular por hiperplasia estratificada e em mosaico.

Nos animais de 90, 180 e 400 dias, foi observada uma alta freqüência de fibras com diâmetro entre 20 e 50 μ m, indicando uma diminuição na intensidade da hiperplasia e o início dos processos de diferenciação das fibras musculares recém-formadas e de hipertrofia. Assim, nesses animais, tanto a hiperplasia como a hipertrofia contribuíram para o crescimento

muscular. Os níveis de expressão do gene IGF-I, detectados nesses animais, podem estar relacionados com o estímulo para a proliferação de células satélites que podem sofrer fusão para formar novas fibras musculares (hiperplasia) ou fundirem-se a uma fibra muscular já diferenciada, aumentando o número de núcleos e a síntese de miofibrilas, resultando no aumento do diâmetro da fibra muscular (hipertrofia) (Koumans & Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowlerson & Veggetti, 2001).

Os animais adultos apresentaram uma baixa freqüência de fibras com diâmetro menor que 20 μ m e uma alta freqüência de fibras com diâmetro maior que 50 μ m. Assim, nessa fase de crescimento, a hiperplasia foi menos significativa e a hipertrofia foi o principal mecanismo que contribuiu com o crescimento muscular, uma vez que fibras com diâmetro maior que 50 μ m caracterizam a hipertrofia (Rowlerson & Veggetti, 2001). Os níveis de RNAm do IGF-I, observados nessa fase, podem estar relacionados com o estímulo da proliferação de células satélites que contribuíram, principalmente, com a hipertrofia muscular.

As células satélites sofrem influência de uma grande variedade de moléculas, como hormônios e fatores de crescimento e de transcrição, resultando na sua ativação, proliferação e diferenciação (Hawke & Garry, 2001). Além do IGF-I, a ativação das células satélites pode ser sinalizada pela expressão dos fatores de regulação miogênica, como a MyoD e a miogenina.

De acordo com nossos resultados, a MyoD e o IGF-I podem estar envolvidos com a proliferação de células satélites, enquanto a miogenina deve estar controlando a sua diferenciação, durante a hiperplasia e/ou hipertrofia, dependendo da fase de crescimento considerada. Assim, de acordo com os nossos resultados, a MyoD, o IGF-I e a miogenina podem estar envolvidos com o crescimento muscular do pacu durante as fases analisadas.

Na literatura, observa-se uma grande variação dos resultados em relação ao padrão de expressão dos MRFs e do IGF-I na musculatura, dependendo da espécie considerada, da fase de crescimento e das condições ambientais e experimentais utilizadas. A regulação desses fatores de crescimento pode ser variável de acordo com o estágio de crescimento, condições ambientais, comportamento natatório da espécie, mecanismos de crescimento e tamanho final alcançado pelo animal adulto (Patruno et al., 2008).

Na literatura, a maioria dos estudos envolve a caracterização dos genes MyoD, miogenina e IGF-I e seu padrão de expressão nas fases inicias do desenvolvimento e pouquíssimos trabalhos relacionam a expressão dessas moléculas com o crescimento muscular em peixes. Esse estudo mostra, pela primeira vez na literatura, a expressão quantitativa dos genes MyoD, miogenina e IGF-I durante o crescimento muscular do pacu, espécie de grande importância comercial na aqüicultura brasileira.

Referências

- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. Micron 39, 1306-1311.
- Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and Insulin-Like Growth factors during myogenesis in atlantic salmon. PLoS ONE 5, e11100.
- Castillo, J., Codina, M., Martínez, M.L., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2004. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 286, 935-941.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., Magri, K.A., Mangiacapra, F.J., 1993. IGFs and muscle differentiation. Adv. Exp. Med. Biol. 343, 319-26.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., Coolican, S.A., 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. Endocr. Rev. 17, 481-517.
- Funkenstein, B., Balas, V., Skopal, T., Radaelli, G., Rowlerson, A., 2006. Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. Tissue and Cell 38, 399-415.
- Hawke, T.J., Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J. Appl. Physiol. 91, 534-551.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. Aquaculture 177, 99-115.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. Comp. Biochem. Physiol. 110, 3-20.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 1553-1562.
- Musarò, A., Mccullagh, K.J., Naya, F.J., Olson, E.N., Rosenthal, N., 1999. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. Nature 400, 581-585.
- Otto, A., Patel, K., 2010. Signalling and the control of skeletal muscle size. Exp. Cell Res. 316, 3059-3066.
- Patruno, M., Maccatrozzo, L., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2006. Cloning and expression of insulinlike growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 137, 137–151.
- Patruno, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., Radaelli, G., 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). Cell Tissue Res. 331, 643-58.
- Pozios, K.C., Ding, J., Degger, B., Upton, Z., Duan, C., 2001. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280, 1230–1239.
- Reinecke, M., Collet, C., 1998. The phylogeny of the insulin-like growth factors. Int. Rev. Cytol. 183, 1–94.

- Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., Loffin-Cueni, D., 1997. Insulin like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene sequence, tissue expression, and cellular localization. Endocrinology 138, 3613–3619.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 103-139.
- Vong, Q.P., Chan, K.M., Cheng, C.H., 2003. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. J. Endocrinol. 178, 513-521.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. J. Fish Biol. 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors, in: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 19-41.

8. Conclusões e considerações finais

A hiperplasia em mosaico foi observada em todos os grupos experimentais. Nos animais com 45 dpe também foi observada a hiperplasia estratificada. Nos animais adultos, a hipertrofia foi o mecanismo de crescimento predominante.

Os genes MyoD, miogenina e IGF-I apresentaram expressão diferencial, no músculo branco do pacu, de acordo com a idade. Nos adultos, a expressão de MyoD, miogenina e miostatina foi semelhante entre os músculos branco e vermelho.

As fases iniciais de crescimento do pacu, nas quais a hiperplasia é significativa, e os animais de 180 dias, que apresentaram um pico de expressão dos genes MyoD e miogenina, na musculatura branca, podem ser investigados para a aplicação de estratégias que potencializem o crescimento muscular, como diferentes protocolos de alimentação e aplicação de fatores de crescimento, beneficiando o produtor na obtenção de animais saudáveis, com rápido crescimento e alto rendimento de filé.

Os resultados obtidos nesse estudo podem servir de referência para a obtenção das sequências gênicas expressas em outras espécies brasileiras de peixes e auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos regulatórios do crescimento muscular.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Botucatu



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **74/07-CEEA**, sobre "Expressão gênica e protéica dos fatores de regulação miogênica (MRFs) no tecido muscular esquelético do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) durante o crescimento", sob a responsabilidade de **MAELI DAL PAI SILVA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da *COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA), nesta data.

Prof. Dr. MARCELO RAZERA BARUFFI Presidente - CEEA

Botucatu, 15 de fevereiro de 2008.

NADIA JOVÊNCIO COTRIM Secretária - CEEA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "Expressão gênica de fatores que controlam o crescimento muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*: Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, sob Protocolo(s) n° 74/07-CEEA.

* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Fernanda hori alves de almeida

Aluno: Fernanda Losi Alves de Almeida

alail: Darkis Orientador: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (X) Deferido () Indeferido

Guardol round Nome Funcão:

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP