



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

FERNANDA REGINA CARANI

**“EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE FATORES
REGULADORES MIOGÊNICOS E DA MIOSTATINA
NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DO PIRARUCU
(*Arapaima gigas*) DURANTE O CRESCIMENTO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Fernanda Regina
Carani
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.

Maeli Dal Pai Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva

Campinas, 2011

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

C176e

Carani, Fernanda Regina

Expressão gênica e protéica de fatores reguladores miogênicos e da miostatina no músculo esquelético do pirarucu (*Arapaima gigas*) durante o crescimento / Fernanda Regina Carani. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Maeli Dal Pai Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Crescimento muscular. 2. Fatores de regulação miogênica. 3. Miostatina. 4. *Arapaima gigas*. 5. Reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa. 6. *Western blot*. I. Silva, Maeli Dal Pai. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Gene and protein expression of myogenic regulatory factors and myostatin in skeletal muscle of pirarucu (*Arapaima gigas*) during growth.

Palavras-chave em inglês: Skeletal muscle growth; Myogenic regulatory factors; Myostatin; *Arapaima gigas*; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; *Western blot*.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maeli Dal Pai Silva, Elaine Minatel, João Batista Kochenborger Fernandes, Leonardo Susumu Takahashi, Fernanda Antunes Alves da Costa.

Data da defesa: 29/04/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 29 de abril de 2011.

BANCA EXAMINADORA

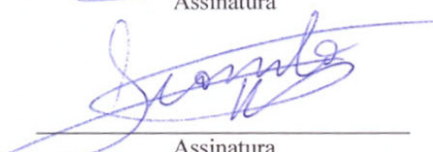
Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Elaine Minatel


Assinatura

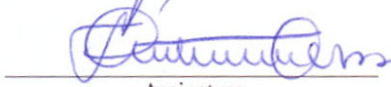
Prof. Dr. Leonardo Susumu Takahashi


Assinatura

Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes


Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Antunes Alves da Costa


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Assinatura

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Assinatura

Profa. Dra. Maria Célia Portella

Assinatura

*"Não sei... se a vida é curta ou
longa demais para nós, Mas sei
que nada do que vivemos tem
sentido, se não tocarmos o coração
das pessoas."*

Cora Coralina



*"Tudo o que puderes fazer ou creias poder fazer, comece. A ousadia tem
gênio, poder e magia."*

Goethe

Dedico...

É com muito orgulho e satisfação que dedico este trabalho a mim, Fernanda, e às pessoas que me ajudaram, por tamanha dedicação, persistência e perseverança na condução deste Projeto. Por acreditar ser possível estudar o pirarucu, uma espécie de tamanha importância e com encanto próprio, superando barreiras físicas e ambientais para alcançá-lo.

Dou início ao curso de minha vida, apenas levando a certeza de encontrar degraus, os quais galgarei passo a passo, ritmados e reforçados por aquilo que aprendi!

Concluo este trabalho, na certeza de que ele foi feito com amor!

Aquela que se torna Doutora.

“Ser grato é um grande atributo da alma humana. A gratidão é um sentimento que quando cultivado credencia os seres para viver em um plano que não pode ser vivido sem a presença de tão nobre sentimento.”

Agradeço...

... à minha orientadora querida, Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pessoa pela qual tenho muita admiração e na qual me inspiro dia após dia, ano após ano. Com tamanha sabedoria, competência e profissionalismo, é de longe um exemplo a ser seguido. Sua contribuição em minha vida profissional e pessoal não pode ser resumida neste pequeno espaço, mas posso dizer com toda certeza que você foi a grande responsável pela pessoa que sou hoje e pela conclusão de mais este trabalho, que marca o fim de uma bela história e o início de outra melhor ainda!

Por isso, e simplesmente por isso, serei eternamente grata a você!

Fernanda

29 de Abril de 2011

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente, à DEUS, por me acompanhar a cada etapa cumprida, por me guiar em cada obstáculo a superar, mas, principalmente, obrigada DEUS, por fazer valer a pena pelo simples fato de me conceder a vida!

À minha Mãe, Cleide, por nos permitir, a mim e às minhas irmãs, a oportunidade de estudar, e por nos dar parte de sua própria vida para que a nossa existência tivesse algum sentido! Por proporcionar uma boa infância e vida acadêmica, e, principalmente, por formar os fundamentos do meu caráter, nada do que disser aqui será suficiente para expressar minha eterna gratidão por você... Obrigada pelo apoio, compreensão e pelas sábias orientações! Jamais me esquecerei de tudo que sempre fez por mim na tentativa de ajudar a realizar meus sonhos. À minha querida Mãe, a quem tudo devo, o meu eterno agradecimento!!

Às minhas irmãs queridas, Lílían e Carolina, em quem me inspiro como exemplos de garra, união e esperança, obrigada pelo carinho, compreensão, incentivo, torcida e, acima de tudo, obrigada por fazerem parte da minha vida! Vocês são muito especiais para mim! Que Deus ilumine vocês onde quer que estejam!

Ao Edison Luiz Gruppi, pelo carinho, apoio, dedicação, torcida, e, principalmente, por me mostrar que o verdadeiro encanto da vida está na simplicidade com que a vemos e na humildade com que a vivemos, dia após dia, sem se preocupar com o amanhã. Obrigada, acima de tudo, por ter feito a diferença e por fazer parte da minha família!

À minha família tão querida e que sempre esteve ao meu lado em mais esta etapa da minha vida. Obrigada aos meus avós Brasília (*in memorian*), Arlete, Edi e Ruth, pelo exemplo de vida que vocês são! Obrigada às minhas queridas tias Christina e Fernanda, tios Claudinei (*in memorian*) e José Nelson, primas Paula, Mariáh e Malvina, primos Paulo,

Caio, Igor, Fernando e Bernardo, à querida Luciana e Raul, e a todos que torceram por mim!

À minha amiga querida Caroline Nebo (Cul666l!!!) pela amizade, companheirismo, pelos momentos alegres e divertidos, pelas risadas cativantes e, acima de tudo, por ter feito parte de tudo isto! “Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha...” Obrigada por me acompanhar!!

À minha querida amiga Fernanda Losi Alves de Almeida (digo...Almeida!), pelo carinho, companheirismo, compreensão, pelos momentos alegres e divertidos, cantando e dançando como duas loucas, pelos momentos vividos durante os levíssimos treinos do Edson, mas, acima de tudo, obrigada pelo carinho e pela amizade compartilhada por todos esses anos... Muito obrigada Feleee, minha M.A.T. (Minha Amiga Tilida)!!!

À minha querida amiga de sempre, Raquel Bertaglia, pela amizade verdadeira em todos estes anos... Reencontrá-la depois de tanto tempo foi algo que me marcou profundamente! Continue sendo essa menina meiga, verdadeira e, acima de tudo, tão especial! Saiba que te adoro muito!!!!

Ao meu “orientadinho” Bruno Oliveira da Silva Duran, pela amizade, pela dedicação, pelo extremo esforço e competência, e por ser tão solidário nos momentos em que mais precisei! Muito obrigada!!

Às minhas amigas do coração, Aline e Sueli Michelin, por quem tenho um carinho todo especial... Obrigada pela compreensão, pelos momentos divertidos, por me orientarem quando cheguei ao Departamento, mas, acima de tudo, obrigada pela amizade compartilhada por todos estes anos! Adoro vocês!!

Ao Edson Celestrino de Oliveira, meu treinador, pela amizade, carinho, persistência, e por acreditar em mim. Por tudo o que tem feito nestes 2 anos, e por ter tornado minha vida melhor, serei sempre grata a você!

Como não poderia deixar de ser, é claro, agradeço também aos meus “bebelinos”, Bruno, Lara e Susi, meus 3 salsichinhas do coração, pela paixão e pelo amor incondicionais!

Dizem por aí que os verdadeiros amigos a gente conta nos dedos de uma mão... Os meus estão aqui, expostos neste pequeno espaço acima e para sempre dentro do meu coração!

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente para que a realização deste trabalho fosse possível. MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val (INPA, Manaus, AM), pelo carinho, competência, profissionalismo e pela disposição em colaborar com este trabalho.

Aos professores Dra. Elaine Minatel, Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, Dr. Leonardo Susumu Takahashi e Dra. Fernanda Antunes Alves da Costa pela valiosa contribuição na participação da Banca de Defesa do Doutorado.

Aos docentes do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, pela contribuição para meu desenvolvimento profissional, pelo apoio e pela amizade.

Aos amigos do Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu, pela amizade, companheirismo, pelos momentos de descontração e pela convivência no dia-a-dia (Andreo Aguiar, Caroline Nebo, Edson Mareco, Fernanda Losi, Flávia Delella, Francis Pacagnelli, Henrique, Ivan Vechetti, Joyce Reissler, Juliana Giusti, Luana, Ludimila Cabeço, Paula Souza, Raquel Bertaglia, Raquel Milanezi, Robson Carvalho, Rodrigo Souza, Vander Santos, Warlen Piedade)

À Dra. Fernanda Antunes Alves da Costa, pós-doutoranda do Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu, pela grande competência, pela amizade cultivada, pelo bom humor e por todos os momentos compartilhados! Obrigada Fer!

Ao técnico Ricardo Teixeira pela competência, amizade e pela gentileza em ajudar na coleta dos pirarucus! Quer dar um “pulinho” até Uirapuru?

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pelo auxílio com as análises estatísticas.

À querida Luciana Cristina Montes, secretária do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, pela disposição em sempre ajudar da melhor forma possível, pela competência e pela amizade desenvolvida.

Ao Sr. Gilberto Rabelo de Resende, proprietário da Piscicultura Fazenda Liberdade, Uirapuru, GO, pela gentileza e disposição em fornecer os exemplares de pirarucu.

Ao Sr. Martinho Colpani, proprietário da Piscicultura Águas Claras, Mococa, SP, pela gentileza e disposição em fornecer os exemplares alevinos de pirarucu.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, UNICAMP, Campinas, SP, por permitir minha formação e a conquista do título.

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

À querida Lílíam Alves Senne Panagio, secretária do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, UNICAMP, pela competência, dedicação, entusiasmo e, é claro, pelo carinho oferecido ao longo destes anos!

À CAPES/PROEX pelo Auxílio financeiro concedido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos Auxílios concedidos (Proc. N° 304070/2009-2 e 474084/2009-4).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado e Auxílio concedidos (Proc. N° 2007/59584-0 e 2007/58896-9).

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	17
2. INTRODUÇÃO.....	19
2.1. Características Gerais do Músculo Estriado Esquelético	19
2.2. Formação das Fibras Musculares: Miogênese	25
2.3. Crescimento Muscular Pós-natal	27
2.4. Controle Molecular da Miogênese e do Crescimento Muscular	31
2.4.1. Fatores Reguladores Miogênicos (MRFs)	31
2.4.2. Fatores de Crescimento: IGF-I e Miostatina.....	34
2.5. O <i>Arapaima gigas</i>	41
3. HIPÓTESES.....	43
4. OBJETIVOS.....	43
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
5.1. Modelo Experimental e Coleta das Amostras.....	43
5.2. Análise Morfológica	44
5.3. Análise Morfométrica	44
5.4. Expressão Gênica de MyoD, Miogenina e Miostatina.....	44
5.4.1. Extração e Quantificação do RNA, Análise da Qualidade e TR.....	45
5.4.2. Padronização da PCR Tradicional.....	47
5.4.3. PCR Quantitativa e Expressão Gênica Relativa.....	48
5.5. Expressão Protéica de MyoD, Miogenina e Miostatina.....	50
5.5.1. Extração, Quantificação e Eletroforese de Proteínas	50
5.5.2. Padronização do Western Blot	51
5.5.3. Análise Densitométrica e Normalização dos Resultados.....	52
5.6. Análise Estatística dos Resultados	52
6. RESULTADOS.....	55
6.1. Artigo 1	55
“Quantitative expression of growth-related genes in skeletal muscle of pirarucu juveniles (<i>Arapaima gigas</i>).”	
6.2. Artigo 2	79
“Cellularity and expression of growth-related factors in skeletal muscle of pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) during growth.”	
7. CONCLUSÕES	115
8. ANEXO I: Aprovação do Projeto pelo CEEA	116
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	118

RESUMO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) caracteriza-se como uma espécie promissora para a Aquicultura, devido principalmente às suas características de rápido crescimento e rusticidade. Sua criação em regime intensivo tem obtido enorme sucesso, podendo alcançar até 10 quilos de peso corporal em apenas um ano de criação. O pirarucu é considerado hoje uma das mais importantes espécies de peixes da bacia Amazônica e, por esta razão, é primordial que se investigue os mecanismos celulares e moleculares que controlam o rápido crescimento muscular, contribuindo com novas estratégias de criação e com a manutenção da espécie. O crescimento do músculo estriado esquelético nos peixes pode ocorrer por dois mecanismos: hipertrofia e/ou hiperplasia das fibras, a partir de células satélites ou mioblastos. Esse processo é controlado por Fatores Reguladores Miogênicos (MRFs) e pelo fator de crescimento Miostatina. O objetivo do presente estudo foi avaliar as características morfológicas e o crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico, bem como analisar a expressão gênica e protéica da MyoD, da Miogenina e da Miostatina na musculatura esquelética do pirarucu (*A. gigas*), em diferentes fases de crescimento. Os animais utilizados no presente estudo foram provenientes de duas pisciculturas: na primeira, foram obtidos os “alevinos” (pós-larvas; 48 g); na segunda, os animais em diferentes estágios de crescimento, divididos em quatro grupos de acordo com o peso corporal. Grupo A (50 gramas, n=7), grupo B (420 gramas, n=7), grupo C (5,5 quilogramas, n=7) e grupo D (9,1 quilogramas, n=7). As amostras musculares foram coletadas, congeladas e submetidas à coloração HE, para avaliação do padrão morfológico das fibras, e à reação para a enzima NADH-TR, para avaliar o metabolismo oxidativo das fibras. Para avaliar o padrão de crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura branca, foi calculado o menor diâmetro de uma população de fibras por animal, e estas foram distribuídas em classes, na dependência do seu diâmetro. A análise da expressão gênica de MyoD, miogenina e miostatina foi feita por Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (RT-qPCR); para análise da expressão protéica, foi utilizado o Western Blot. A distribuição das fibras em classes de diâmetro exibiu o seguinte padrão: o grupo A mostrou a maior parte das fibras na classe 20, o grupo B, na classe 50, o grupo C, nas classes 50 e 80, e o grupo D, na classe 80. Isso indica uma alta taxa de hiperplasia das fibras nos grupos menores (A e B)

e alta hipertrofia das fibras nos grupos maiores (C e D). Para a análise da expressão gênica de MyoD e miogenina no músculo vermelho e branco dos “alevinos”, não houve diferença estatística; para a miostatina, houve expressão diferencial, com os maiores níveis encontrados no músculo branco em comparação com o músculo vermelho. Na avaliação da expressão de MyoD e miogenina, tanto a expressão gênica como a expressão protéica não mostraram diferença significativa. Por outro lado, a expressão gênica da miostatina foi menor no grupo A e maior nos demais, e a expressão da proteína miostatina foi maior no grupo A, diminuindo nos demais grupos. Estes resultados refletem as características de crescimento muscular da espécie e sugerem que a expressão dos MRFs e da miostatina são responsáveis pelo balanço entre a hiperplasia e a hipertrofia das fibras, contribuindo para o rápido crescimento da espécie e a manutenção das características do filé.

ABSTRACT

Pirarucu (*Arapaima gigas*) is a promising fish species for Aquaculture programs mainly by the fast growing feature and rusticity. Their rearing under intensive conditions generated much successful results, as they reach up to 10 kilograms in just one year. Considered one of the most important fish species from Amazon basin, it is of primary interest to investigate the cellular and molecular mechanisms that control the fast muscle growth in pirarucu, providing information for new rearing strategies and species conservation. In most fish, skeletal muscle growth occurs by two mechanisms: hypertrophy and hyperplasia, from satellite cells or myoblasts. These process are under control by Myogenic Regulatory Factors (MRFs) and by the growth factor Myostatin. The animals were obtained from two pisciculture, where we got the alevin pirarucu (n=7; 48 grams weight), and the specimens at different growth stages, divided into groups according body weight. Group A (50 grams, n=7), group B (420 grams, n=7), group C (5,5 kilograms, n=7) and group D (9,1 kilograms, n=7). Muscle samples were collected, frozen and stained with HE for morphological analysis, and submitted to NADH-TR enzyme reaction for oxidative methabolism analysis. To evaluate hyperplasic and hypertrophic muscle growth, it was measured the smallest diameter from a set of fibers, which were grouped into diameter classes. Gene expression analysis of MyoD, Myogenin and Myostatin were performed by Quantitative Polimerase Chain Reaction after Reverse Transcription (RT-qPCR); protein content analysis was by Western Blot technique. Muscle fibers distribution in classes showed the following pattern: group A showed most fibers in class 20, group B, in class 50, group C, in classes 50 and 80, and group D, in class 80. This is an indicative of high fiber hiperplasia rate in groups A and B, and high hypertrophy in groups C and D. There was no statistical difference in MyoD and Myogenin genes expression in red and white muscles of pirarucu; however, Myostatin expression showed high levels in white muscle compared to red muscle. Evaluating MyoD and Myogenin expression in white muscle of pirarucu at different growth stages, both gene and protein levels were similar. Myostatin gene expression was low in group A and high in the other groups; on the other hand, Myostatin protein was high in group A and low in the other groups. These results reflect the muscle growth characteristics in pirarucu and suggest that the MRFs and Myostatin expression are

controlling the balance between hyperplasic and hypertrophic mechanisms, promoting the fast rate feature of pirarucu and their fillet quality.

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Estudos revelam que entre os anos de 2003 e 2009 houve um aumento no consumo de pescado no Brasil de 6,46 kg para 9,03 kg por habitante/ano, o que representou um aumento de 39,78% nos últimos sete anos (fonte: www.mpa.gov.br). Cada vez mais o brasileiro tem inserido a carne de peixe em sua dieta e isso implica em uma alimentação mais saudável, rica em proteínas e minerais, como o cálcio, fósforo e cobalto, além das vitaminas A, D e B. Em geral, a carne de peixe apresenta menor teor de gordura e contém os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, que ajudam a diminuir o risco de doenças cardiovasculares, além de ajudar a reduzir a pressão arterial, o nível de colesterol ruim, colesterol total e triglicérides, e melhorar a imunidade (Revista FiB, volume 8, 2009). Nessa linha de raciocínio, temos na piscicultura uma ótima oportunidade para promover o desenvolvimento sustentável da pesca, estimulando a produção, a inclusão social e a melhora na qualidade alimentar da população brasileira.

O pirarucu, *Arapaima gigas*, peixe exclusivo da bacia Amazônica, é uma espécie de elevado interesse econômico, apresentando uma das melhores perspectivas para a criação em regime intensivo, podendo atingir até 10 kg em 1 ano. É um dos mais importantes recursos pesqueiros da região, considerado um dos elos entre o mundo primitivo e a idade moderna. Devido a sua rusticidade, alto valor de mercado, excelente sabor da carne, seu grande porte e extraordinário desenvolvimento ponderal, o pirarucu constitui uma espécie com grande potencialidade para a piscicultura.

Aliando-se a importância ecológica de espécies de peixes nativas ao fato de que, para o bom funcionamento da piscicultura é necessário o conhecimento adequado da biologia da espécie utilizada, torna-se fundamental o entendimento da fisiologia desses peixes e como eles interagem e respondem aos mais diversos estímulos, sejam eles originários do ambiente natural ou do ambiente de cultivo.

Neste sentido, para que haja um melhor aproveitamento do pirarucu na piscicultura, bem como sua exploração de forma racional, é importante a realização de estudos que

investiguem as características morfológicas e do crescimento do músculo estriado esquelético, principal constituinte do filé de peixe.

O músculo esquelético é um tecido complexo, dinâmico e possui características peculiares de adaptação morfológica, metabólica e funcional frente aos mais variados estímulos. Nos peixes, o músculo esquelético pode ocupar de 40 a 75% da massa corporal total e essa abundante massa muscular não representa somente um mecanismo específico para a adaptação desses animais ao meio aquático, mas serve também como importante fonte de proteínas utilizada na alimentação.

O crescimento pós-natal do tecido muscular nos peixes envolve os mecanismos de hipertrofia e hiperplasia das fibras, a partir da proliferação dos mioblastos indiferenciados ou células satélites. Na hipertrofia, as células satélites se fundem a fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, enquanto que, na hiperplasia, ocorre a formação de novas fibras musculares. Quando a hiperplasia está ocorrendo, observa-se um mosaico de fibras com diferentes diâmetros (fibras grandes e pequenas associadas), e predominam fibras com diâmetro menor que 25 μm . Esse padrão de organização das fibras é melhor observado na musculatura branca.

A contribuição da hipertrofia e da hiperplasia no crescimento do tecido muscular pode variar de acordo com a espécie e a fase de crescimento estudadas. Nos mamíferos, a hiperplasia cessa em um curto período de tempo após o nascimento. Nos peixes que atingem um tamanho pequeno, o crescimento muscular pós-natal ocorre principalmente por hipertrofia das fibras e a hiperplasia ocorre somente nas fases iniciais do desenvolvimento. Por outro lado, nas espécies de peixe com rápido crescimento e que atingem um tamanho grande a hiperplasia das fibras estende-se por um período de tempo mais prolongado. Esses processos de crescimento muscular são regulados por diversos fatores, entre eles fatores transcricionais músculo-específicos, como a MyoD e a Miogenina, e fatores de crescimento responsáveis pelo controle negativo, como a Miostatina.

Considerando a extraordinária dinâmica de crescimento do pirarucu e a importância do tecido muscular para a espécie e para a população, vemos no seu estudo uma rica fonte de informações que poderão contribuir com a elaboração de novas estratégias de criação que beneficiem o aumento da produção, garantindo, assim, a conservação da espécie.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Características Gerais do Músculo Estriado Esquelético

O tecido muscular estriado esquelético é um tecido complexo, dinâmico e possui características peculiares de adaptação morfológica, metabólica e funcional frente aos mais variados estímulos (Pette & Staron, 2000). Esse tecido é formado por células modificadas e altamente especializadas, as fibras musculares, que são alongadas e multinucleadas, com núcleos periféricos, localizados abaixo da membrana plasmática (Figura 1). O diâmetro das fibras musculares pode variar de 10 a 100 μm e o comprimento pode atingir 10 cm, dependendo da arquitetura do músculo (Dal Pai-Silva *et al.*, 2005). O citoplasma das fibras, conhecido como sarcoplasma, é constituído em sua totalidade por miofibrilas, que apresentam estriações transversais, decorrentes da organização das proteínas e filamentos contráteis em unidades de contração, denominadas sarcômeros (Huxley, 1969).

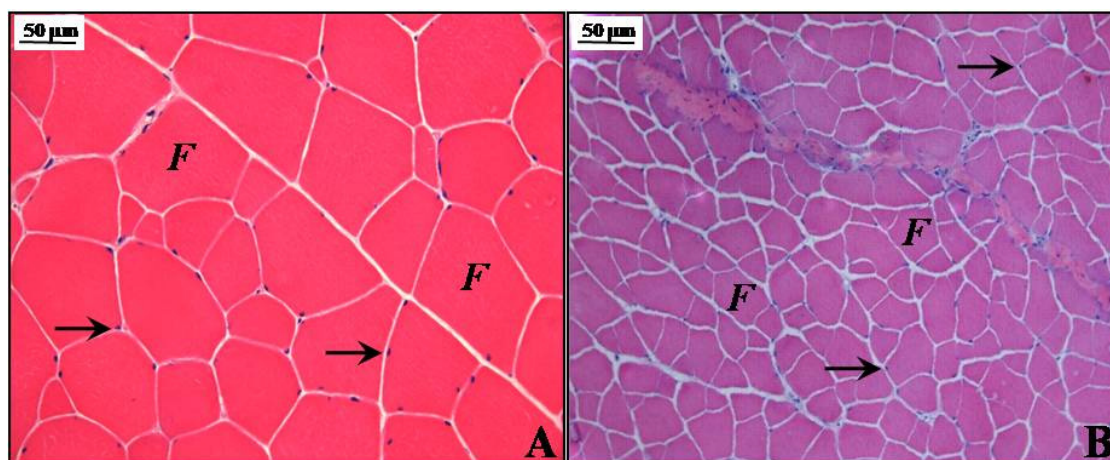


Figura 1: Corte transversal de músculo estriado esquelético, corado com Hematoxilina-Eosina. (A) Músculo *Semitendinosus* de bovino (*Bos indicus* X *Bos taurus*). (B) Músculo branco de peixe (*Arapaima gigas*). Fibras musculares (F) e mionúcleos com localização periférica (setas). (adaptados de Carani *et al.*, 2006 e 2008, respectivamente)

Nos peixes, o músculo estriado esquelético pode ocupar de 40 a 75% da massa corporal total. Essa abundante massa muscular não representa somente um mecanismo específico para a adaptação desses animais ao meio aquático, mas serve como importante fonte de proteínas utilizada na alimentação humana (Weatherley & Gill, 1985).

Na maioria das espécies de peixes, o músculo esquelético é constituído por unidades morfofuncionais, os miômeros, que possuem formato em “W” e se repetem ao longo de todo o comprimento do corpo, estando inseridos por curtos tendões em bainhas de tecido conjuntivo, os chamados miosseptos (Alexander, 1969) (Figura 2). Essa disposição em unidades verticais repetidas confere a esses animais uma maior mobilidade e destreza durante a realização dos movimentos ondulatórios da natação (Van Leeuwen, 1999).

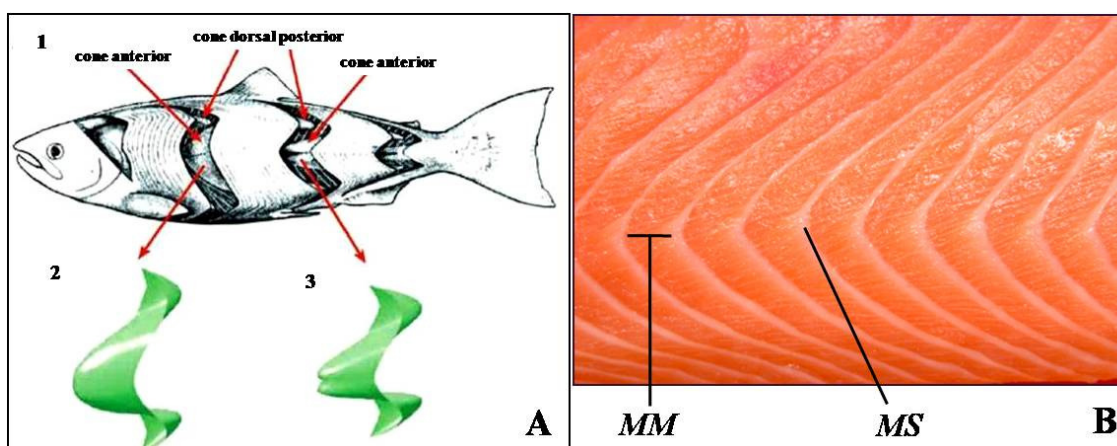


Figura 2: (A) Esquema representando a organização anatômica da musculatura esquelética nos peixes. (1): Localização dos miômeros e miosseptos. (2): Detalhe do miômero da região anterior. (3): Detalhe do miômero da região posterior (adaptado de Van Leeuwen, 1999). (B) Imagem de um corte da musculatura esquelética de peixe, conhecido popularmente como filé. Notar em destaque os miômeros (MM) e miosseptos (MS).

Na região onde se encontra o nervo da linha lateral, um septo de tecido conjuntivo, o septo transversal, separa a massa muscular em regiões epiaxial e hipoaxial (Alexander, 1969; Greer Walker & Pull, 1975).

Nos mamíferos, as fibras musculares estão envoltas por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, constituindo o tecido conjuntivo do músculo, que está organizado em três bainhas: epimísio, que circunda todo o músculo, perimísio, que divide o

músculo em fascículos de fibras, e endomísio, que circunda cada fibra muscular individualmente (Sanes, 2003; Kjaer, 2004) (Figura 3).

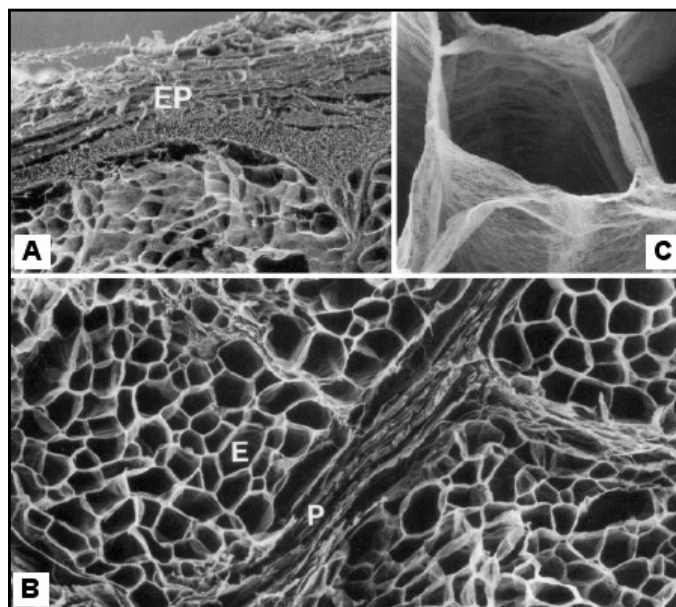


Figura 3: Estrutura da matriz extracelular do músculo esquelético de mamíferos. Músculo *Semitendinosus* de bovino após remoção das proteínas das fibras musculares. A: Epimísio (EP); B: Perimísio (P) e Endomísio (E); C: Detalhe do endomísio circundando uma fibra muscular esquelética. Microscopia eletrônica de varredura. (adaptado de Kjaer, 2004)

Por outro lado, nos peixes, a distribuição do tecido conjuntivo no músculo esquelético é específica para cada espécie e a concentração de colágeno também varia na dependência do comportamento do animal, da atividade realizada durante os movimentos natatórios e da fase de crescimento estudada (Sato *et al.*, 1986; Ando *et al.*, 1992; Ofstad *et al.*, 1996; Michelin *et al.*, 2009). Nas espécies de peixes, o tecido conjuntivo ao redor de cada fibra muscular recebe o nome de endomísio, e o tecido conjuntivo mais espesso que separa as fibras musculares em grupos é classificado como perimísio, semelhante aos mamíferos (Michelin *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2008; Carani *et al.*, 2008) (Figura 4).

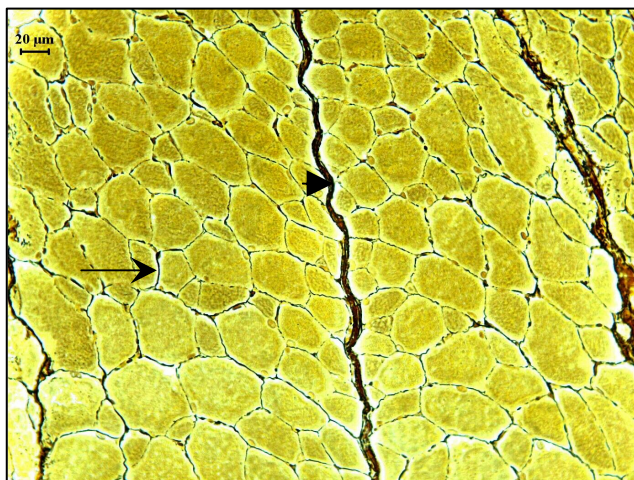


Figura 4: Corte transversal das fibras musculares de juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Endomísio (*seta*). Perimísio (*cabeça de seta*). Reticulina. (adaptado de Michelin *et al.*, 2009)

Os primeiros estudos envolvendo o tecido muscular de mamíferos classificavam os músculos em “vermelhos” ou “brancos” (Ranvier, 1873). A cor vermelha está relacionada com a presença da mioglobina e com o grau de vascularização do músculo. Com a utilização de técnicas histoquímicas, observou-se que a maioria dos músculos dos mamíferos é constituída por uma população heterogênea de fibras, distribuídas em mosaico, que apresentam características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas distintas (Dubowitz & Pearse, 1960). As fibras musculares foram classificadas em vermelhas, intermediárias e brancas (Ogata, 1958) e, posteriormente, três tipos principais de fibras musculares foram descritas em mamíferos, sendo denominadas de fibras dos tipos I, IIA e IIB, de acordo com o padrão de reação para a atividade da ATPase da porção globular da cadeia pesada da miosina (ATPase miofibrilar ou m-ATPase) (Brooke & Kaiser, 1970).

Ashmore & Doerr (1971), utilizando a combinação das reações histoquímicas para detecção da atividade das enzimas m-ATPase e succinato desidrogenase (SDH), classificaram as fibras musculares dos mamíferos como β Red, α Red e α White. Posteriormente, Peter *et al.* (1972), classificaram as fibras musculares em SO (*slow oxidative*), FOG (*Fast oxidative glycolytic*) e FG (*Fast glycolytic*), baseando-se na

combinação das reações histoquímicas e na detecção da atividade das enzimas m-ATPase e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazólio Redutase (NADH-TR).

Estudos mais recentes, envolvendo a microdissecção de fibras e, associando a reação histoquímica para m-ATPase com a técnica da eletroforese, possibilitaram a separação de quatro isoformas de cadeia pesada da miosina (MHC), presentes nas fibras musculares dos mamíferos: MHC I, presente nas fibras do tipo I, MHC IIA, presente nas fibras do tipo IIA, MHC IIB, presente nas fibras do tipo IIB, e MHC IID, presente nas fibras do tipo IID (Termin *et al.*, 1989). A MHC IID está presente nos músculos de pequenos mamíferos e possui velocidade de contração intermediária entre as MHC IIA e MHC IIB (Hilber *et al.*, 1999).

As fibras do tipo I, IIA, IID e IIB são classificadas como fibras puras (Pette & Staron, 1997; Staron *et al.*, 1999). Porém, além das fibras puras, que expressam apenas um tipo de RNA mensageiro para a MHC, há fibras que co-expressam diferentes genes para a MHC (Biral *et al.*, 1988; Aigner *et al.*, 1993; Schiaffino & Reggiani, 1994; Caiozzo *et al.*, 2003). Essas fibras são denominadas de fibras híbridas ou polimórficas e são classificadas de acordo com o tipo de MHC predominante: fibras IC (MHC I > MHC IIA), fibras IIC (MHC IIA > MHC I), fibras IIAD (MHC IIA > MHC IID), fibras IIBD (MHC IIB > MHC IID) (Staron & Pette, 1993; Di Maso *et al.*, 2000).

A velocidade de contração de uma fibra muscular está diretamente relacionada com o tipo de MHC (para revisão ver Talmadge *et al.*, 1993). A MHC capaz de rápida hidrólise do ATP é característica das fibras do tipo II, que são fibras de contração rápida. Já a MHC de baixa atividade ATPásica é encontrada nas fibras do tipo I, de contração lenta (Kelly & Rubinstein, 1994).

Em peixes, ocorre uma variação na expressão das MHCs na musculatura estriada durante o desenvolvimento e crescimento das fibras musculares (Narusawa *et al.*, 1987), onde podem ser expressas as isoformas embrionária, larval, e ainda outras, na dependência da espécie estudada (Scapolo *et al.*, 1988; Johnston, 2001). No entanto, existem muitas controvérsias sobre os tipos de MHCs expressas nos peixes, considerando-se a fase de crescimento estudada, o tipo de músculo analisado e a espécie considerada (Karasinski, 1993; Scott *et al.*, 2001). De acordo com Weaver *et al.* (2001) as MHCs do músculo dos peixes são quase idênticas àsquelas encontradas em aves e anfíbios.

Os tipos de fibras musculares dos peixes não são permanentes, ou seja, são capazes de mudar o seu fenótipo como resultado do desenvolvimento e da demanda ambiental, passando a expressar diferentes isoformas de MHCs (Martinez *et al.*, 1993). Estudos em peixes envolvendo variações na temperatura mostraram alteração no padrão de expressão das isoformas de MHC (Hirayama & Watabe, 1997; Watabe *et al.*, 1998).

De acordo com as interpretações baseadas em evidências eletroforéticas e imunohistoquímicas, diferentes tipos de fibras expressam diferentes tipos de MHC nos peixes (Karasinski & Kilarski, 1989; Rescan *et al.*, 2001b). Em comparação com outros vertebrados, o conhecimento das MHCs em teleósteos ainda permanece limitado.

Nos peixes, as fibras musculares estão distribuídas em áreas ou compartimentos, diferentemente do padrão de fibras em mosaico observado no músculo esquelético dos mamíferos. Na maioria das espécies de peixes, as fibras distribuem-se entre os compartimentos vermelho, intermediário e branco, e essa organização varia de acordo com a espécie e a fase de crescimento estudada (Alexander, 1969; Weatherley & Gill, 1987).

As fibras musculares vermelhas normalmente são menores (25 a 45 μm de diâmetro), apresentam velocidade lenta de contração e metabolismo oxidativo, alta concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídios e excelente suprimento sanguíneo, sendo utilizadas pelo peixe na realização de movimentos lentos e de sustentação, como durante a migração (Johnston, 1999). O músculo vermelho (compartimento vermelho) pode aparecer na região subdermal como uma camada fina e uniforme ao longo de todo o corpo do animal (Dal Pai-Silva *et al.*, 1995) ou pode apresentar distribuição mais localizada, concentrando-se somente na região do nervo da linha lateral, onde assume aspecto triangular (Hoyle *et al.*, 1986; Sanger & Stoiber, 2001) (Figura 5).

A maior parte da massa muscular dos peixes  formada pelo compartimento branco (musculatura branca), localizado em uma região mais profunda do músculo e formado por fibras musculares maiores (50 a 100 μm de diâmetro), que apresentam velocidade de contrao rápida e metabolismo glicolítico, baixa concentrao de mioglobina, poucas mitocôndrias e lipídios. As fibras musculares brancas dos peixes são utilizadas durante os movimentos bruscos de natao, como na captura de alimento e fuga de predadores (Driedzic & Hochachka, 1976; Johnston, 1980). Entre os compartimentos branco e

vermelho encontra-se o compartimento intermediário (musculatura intermediária), reduzido a uma ou duas camadas de células, formado por fibras de contração rápida e de metabolismo oxidativo/glicolítico (Johnston, 1981; Weatherley & Gill, 1987; Zhang *et al.*, 1996) (Figura 5).

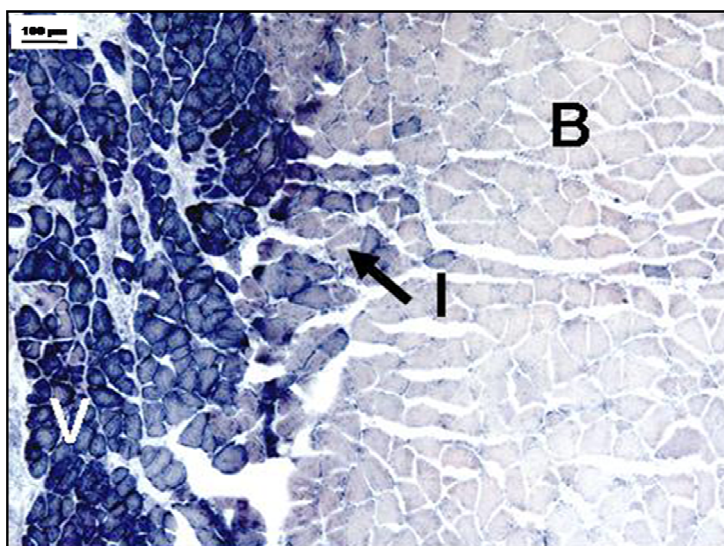


Figura 5: Corte transversal da musculatura estriada esquelética do pirarucu (*Arapaima gigas*). *V*: Compartimento vermelho superficial. *I*: Compartimento intermediário. *B*: Compartimento branco profundo. NADH-TR. (Carani *et al.*, 2008)

2.2. Formação das Fibras Musculares: Miogênese

Nos peixes, a formação das fibras musculares ocorre nas fases iniciais da embriogênese. O mesoderma paraxial, localizado adjacente à notocorda e ao tubo neural em formação, segmenta-se na direção rostro-caudal do embrião formando os somitos (Kimmel *et al.*, 1990). Cada somito é formado por uma porção ventral (esclerótomo), que dará origem ao esqueleto e à cartilagem do embrião, e uma dorsal (dermomiótomo), que formará a derme e as musculaturas do tronco e da cauda (Currie & Ingham, 2001).

Nos somitos, uma população de células cubóides mesodérmicas dispõe-se em uma única camada ao redor da notocorda (Figura 6). Essas células são conhecidas como células

adaxiais, células musculares não-pioneiras ou mioblastos “slow” (Thisse *et al.*, 1993; Currie & Ingham, 2001; Johnston & Hall, 2004; Ochi & Westerfield, 2007). Sob o estímulo de glicoproteínas secretadas pela notocorda e pelo tubo neural (Blagden *et al.*, 1997; Chargé & Rudnicki, 2004), essas células migram em direção à superfície do miótomo e formam uma única camada abaixo da epiderme. Elas se fundem umas às outras, dando origem aos miotubos multinucleados, que se diferenciam em fibras musculares vermelhas para formar a musculatura vermelha do embrião (Blagden *et al.*, 1997; Currie & Ingham, 2001; Johnston & Hall, 2004; Ochi & Westerfield, 2007) (Figura 6).

Um subgrupo das células adaxiais não migra para a região superficial; ao invés disso, elas se alongam, atravessando toda a extensão do miótomo, e formam as fibras mononucleadas, conhecidas como fibras musculares pioneiras. Essas fibras permanecem conectadas à notocorda através de processos citoplasmáticos, o que possibilita orientar a migração das demais células adaxiais em direção à superfície do miótomo. As fibras pioneiras concentram-se na região de formação do septo horizontal e são as primeiras a apresentarem atividade contrátil. No final da fase embrionária e depois da eclosão, as demais células do miótomo (mioblastos “fast” ou células pré-somíticas) fundem-se para formar os miotubos, que se diferenciam em fibras musculares brancas, dando origem à musculatura branca do embrião (Devoto *et al.*, 1996; Currie & Ingham, 2001; Johnston & Hall, 2004; Ochi & Westerfield, 2007) (Figura 6).

A miogênese nos peixes é significativamente diferente da miogênese dos mamíferos. Nos mamíferos, as fibras musculares são originadas a partir de miotubos primários e secundários, (Ashby *et al.*, 1993; Ontell & Kozeka 1984). Inicialmente, alguns mioblastos fundem-se para formar miotubos primários, num processo independente de inervação. Esses miotubos primários constituem um suporte para a fusão de outros mioblastos, os quais formam miotubos secundários, num processo dependente de inervação. O padrão de inervação das fibras musculares em um músculo influencia o tipo de fibra muscular a ser formada (Harris, 1988). Ao contrário, 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; Rowleron *et al.*, 1995).

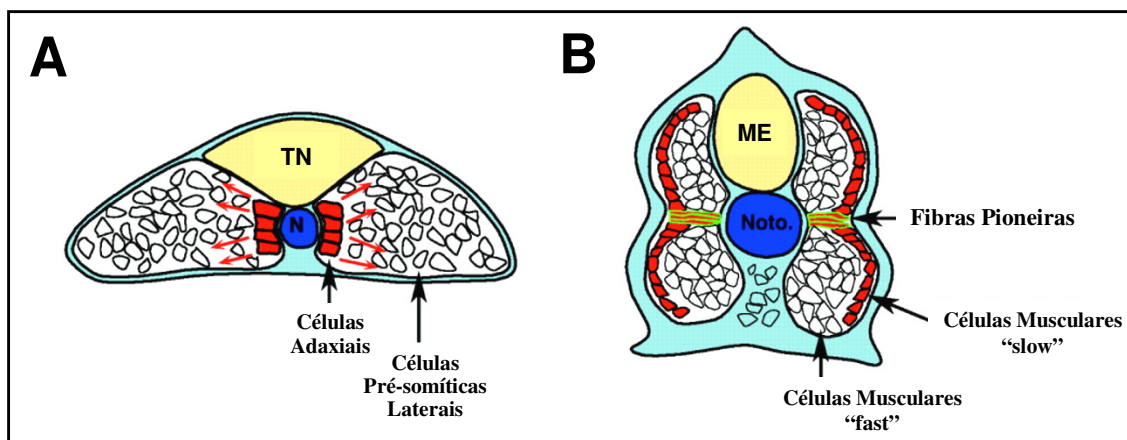


Figura 6: Esquema da formação dos tipos de fibras musculares em zebrafish (*Danio rerio*). A: Corte transversal do embrião na fase final de gastrulação, mostrando as Células Adaxiais (vermelho) adjacentes à notocorda (N). As setas vermelhas indicam que as Células Adaxiais migram em direção à superfície do miótomo, onde formarão as fibras musculares “slow”. As Células Pré-somíticas Laterais (branco) ocupam toda a extensão do miótomo e formarão as fibras musculares “fast”. B: Corte transversal do embrião no estágio de 24 horas pós-fertilização. As Células “slow” formam uma camada abaixo da epiderme, constituindo a musculatura vermelha superficial do embrião. As Células “fast” organizam-se por todo o restante do miótomo, formando a musculatura branca profunda. TN: Tubo Neural; N: Notocorda; ME: Medula Espinhal. (adaptado de Du *et al.*, 1997)

2.3. Crescimento Muscular Pós-natal

O desenvolvimento e o crescimento do tecido muscular estriado esquelético nos peixes envolve uma população de células precursoras miogênicas ou mioblastos indiferenciados (Alfei *et al.*, 1994; Koumans *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 1998; Rowlerson & Veggetti, 2001), análogos às células mio-satélites descritas em mamíferos (Mauro, 1961). Essas células são ativadas durante o crescimento pós-natal e na regeneração da musculatura esquelética (Seale *et al.*, 2004) e estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática das fibras musculares, estando distribuídas ao longo da fibra muscular (Johnston *et al.*, 1998) (Figura 7).

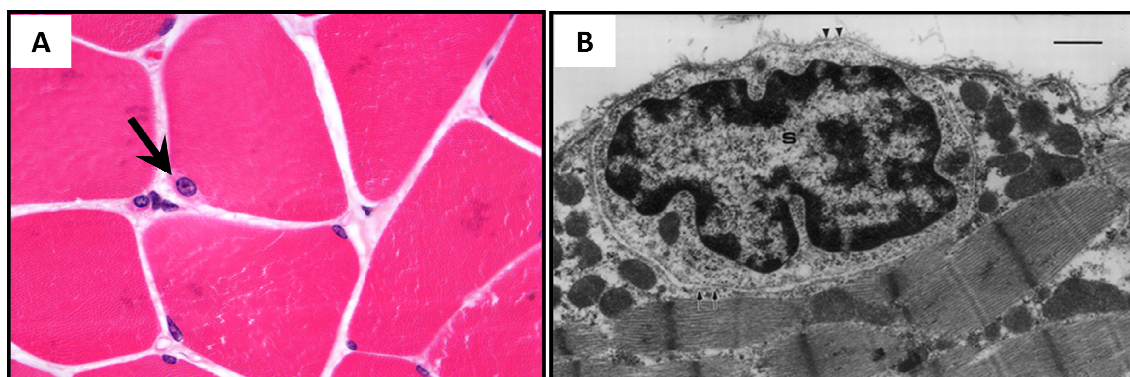


Figura 7: Cortes transversais do músculo esquelético de rato. (A) Fotomicrografia mostrando a localização da célula mioossatélite (*seta*) na periferia da fibra muscular. (B) Eletromicrografia mostrando o núcleo de uma célula satélite (S), associada a uma fibra muscular esquelética. *HE e Microscopia Eletrônica de Transmissão*. (Sinha-Hikim et al., 2003)

Nos peixes, o crescimento muscular ocorre mediante a proliferação e a diferenciação dos mioblastos (Alfei *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 2000). Quando ativados por sinais celulares, os mioblastos proliferam, diferenciam-se e os núcleos são internalizados às fibras musculares pré-existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, ocasionando, dessa forma, o aumento no diâmetro ou área das fibras. Esse processo é conhecido como hipertrofia (Koumans & Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001) (Figura 8). Por outro lado, os mioblastos em proliferação podem agregar-se à superfície de fibras musculares pré-existentes e formar novos miotubos multinucleados. Os miotubos se separam das fibras, originando novas fibras musculares, processo conhecido como hiperplasia (Veggetti *et al.*, 1990; Koumans *et al.*, 1994; Johnston, 1999; Johnston *et al.*, 2000; Dal Pai Silva *et al.*, 2003a, b) (Figura 8).

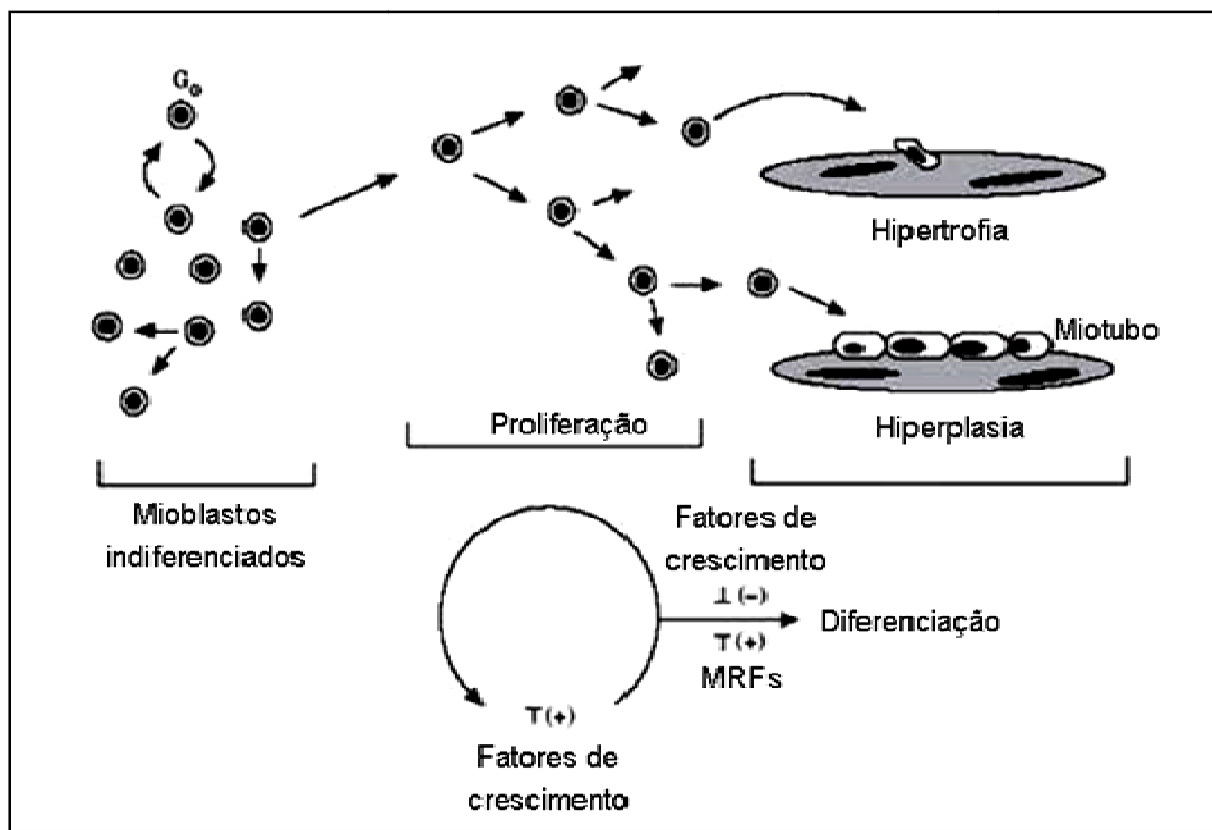


Figura 8: Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia. A população de mioblastos indiferenciados contribui para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético, sob influência dos Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) e dos Fatores de Crescimento. (adaptado de Johnston, 1999)

A hiperplasia das fibras musculares nos peixes pode ocorrer de duas formas: 1) hiperplasia estratificada, a partir de zonas germinais de proliferação celular, localizadas nas regiões dorsal e ventral dos miômeros, sendo responsável pelo espessamento das camadas musculares nas fases iniciais do desenvolvimento; e 2) hiperplasia em mosaico, que resulta em grande aumento no número de fibras musculares, sendo observada principalmente na musculatura branca de juvenis das espécies de peixe que atingem tamanho grande (Rowlerson & Veggetti, 2001). Quando a hiperplasia em mosaico está ocorrendo, observam-se fibras pequenas (diâmetro menor que 25 μm) entre fibras maiores, formando

um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação (Johnston, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001; Xu *et al.*, 2003) (Figura 9).

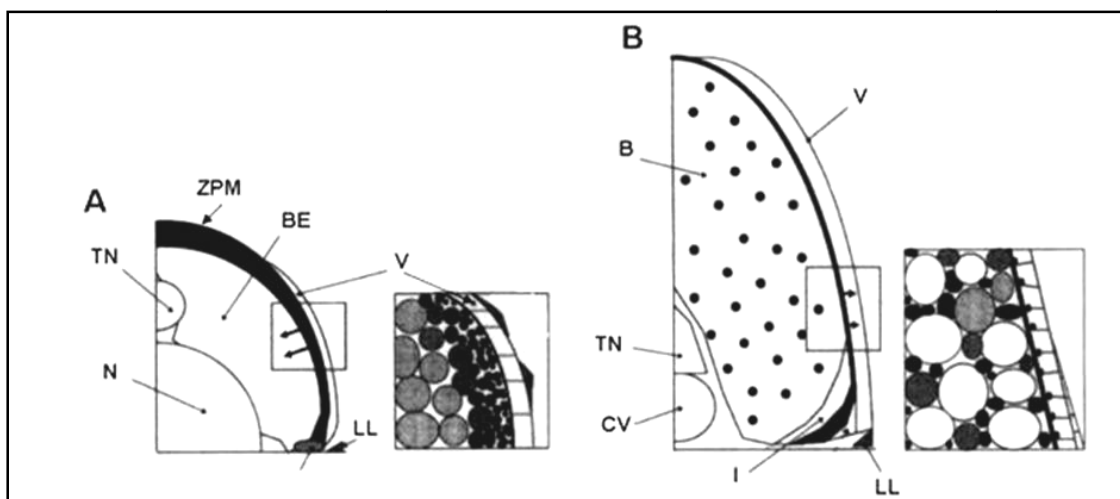


Figura 9: Esquema representativo dos tipos de crescimento muscular hiperplásico em peixes. Hiperplasia estratificada (A) e hiperplasia em mosaico (B). TN = tubo neural, N = notocorda, BE = fibras musculares brancas embrionárias, ZPM = Zona de Proliferação de Mioblastos, V = fibras musculares vermelhas, LL = linha lateral, CV = coluna vertebral, B = fibras musculares brancas, I = fibras musculares intermediárias. (adaptado de Rowleron & Veggetti, 2001)

Nos mamíferos a hiperplasia cessa em um curto período após o desenvolvimento embrionário (Goldspink *et al.*, 1972; Johnston *et al.*, 2000). Nos peixes, a relativa contribuição da hiperplasia e da hipertrofia no crescimento muscular tem sido estudada em muitas espécies e foi verificado que nas espécies de crescimento rápido e que atingem um tamanho grande, a hiperplasia das fibras persiste por um período de tempo maior (Kiessling *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001; Carani *et al.*, 2008). Por outro lado, nas espécies de menor tamanho, a hiperplasia das fibras cessa nos estágios iniciais de desenvolvimento e a hipertrofia torna-se o mecanismo de crescimento muscular predominante nessa fase de desenvolvimento (Veggetti *et al.*, 1993; Koumans & Akster, 1995).

2.4. Controle Molecular da Miogênese e do Crescimento Muscular

O crescimento muscular é controlado pela ação coordenada de diferentes substâncias, entre as quais, hormônios, fatores 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. Dentre esses fatores estão os MRFs, a Miostatina e o IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*).

2.4.1. Fatores Reguladores Miogênicos (MRFs)

Nos peixes, assim como nos mamíferos, tanto a miogênese como o crescimento muscular pós-natal envolvem a proliferação e a diferenciação das células mio-satélites ou mioblastos. Esses processos são regulados por diversos fatores, entre eles os fatores transcricionais músculo-específicos, coletivamente chamados de Fatores de Regulação Miogênica (MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4 (Watabe, 2001; Rescan, 2001; Johansen & Overturf, 2005).

Esses fatores são fosfoproteínas nucleares que contêm um domínio altamente conservado, evolutivamente, de aproximadamente 60 aminoácidos, conhecido como “basic Helix-Loop-Helix” (bHLH) (Figura 10). Esses fatores ligam-se a seqüências de DNA (5'-CANNTG-3'), conhecidas como *Ebox*, presentes na região promotora de muitos genes músculo-específicos, levando à expressão dos mesmos. Além disso, podem iniciar a transcrição de seus próprios genes durante o crescimento (Murre *et al.*, 1989; Sassoon, 1993). A região “Helix-Loop-Helix” do MRF constitui o domínio de ligação dessa molécula com outra idêntica a ela, formando um homodímero, e também constitui a região de ligação do MRF com as proteínas E, que atuam como cofatores dos MRFs, formando um heterodímero. A ligação do homodímero MRF-MRF ou do heterodímero MRF-Proteína E à

seqüência *Ebox* é que promove a ativação da transcrição dos genes músculo-específicos (Rudnick & Jaenisch, 1995; Watabe, 1999; Sabourin & Rudnicki, 2000; Rescan, 2001).

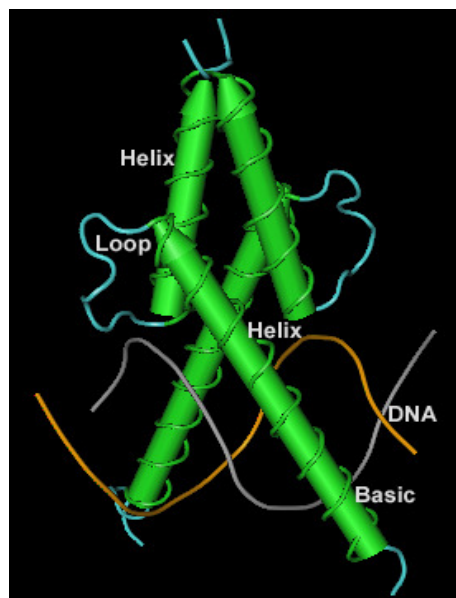


Figura 10: Estrutura cristalográfica do complexo formado pelo homodímero do MRF MyoD e o DNA. (adaptado de Ma *et al.*, 1994)

Na formação do músculo esquelético, o comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica é marcado pela expressão dos MRFs MyoD e Myf5. Esses fatores são conhecidos como fatores primários, sendo expressos pelos mioblastos na fase de proliferação, que antecede a fase de diferenciação (Goulding *et al.*, 1994; Williams & Ordahl, 1994).

Embora a MyoD e o Myf5 definam a identidade dos mioblastos, as células precursoras somáticas devem ser “pré-comprometidas” com a linhagem miogênica antes da expressão dos MRFs. No embrião, esse “pré-comprometimento” é realizado pelo fator transcricional Pax3, da família Pax (do inglês, *Paired-box*), o qual é expresso em células do mesoderma pré-somítico e dos primeiros somitos epiteliais (Goulding *et al.*, 1994; Williams & Ordahl, 1994) (Figura 11).

Os mioblastos que saem do ciclo celular, positivos para Myf5 e MyoD, tornam-se miócitos mononucleados diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs Miogenina e MRF4, os quais regulam a fusão dessas células entre si, formando os miotubos multinucleados, e a diferenciação dos miotubos em fibras musculares (Megeney & Rudnicki, 1995; Grobet *et al.*, 1997) (Figura 11). Finalmente, terminado o processo da miogênese, o músculo esquelético torna-se um tecido estável, caracterizado por fibras musculares adultas multinucleadas (Decary *et al.*, 1997; Schmalbruch & Lewis, 2000).

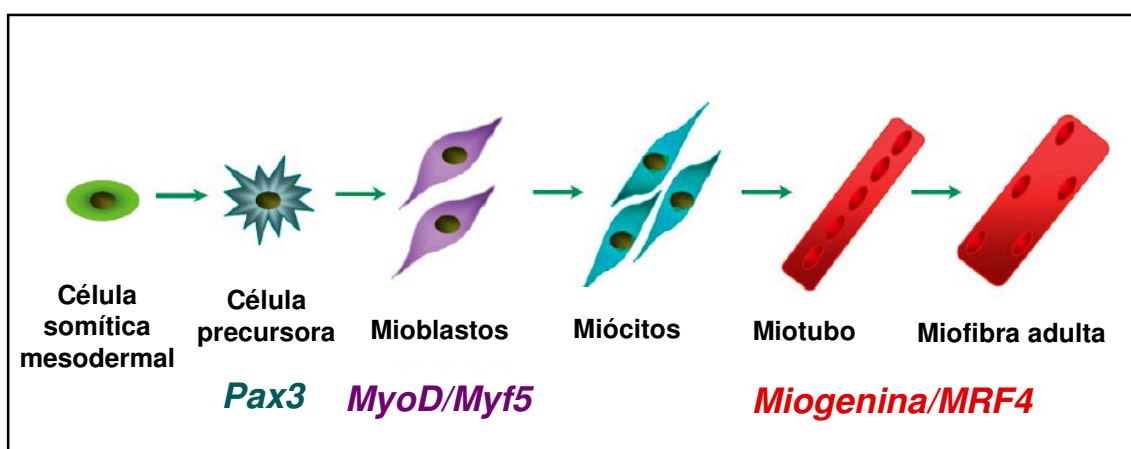


Figura 11: Células somíticas mesodermas tornam-se células comprometidas com a linhagem miogênica (células precursoras) e passam a expressar Pax3, que contribui para a expansão das células miogênicas. Sob controle dos MRFs MyoD e Myf5, as células precursoras tornam-se células da linhagem miogênica, os mioblastos, que iniciam a proliferação. A expressão de Miogenina e MRF4 controla a diferenciação dos mioblastos em miotubos, que posteriormente se diferenciam para formar as miofibras maduras. (adaptado de Zammit *et al.*, 2006)

Os MRFs Miogenina e MyoD também podem estar envolvidos com a manutenção do fenótipo da fibra muscular adulta, rápida ou lenta. A Miogenina é expressa em níveis superiores aos da MyoD em músculos lentos, enquanto que o oposto é verdadeiro para músculos rápidos (Hughes *et al.*, 1993; Voytik *et al.*, 1993).

2.4.2. Fatores de Crescimento: IGF-I e Miostatina

O crescimento do músculo esquelético nos peixes é um processo altamente organizado, que envolve a ativação da proliferação e diferenciação das células mioossatélites (Johnston, 1999). A ativação das células mioossatélites requer um aumento controlado da expressão dos genes músculo-específicos, relacionados ao crescimento. Esse processo pode ser regulado por fatores extracelulares, como os FGFs (*Fibroblast Growth Factors*), TGFs (*Transforming Growth Factors*), IGFs (*Insulin-like Growth Factors*), HGFs (*Hepatocyte Growth Factors*), TNFs (*Tumor Necrosis Factors*) e IL-6 (*Interleukin-6*), que estão envolvidos no controle da proliferação e diferenciação das células mioossatélites (para revisão ver Hawke & Garry, 2001; Stamler & Meissner, 2001).

O IGF-I (*Insulin-like Growth Factor - I*) é essencial para o crescimento e desenvolvimento normais do indivíduo. É o mediador das funções de crescimento pós-natal exercidas pelo GH (hormônio do crescimento) e a principal fonte de IGF-I é o fígado, o qual supre aproximadamente 75% do IGF-I total circulante no corpo (Schwander *et al.*, 1983).

Vários estudos demonstraram que o IGF-I é mediador da hipertrofia do músculo esquelético (Adams & McCue, 1998; Musaro *et al.*, 2001). Segundo Florini *et al.* (1993), o IGF-I aumenta a massa e a força musculares através de dois mecanismos principais: 1) atua diretamente sobre as fibras musculares, aumentando a síntese de proteínas e a massa muscular, 2) estimula a fusão das células mioossatélites às fibras musculares pré-existentes, auxiliando no reparo de regiões danificadas das fibras e promovendo o crescimento muscular. Este processo é similar ao que acontece durante a formação do tecido muscular esquelético, onde tanto a fusão como a diferenciação dos mioblastos é regulada pelo IGF-I, mediante a ativação da via de sinalização PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase*), responsável pelo aumento na síntese protéica (Noguchi, 2005) (Figura 12).

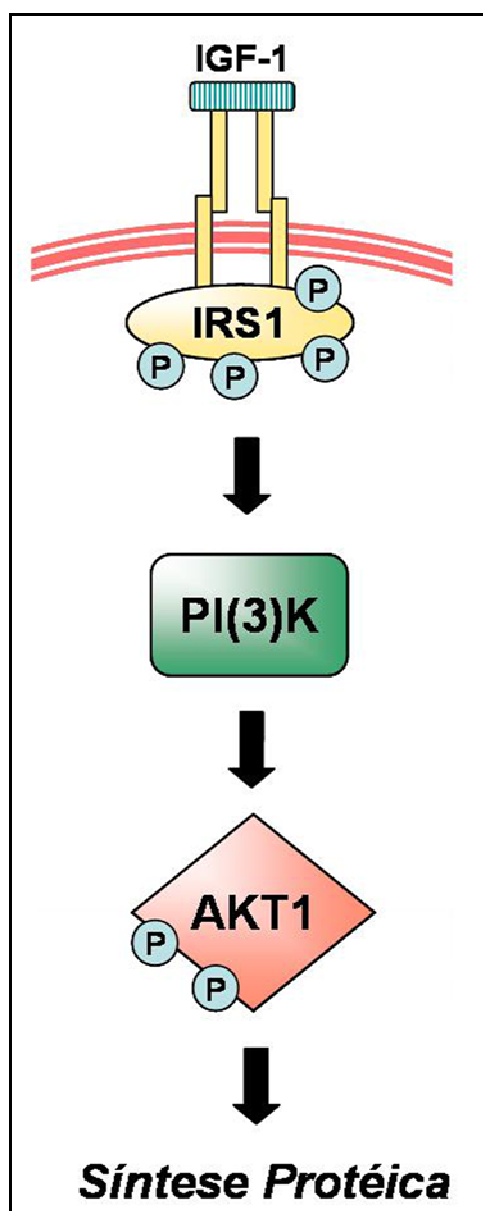


Figura 12: Esquema ilustrando a via de sinalização das proteínas PI3K/Akt, desencadeada pela ligação do IGF-I ao receptor de membrana na fibra muscular. (adaptado de Glass, 2003)

Além do IGF-I, outro importante regulador do crescimento muscular são os fatores pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento TGF- β (*Transforming Growth Factor* - β). Esses fatores são importantes citocinas que regulam o crescimento muscular, controlando a ativação da transcrição de genes músculo-específicos e inibindo tanto a

proliferação como a diferenciação dos mioblastos (Allen & Boxhorn, 1989; Greene & Allen, 1991; Lefaucheur *et al.*, 1996; Charge & Rudnicki, 2004). Mais recentemente, a Miostatina ou GDF-8 (*Growth and Differentiation Factor - 8*) foi identificada como um novo membro da família TGF- β (McPherron *et al.*, 1997). A Miostatina é um fator de crescimento considerado essencial, pois promove a regulação do desenvolvimento e do crescimento do músculo estriado esquelético nos vertebrados (McPherron *et al.*, 1997). Durante a formação das fibras musculares, a expressão da Miostatina é restrita aos miótomos em desenvolvimento, porém, continua associada às células da linhagem miogênica durante o crescimento pós-natal e na fase adulta (McPherron *et al.*, 1997).

A principal função da Miostatina é regular negativamente o crescimento muscular, conforme demonstrado em numerosos estudos usando linhagens de células musculares esqueléticas, camundongos *knockout* para Miostatina, bovinos e humanos (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997; McPherron & Lee, 1997; Lee & McPherron, 1999; Schuelke *et al.*, 2004).

Nos animais *knockout* para Miostatina ocorre um aumento significativo da massa muscular, decorrente de maior hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares durante as fases embrionária e fetal (McPherron *et al.*, 1997; Oldham *et al.*, 2001). A Miostatina pode controlar o número de fibras musculares a serem formadas, regulando a proliferação e a diferenciação dos mioblastos (Thomas *et al.*, 2000; Langley *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos sugerem que a Miostatina inibe a proliferação e diferenciação dos mioblastos, através da diminuição da expressão dos MRFs (Langley *et al.*, 2002; Rios *et al.*, 2002; Joulia *et al.*, 2003). A super-expressão da Miostatina inibe a expressão dos MRFs MyoD, Myf-5 e Miogenina. Por outro lado, a inativação da Miostatina em camundongos e bovinos pode aumentar a expressão da MyoD e da Miogenina, levando a um aumento na proliferação e diferenciação dos mioblastos e a um intenso crescimento muscular devido à hiperplasia e hipertrofia das fibras (Langley *et al.*, 2002; Joulia *et al.*, 2003). O mecanismo de ação da Miostatina sobre o músculo esquelético dos peixes ainda não é bem compreendido; entretanto, a expressão de MyoD e Miogenina mostrou-se aumentada após inativação da Miostatina, indicando, assim, a sua possível influência sobre as vias da miogênese controladas pelos MRFs (Amali *et al.*, 2004).

Nos animais adultos, a Miostatina parece atuar sobre as células mioossatélites, mantendo-as em um estado quiescente, suprimindo a proliferação e/ou a diferenciação. Quando necessário, a atividade da Miostatina é inibida e as células mioossatélites são ativadas (Lee, 2004).

O gene da Miostatina foi identificado em muitas espécies, incluindo alguns peixes (Maccatrozzo *et al.*, 2001a,b; Rescan *et al.*, 2001a; Roberts & Goetz, 2001; Rodgers *et al.*, 2001; Radaelli *et al.*, 2003; Amali *et al.*, 2004), onde o mRNA da Miostatina foi encontrado no músculo, olhos, brânquias, intestino, gônadas, cérebro e rim. Nos mamíferos, ao contrário dos peixes, a expressão da Miostatina ocorre principalmente no músculo esquelético, embora o RNAm tenha sido identificado em menor quantidade nas fibras de Purkinje e cardiomiócitos (Sharma *et al.*, 1999; Shyu *et al.*, 2005; Morissette *et al.*, 2006), e também nas glândulas mamárias (Ji *et al.*, 1998). Apesar de estudos recentes indicarem que a Miostatina pode influenciar o crescimento do músculo cardíaco (Shyu *et al.*, 2005; Morissette *et al.*, 2006) e, possivelmente, a diferenciação dos adipócitos (Kim *et al.*, 2001; Zimmers *et al.*, 2002; Rebbapragada *et al.*, 2003), sua função primordial é regular negativamente o crescimento do músculo estriado esquelético (Helterline *et al.*, 2007).

No músculo estriado do zebrafish (*Danio rerio*), peixe que atinge um tamanho final de poucos centímetros, a expressão da Miostatina é baixa na fase larval, onde o crescimento muscular por hiperplasia é mais acentuado. Já nas fases juvenil e adulta, onde o crescimento muscular hiperplásico é baixo, a expressão da Miostatina apresenta-se aumentada, demonstrando que a mesma exerce uma função inibitória sobre o crescimento muscular hiperplásico nesta espécie (Xu *et al.*, 2003). Além disso, o bloqueio da atividade da Miostatina em peixes produziu animais com um aumento expressivo no peso corporal devido à hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares (Acosta *et al.*, 2005; Rebhan & Funkenstein, 2008; Medeiros *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

De forma semelhante 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, 2004; Lee & McPherron, 2001). Essa porção madura sofre dimerização com outra porção madura idêntica, formando um homodímero que corresponde à proteína biologicamente ativa, a qual se liga aos receptores de membrana específicos nas células-alvo (Thomas *et al.*, 2000). O LAP tem a capacidade de se ligar a esse dímero, inibindo sua atividade biológica por impedir a sua ligação aos receptores de membrana (Lee & McPherron, 2001). A clivagem proteolítica do LAP é realizada por uma família de proteases denominada metaloproteinases, promovendo a ativação do dímero C-terminal latente (Wolfman *et al.*, 2003) (Figura 13).

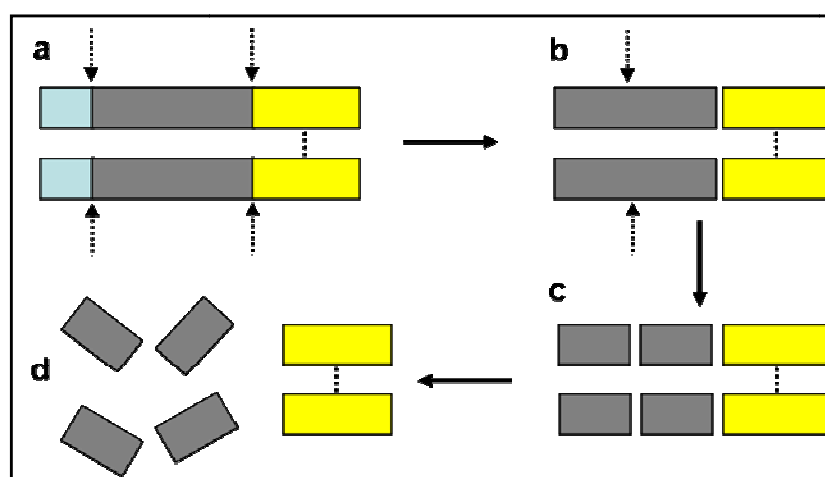


Figura 13: Processamento da proteína miostatina. (a) A miostatina é sintetizada como uma proteína precursora contendo a sequência-sinal (em azul), a porção N-terminal ou propeptídeo (em cinza) e o fragmento C-terminal (em amarelo). A proteína precursora sofre dois eventos de clivagem proteolítica (setas); um remove a sequência-sinal e o segundo gera o fragmento C-terminal, que corresponde à porção ativa da proteína. (b) Após as clivagens proteolíticas, dois fragmentos C-terminais formam um dímero, através de pontes dissulfeto entre resíduos de aminoácidos cisteínas, 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 promovida pela ligação da Miostatina ao seu receptor na célula-alvo é bem estabelecida nos mamíferos. A Miostatina ativa liga-se a receptores específicos na membrana da célula-alvo, denominados receptores Ativina do tipo II. O receptor tipo II, ligado à Miostatina, fosforila e ativa um receptor do tipo I correspondente. 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 da célula, onde interagem com proteínas da maquinaria de transcrição, regulando esse processo em genes-específicos (Kollias & McDermott, 2008), como os genes relacionados à proliferação e diferenciação dos mioblastos e células satélites e à atrofia muscular (Otto & Patel, 2010) (Figura 14). Poucos trabalhos descrevem a via de sinalização e o modo de ação da Miostatina nos peixes.

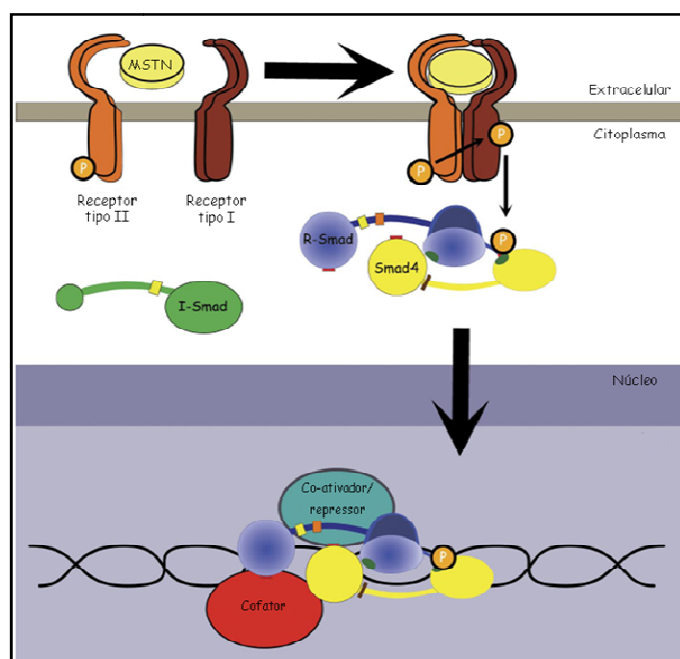


Figura 14. Representação esquemática simplificada da via de sinalização da miostatina (MSTN). O complexo formado inicialmente pela MSTN e seu receptor ativina do tipo II fosforila e ativa o receptor do tipo I correspondente. O complexo tetramétrico de receptores ativado fosforila proteínas *Smads* ligadas 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 transcrição 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 (Joulia *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2000). O controle da miostatina sobre a diferenciação dos mioblastos se dá pela *down*-regulação da expressão dos MRFs MyoD, miogenina e Myf-5 (Joulia *et al.*, 2003; Langley *et al.*, 2002; Ríos *et al.*, 2002). 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 15).

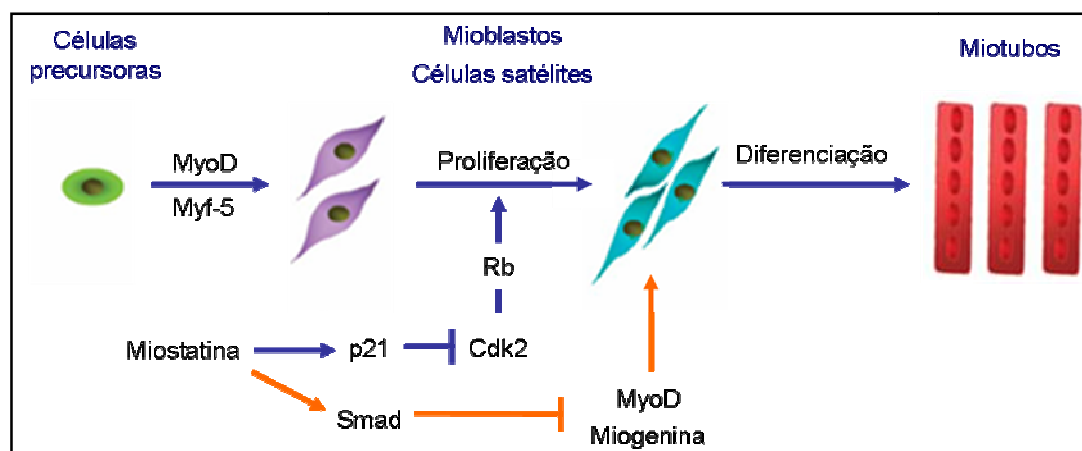


Figura 15. Representação esquemática simplificada dos mecanismos de ação da miostatina em mamíferos. O controle da miostatina sobre a proliferação de mioblastos, durante a miogênese, ou de células satélites, durante o crescimento pós-natal ou regeneração, ocorre pela capacidade da miostatina em aumentar os níveis da proteína 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).

Em contraste com os mamíferos, cuja expressão de um único gene para a miostatina é quase que totalmente específica do tecido muscular, a expressão da miostatina nos peixes está relacionada a pelo menos dois genes, presentes em tecidos musculares e não-musculares (Maccatrozzo et al., 2001a,b; Rodgers et al., 2001; Østbye et al., 2001; Rescan et al., 2001a; Kocabas et al., 2002), reforçando a idéia de que a função da miostatina nos peixes não está restrita ao tecido muscular. A Miostatina I é amplamente expressa no músculo esquelético, cérebro, olhos, rins, testículos, ovaries, trato digestivo e coração; por outro lado, a Miostatina II está restrita ao cérebro (Amali et al., 2004; Kerr et al., 2005; Rodgers and Garikipati, 2008).

2.5. O *Arapaima gigas*

O pirarucu, *Arapaima gigas* (Figura 16), peixe da Bacia Amazônica que pertence à família Arapaimatidae, é uma espécie de elevado interesse econômico, apresentando uma das melhores perspectivas para a criação em regime intensivo. Possui rápido crescimento, podendo alcançar 10 kg no primeiro ano de criação (Imbiriba, 2001), rusticidade no manuseio, respiração aérea (Fontenele, 1948), suporta altas densidades de estocagem (Cavero et al., 2002) e é facilmente treinado para aceitar ração extrusada (Crescêncio, 2001). A respiração aérea do pirarucu é uma característica fisiológica que facilita sua criação em sistemas intensivos, principalmente pela baixa demanda de oxigênio na água, o que não é comum em peixes com respiração branquial (Ono et al., 2004).

Além do fator de proteção da espécie, a criação do pirarucu caracteriza-se como uma atividade promissora no ramo da aquíicultura intensiva, uma vez que a espécie possui um rendimento de filé de cerca de 60%, sendo sua carne muito saborosa, praticamente desprovida de espinhos e com baixo teor em gordura (Imbiriba, 2001).

As informações a respeito da criação do pirarucu em regime intensivo ainda são escassas na literatura, embora alguns trabalhos tenham destaque por abordarem aspectos importantes de qualidade da água (Cavero et al., 2004), biomassa sustentável em tanques-rede (Cavero et al., 2002), exigência nutricional (Ituassú et al., 2005), treinamento alimentar inicial (Crescêncio, 2001), desempenho (Crescêncio et al., 2005) e potencial de criação do pirarucu em cativeiro (Imbiriba, 2001; Scorvo-Filho et al., 2004). No entanto, a

maior parte desses estudos compõem notas científicas e não fazem uma análise mais minuciosa dos efeitos e consequências desse tipo de criação sobre o crescimento muscular da espécie.



Figura 16: Exemplar de pirarucu (*A. gigas*) macho proveniente da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas. (Fonte: Arantes, 2009)

O entendimento sobre as características morfológicas da musculatura esquelética e os mecanismos moleculares que controlam o crescimento muscular no pirarucu poderá contribuir de forma significativa com a elaboração de novas estratégias de criação que beneficiem o desenvolvimento e o crescimento muscular em espécies de peixes cultivadas, bem como auxiliar na manutenção e sobrevivência desta espécie. Por outro lado, o esclarecimento sobre a real contribuição dos mecanismos de crescimento hiperplásico e hipertrófico em espécies de elevado interesse econômico, como o pirarucu, é de importância particular para a aquicultura intensiva, uma vez que estes mecanismos refletem diretamente a celularidade muscular, que está relacionada com o aumento da massa e a qualidade do filé.

3. HIPÓTESES

Considerando as informações descritas, a primeira hipótese do presente trabalho é que existe uma organização específica diferencial da musculatura esquelética do pirarucu, a qual permite sua adaptação ao grande tamanho atingido e à rápida taxa de crescimento. A segunda hipótese pressupõe que existe uma expressão gênica e protéica diferencial de MyoD, Miogenina e Miostatina na musculatura branca do pirarucu em diferentes estágios de crescimento.

4. OBJETIVOS

Avaliar as características morfológicas, o crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico, e analisar a expressão gênica e protéica da MyoD, da Miogenina e da Miostatina na musculatura esquelética do pirarucu (*A. gigas*), em diferentes fases de crescimento.

5. MATERIAL E METODOS

5.1. Modelo Experimental e Coleta das Amostras

Este Projeto foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME) do Departamento de Morfologia, IBB, UNESP, Botucatu, SP. Os exemplares de pirarucu (*Arapaima gigas*) utilizados no Artigo 1 foram obtidos da Piscicultura Águas Claras, localizada no município de Mococa, SP. Os animais foram trazidos para o LBME, anestesiados com MS-222 (*Tricaine Methanensulfonate* - SIGMA®) e, em seguida, eutanasiados para a coleta das amostras musculares. Os exemplares de pirarucu utilizados no Artigo 2 foram obtidos da piscicultura Fazenda Liberdade, localizada no município de Uirapuru, GO, de acordo com a disponibilidade de tamanho e número. A coleta das amostras de tecido muscular foi realizada na própria piscicultura, sob condições apropriadas. A eutanásia dos animais foi feita por meio de contato direto com gelo, o que

proporcionou sua morte imediata. As amostras musculares coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C.

5.2. Análise Morfológica

Para avaliação do padrão morfológico das fibras musculares, cortes histológicos com 10 µm de espessura foram obtidos em criostato a -20°C e submetidos à coloração HE (Hematoxilina-Eosina). Para avaliação do metabolismo oxidativo das fibras foi utilizada a reação histoquímica para a enzima NADH-TR (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Tetrazólio Redutase).

5.3. Análise Morfométrica

Para avaliar o padrão de crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura branca do pirarucu foi calculado o menor diâmetro de uma população de 150 fibras musculares por animal, utilizando-se o *Digital Image Analysis System QWin v.3 for Windows* (Leica, Wetzlar, Alemanha). As fibras musculares foram distribuídas em classes, na dependência do seu diâmetro: classe 10 (<10 µm), classe 20 (≥ 10 µm, <20 µm), classe 30 (≥ 20 µm, <30 µm), classe 50 (≥ 30 µm, <50 µm), classe 80 (≥ 50 µm, <80 µm) e classe >80 (≥ 80 µm), conforme metodologia adaptada de Veggetti *et al.* (1990) e Valente *et al.* (1999).

5.4. Expressão Gênica de MyoD, Miogenina e Miostatina

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs MyoD e Miogenina, e da Miostatina na musculatura esquelética do pirarucu foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).

5.4.1. Extração e Quantificação do RNA, Análise da Qualidade e Transcrição Reversa

O RNA total das amostras foi extraído com reagente *TRIzol*[®] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante. As amostras congeladas foram homogeneizadas com o homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de *TRIzol*/50-100 mg de tecido. A solução resultante foi cuidadosamente transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Após esse período, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio e homogeneizado vigorosamente, incubando, agora, por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa formada após a centrifugação do material foi separada e o RNA precipitado por intermédio da incubação com 0,5 mL de álcool isopropílico durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Após a remoção do excesso de líquido do fundo do tubo, o *pellet* de RNA foi dissolvido em água-DEPC (água deionizada tratada com Dietilpirocarbonato - DEPC 0,01% - SIGMA[®]), incubado por 10 minutos a 60°C (para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase) e, finalmente, armazenado à -80°C.

O RNA total extraído foi analisado em espectrofotômetro do tipo *NanoVueTM Plus* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), a 260 e 280 nm de absorbância (A). O cálculo da razão entre A₂₆₀ e A₂₈₀ forneceu uma estimativa da qualidade da extração e pureza do RNA (foram utilizadas somente amostras com razão igual ou superior a 1.8).

A integridade do RNA total extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A agarose foi dissolvida em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) e acrescida do corante *GelRed*[®] (Biotium, Hayward, CA, USA). Uma alíquota do RNA total (1 µL), misturada com 5 µL do tampão de aplicação Orange-G, foi aplicada no gel e submetida à corrida eletroforética a 120 V por cerca de 1 hora. O gel de agarose do Artigo 1 foi corado após a corrida, utilizando-se o *SYBR[®] Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os géis foram fotografados sob

luz ultravioleta e a integridade do RNA total extraído foi confirmada pela presença das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

Durante os procedimentos de extração do RNA, pode ser que ocorra contaminação das amostras por DNA genômico. Esse DNA contaminante pode, eventualmente, servir de molde durante a amplificação pela PCR, gerando um produto que não corresponde ao RNA mensageiro do gene de interesse. Por isso, foi necessário que as amostras de RNA fossem submetidas a tratamento com DNase, uma enzima que é capaz de degradar todo o DNA genômico contaminante.

Conforme as instruções do protocolo *DNase I - Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 2 µg do RNA total de cada amostra destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, onde foram adicionados 2 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 2 µL de DNase I Amp Grade (1 U/µL) e água-DEPC (tratada com Dietilpirocarbonato-DEPC 0,01% - SIGMA®) na quantidade suficiente para completar 20 µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 2 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima DNase I. O tratamento de 2 µg de RNA total com DNase I gerou 22 µL de solução final usada para Transcrição Reversa.

O RNA foi imediatamente transformado em molécula de DNA complementar (cDNA), que possui maior estabilidade e não está sujeito à ação de RNases. A reação de Transcrição Reversa foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), onde 2 µg do RNA total tratado com DNase I (22 µL de solução) foram acrescidos de 10 µL de tampão de transcriptase reversa (10X RT Buffer), 4 µL de dNTPs (25X), 10 µL de *Randon Primers* (10X), 5 µL de enzima transcriptase reversa *MultiScribe RT* (50 unidades/µL), 2,5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNaseOUT* (40 unidades/µL) e o volume final da reação ajustado para 100 µL com água ultrapura livre de DNase/RNase. Cada amostra foi incubada a 25°C por 10 minutos, e então a 42°C por 2 horas. Os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C e utilizados nas reações de PCR.

5.4.2. Padronização da PCR Tradicional

Os produtos da reação de RT foram submetidos à reação de PCR, conforme segue o protocolo. Um microlitro de cada cDNA foi adicionado a 0,5 µL de cada *primer*, *forward* e *reverse* (10 µM), 0,5 µL de água ultrapura e 22,5 µL de *Platinum[®] PCR Supermix* (22 U/mL de *Platinum[®] Taq DNA Polymerase*, 22 mM Tris-HCl pH 8,4, 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, 220 µM dNTPs - Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em um volume final de 25 µL de solução.

Os *primers* para MyoD, Miogenina e Miostatina foram desenhados a partir das seqüências parciais desses genes em *Ictalurus furcatus* (Ostariophysi, Siluriformes, Teleostei) (Números de Acesso AY562555, AY540993 e AY540992, respectivamente), publicadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/nucleotide). Para amplificar um segmento do gene RNA ribossomal 18S (rRNA 18S) na musculatura do pirarucu, foram utilizados *primers* desenhados a partir de seqüências consenso desse gene em outros teleósteos (Tom *et al.*, 2004).

Todos os produtos da reação de PCR foram verificados por seqüenciamento nucleotídico no *ABI 377 Automated DNA Sequencer* (Applied Biosystems, USA), utilizando-se os procedimentos do *BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As seqüências nucleotídicas parciais obtidas foram analisadas através da ferramenta *BLASTn* (Altschul *et al.*, 1990), disponível no site do *National Center for Biotechnology Information – NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), para comparar os fragmentos amplificados com aqueles de outros peixes teleósteos publicados.

As seqüências parciais obtidas para os genes da MyoD, Miogenina e Miostatina no músculo esquelético do pirarucu foram utilizadas para desenhar os respectivos *primers* da PCR quantitativa (qPCR), utilizando-se o software *Primer Express[®]* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados na qPCR.

Gene	Primer	Seqüência (5'-3')
MyoD	<i>forward</i>	CCAGCCCCAGGTCCAAC
	<i>reverse</i>	ACACGTTGGGCCATTGAAA
Miogenina	<i>forward</i>	AGGCTACCCAAGGTGGAGATC
	<i>reverse</i>	TGCAGCCGCTCGATGTACT
Miostatina	<i>forward</i>	CGAAGTACATGCACCTGCAGAA
	<i>reverse</i>	CGTGGGTTGGCCTTGTTTAC
rRNA 18S	<i>forward</i>	TACCACATCCAAAGAAGGCAG
	<i>reverse</i>	TCGATCCCGAGATCCAAC

5.4.3. PCR Quantitativa e Expressão Gênica Relativa

Para normalização dos dados de expressão gênica quantitativa foi utilizado como referência passiva o gene do RNA ribossomal 18S (rRNA 18S), após análises estatísticas comparativas que demonstraram este ser um gene estável entre os grupos (dados não apresentados).

A análise das eficiências de amplificação dos primers foi feita mediante análise da Curva-Padrão (CP), composta por uma série de 7 diluições, a partir de uma solução inicial que continha cDNA das amostras musculares de todos os animais. Para os Artigos 1 e 2, foram construídas CPs a partir de diluições 1:2 e 1:10, respectivamente. O gráfico da CP apresentou 7 pontos e o grau de sua inclinação forneceu uma estimativa da eficiência de amplificação dos primers.

Para que o método de quantificação relativa do Ct Comparativo ($\Delta\Delta Ct$) pudesse ser usado, foi necessário fazer sua validação, determinando se a eficiência de amplificação dos genes alvo é similar à eficiência de amplificação do gene endógeno (*User Bulletin #2*, Applied Biosystems, 2001). Os valores de Ct, obtidos a partir das CPs para cada um desses genes, foram utilizados para construir gráficos representando, no eixo y, o valor de ΔCt

(onde $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$) e, no eixo x, o valor do *log* das concentrações de cDNA utilizado nas diluições. Como o valor da inclinação da reta estava entre os valores de -0.1 e 0.1 para todos os genes, o método do $\Delta\Delta Ct$ pôde ser utilizado.

Validado o método para os Artigos 1 e 2, foi possível realizar a PCR quantitativa para os genes da MyoD, Miogenina e Miostatina. Para isso, foi utilizado o *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), conforme instruções do fabricante, utilizando-se 2 μL do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 μL de *Power SYBR[®] Green Mix* (2,5X), primers *forward* e *reverse* (400 nM) e água-DEPC suficiente para um volume final de 25 μL de solução. As reações foram realizadas em duplicata, no sistema *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se as seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para cada amostra, foi gerado um gráfico de amplificação, que mostra o aumento da fluorescência do *SYBR[®] Green* (ΔRn) ao longo de cada ciclo da PCR.

Ao término de cada PCR, foi feita a análise da Curva de Dissociação dos fragmentos amplificados, o que permitiu avaliar a especificidade de amplificação de cada conjunto de primers, confirmada pela presença de um único pico de fluorescência. Ao final da reação de amplificação é adicionado um passo de 20 minutos onde a temperatura da reação aumenta gradualmente de 60 para 95°C. À medida que isso acontece, os produtos gerados pela PCR denaturam e o sinal fluorescente do *SYBR[®] Green* aumenta drasticamente, pois ele é liberado da molécula de DNA, diminuindo o sinal fluorescente em seguida. O gráfico resultante permite detectar a presença de um ou mais produtos amplificados, pois produtos com diferentes tamanhos denaturam em diferentes temperaturas, gerando 2 picos de fluorescência.

De acordo com o *User Bulletin #2* (Applied Biosystems, 2001), ao término de uma corrida é necessário fazer alguns ajustes sobre os gráficos de amplificação, a fim de garantir uma análise completa e exata dos dados. Para isso, foram ajustados manualmente os valores dos seguintes parâmetros, *Baseline* e *Threshold*. *Baseline* corresponde ao nível basal de fluorescência medido nos primeiros ciclos da PCR, antes do aparecimento das curvas de amplificação. Deve-se determinar sua faixa correta (em número de ciclos), pois, no

momento da quantificação, o valor basal de emissão fluorescente do *Baseline* será subtraído do sinal das curvas de amplificação. *Threshold* é o limiar de detecção de fluorescência, que serve como ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, correspondendo, teoricamente, à mesma quantidade de produto de PCR. Deve ser posicionado na região exponencial da curva de amplificação, onde a eficiência da PCR é maior.

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. Ajustados os parâmetros acima, 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 ΔCt ($Ct_{\text{gene-alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$). Todos os valores foram normalizados pelo valor de ΔCt do calibrador para obter o valor de $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct_{\text{obtido para cada animal}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$). 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. Para o Artigo 1, o calibrador definido foi a amostra de músculo vermelho que obteve menor valor de expressão; para o Artigo 2, foi a amostra com menor valor de expressão do grupo A. Finalmente, a quantificação relativa da expressão gênica é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, expressa em unidades arbitrárias e normalizada pelo gene de referência rRNA 18S (Livak & Schmittgen, 2001).

5.5. Expressão Protéica de MyoD, Miogenina e Miostatina

A avaliação da expressão protéica de MyoD, Miogenina e Miostatina na musculatura esquelética do pirarucu foi feita utilizando-se a técnica do *Western Blot*.

5.5.1. Extração, Quantificação e Eletroforese de Proteínas

As amostras musculares congeladas foram homogeneizadas em homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) com 0,5 mL de tampão de lise (1% Triton X-100, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, aprotinina 10 µg/mL, PMSF 1

mM, ortovanadato de sódio - Na_3VO_4 0,25 mM, NaCl 150 mM e Tris-HCl 50 mM pH 7,5). As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 20 min e o sobrenadante coletado. Uma alíquota de 50 μL do homogenato foi tratada com 25 μL do tampão de amostra de Laemmli (SDS 2%, glycerol 20%, azul de bromofenol 0,04 mg/mL, Tris-HCl 0,12M pH 6,8 e β -mercaptoetanol 0,28 M). As amostras foram incubadas a 97°C por 5 minutos e armazenadas em freezer -20°C até sua utilização.

Uma alíquota do extrato puro de cada amostra (não tratado com Laemmli) foi usada para quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Quantidades exatas de proteínas totais de cada amostra (70 μg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), corados com Coomassie blue, para confirmar o padrão eletroforético similar das proteínas de cada animal.

5.5.2. Padronização do Western Blot

Confirmado o padrão eletroforético similar, as amostras foram novamente separadas por SDS-PAGE e as proteínas separadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), em sistema úmido.

As membranas foram tratadas com leite desnatado 5% diluído em tampão TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM e Tween-20 0,05%), por 1 hora, para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os respectivos anticorpos primários (Tabela 2), diluídos em leite desnatado 3%, e nas concentrações previamente testadas.

Após várias etapas de lavagem das membranas com tampão TBS-T, foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários, conjugados com a enzima *horseradich peroxidase* (HRP), por 90 minutos em temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas e foi utilizado o sistema de detecção quimioluminescente *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, para gerar um sinal na posição referente a cada proteína detectada.

Tabela 2: Relação dos anticorpos primários e secundários utilizados no *Western Blot*.

Proteína	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Fabricante
MyoD	M-318 (sc-760)	goat anti-rabbit IgG-HRP/sc-2004	Santa Cruz Biotechnology California, USA
Miogenina	M-225 (sc-576)	goat anti-rabbit IgG-HRP/sc-2004	
Miostatina	C-20 (sc-6884)	donkey anti-goat IgG-HRP/sc-2020	
β -actina	R-22 (sc-130657)	goat anti-rabbit IgG-HRP/sc-2004	

5.5.3. Análise Densitométrica e Normalização dos Resultados

O sinal gerado pelas bandas foi captado em filme fotográfico e a quantificação das bandas foi feita por densitometria, utilizando-se o software *Image J software for Windows* (versão 1.71, 2006, Áustria). Os valores de expressão protéica da MyoD, Miogenina e Miostatina foram normalizados pelos valores obtidos para a proteína β -actina, usada como referência. Os valores de expressão relativa gerados são apresentados como unidades arbitrárias.

5.6. Análise Estatística dos Resultados

Para análise estatística dos resultados de frequência das fibras foi utilizado o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de proporções multinomiais (Goodman, 1964; Goodman, 1965).

Para análise dos dados de expressão gênica da MyoD, Miogenina e Miostatina nos músculos vermelho e branco, foi utilizado o teste T para amostras independentes. Para análise dos dados de expressão protéica da MyoD, Miogenina e Miostatina no músculo branco de pirarucus em diferentes estágios de crescimento, foi utilizado o teste de Kruskal-

Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, quando detectado significância estatística.

Para as análises, um nível de significância de 5% foi adotado e foi utilizado o software *GraphPad InStat v. 3.01 software for Windows* (1998, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

6. RESULTADOS

6.1. ARTIGO 1: submetido para publicação no periódico *Genetics and Molecular Biology*.

QUANTITATIVE EXPRESSION OF GROWTH-RELATED GENES IN SKELETAL MUSCLE OF PIRARUCU JUVENILES (*Arapaima gigas* Cuvier 1817: Arapaimatidae, Teleostei).

Fernanda Regina Carani¹, Bruno Oliveira da Silva Duran¹, Caroline Nebo¹, Fernanda Losi Alves de Almeida², Rodrigo Wagner Alves de Souza², Vera Maria Fonseca de Almeida-Val³, Maeli Dal-Pai-Silva¹

¹*Instituto de Biociências, UNESP - Univ Estadual Paulista, Departamento de Morfologia, Distrito de Rubião Jr, s/n, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil.*

²*Instituto de Biologia, UNICAMP - Univ Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.*

³*Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, AM, Brazil.*

Running Title: Skeletal muscle growth in pirarucu.

Key-words: *Myogenic Regulatory Factors; Myostatin; Skeletal Muscle; Pirarucu (Arapaima gigas); Quantitative PCR.*

Corresponding author:

MAELI DAL-PAI-SILVA

Address: Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Morfologia, Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

Telephone/fax number: +55 14 3811 6264

E-mail: dpsilva@ibb.unesp.br

1. ABSTRACT

The characterization of skeletal muscle growth mechanisms in pirarucu (*Arapaima gigas*) is of great interest to aquaculturists because it provides many information so useful to optimize rearing conditions. Pirarucu has some typical muscle growth magnitude, which highlights the significance and the commercial value of this species. The aim of this work was to evaluate the morphology and the growth-related gene expression in red and white skeletal muscle of pirarucu. Muscle samples were collected from the lateral anterior region, and frozen in liquid nitrogen. Histological sections were cut and HE stained for morphological analysis. Red and white muscle samples were used to determine MyoD, myogenin, and myostatin genes expression by Real-time Polymerase Chain Reaction. MyoD and myogenin expression were not statistically different in both muscles; however, myostatin expression was significantly higher in white than red muscle. These results reflect the muscle growth characteristics of this species and could be helpful for improving aquaculture programs.

2. INTRODUCTION

Muscle fiber types in most fish are organized into discrete layers within the myotome. There is a superficial layer of aerobic slow-twitch muscle that powers sustained activity (Johnston *et al.*, 1977; Rome *et al.*, 1984; Rescan, 2005; Jonhston, 2006). The bulk of the myotome is made up of fast muscle fibers, which develop three to five times higher power outputs than superficial slow muscle fibers at higher tail-beat frequencies (Altringham and Johnston, 1990; Rescan, 2005; Jonhston, 2006), reflecting their role in providing the power required for escape responses and predation behaviour. The pattern of muscle fiber type distribution greatly facilitates molecular and physiological studies and their interpretation.

Muscle growth in fish is dependent on proliferation and differentiation of myogenic precursor cells (satellite cells or myoblasts) (Johnston *et al.*, 2000; Rowlerson and Veggetti, 2001). When activated, they proliferate, differentiate, and their nuclei are internalized by existing fibers, which characterize hypertrophic muscle growth (Johnston, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001). Also proliferative myoblasts aggregate to the fiber surface, generate new myotubes, which then separate giving rise to new muscle fibers, a process called hyperplasia (Veggetti *et al.*, 1990; Johnston *et al.*, 2000; Dal Pai-Silva *et al.*, 2003a, 2003b).

Hypertrophy and hyperplasia are both regulated by the sequential expression of Myogenic Regulatory Factors (MRFs), *myoD*, *myf-5*, *myogenin*, and *mrf4*. They are transcriptional factors that bind to a specific DNA sequence, termed *E-box* (5'-CANNTG-3'), found in the promoter region of many muscle-specific genes (Sabourin and Rudnicki, 2000; Rescan, 2001; Watabe, 2001; Johansen and Overturf, 2005). *MyoD* and *myf-5* control the determination of myogenic lineage and regulate myoblast activation and proliferation (Goulding *et al.*, 1994; Williams and Ordahl, 1994). *Myogenin* and *mrf4* act in the myoblast differentiation stage, where myotubes fuse to form new myofibers (Megeney and Rudnicki 1995; Grobet *et al.*, 1997).

Myostatin (*mstn*) is a member of the Transforming Growth Factor beta (*TGF-β*) superfamily of growth and differentiation factors and is known mostly for its potent abilities to negatively regulate mammalian skeletal muscle growth (Lee, 2004). *Myostatin*

expression in mammals is mainly restricted to skeletal muscle (McPherron *et al.*, 1997), adipose tissue (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998), mammary gland (Ji *et al.*, 1998), and cardiac muscle (Sharma *et al.*, 1999). In fish, however, its function may be more diverse and may influence many other tissues as it is widely expressed (Maccatrozzo *et al.*, 2001a, 2001b; Ostbye *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001a; Roberts and Goetz, 2001; Rodgers *et al.*, 2001; Kocabas *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Amali *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2006; Helterline *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2008). Mutations in the *myostatin* gene result in a “double-muscling” phenotype in many cattle breeds and mice (Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997). Furthermore, a similar *myostatin* expression pattern has also been observed in pigs (Ji *et al.*, 1998), chickens (Kocamis *et al.*, 1999), and fish (Acosta *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009).

In contrast to mammals and chickens, fish possess two distinct *myostatin* genes with differential expression (Rodgers *et al.*, 2007). *Myostatin I* is widely expressed in skeletal muscles, the brain, eyes, kidneys, testes, ovaries, digestive tract, and heart; on the other hand, *myostatin II* has a more limited expression profile, being confined to the brain (Maccatrozzo *et al.*, 2001b; Amali *et al.*, 2004; Kerr *et al.*, 2005; Rodgers and Garikipati, 2008).

As a fish is made up predominantly of white muscle (never less than 70% of myotomal muscle), and it represents one of the major protein sources in human food, it is interesting to know about the mechanisms involved in controlling fish muscle growth (Weatherley and Gill, 1985). These studies could greatly contribute to aquaculture programs, as improved production rates is directly related to the muscle growth dynamics of fish species, in particular aquaculture species.

Pirarucu, *Arapaima gigas*, is an Amazonian and economically important large-size fish for aquaculture programs (Nelson, 1994; Li and Wilson, 1996) and grows quickly, reaching up to 3 m long and 250 Kg in weight when adult (Souza and Val, 1991). It has been bred under intensive conditions, with satisfactory production results, reaching 10 Kg in just 1 year (Alcântara and Guerra, 1992; Moura Carvalho and Nascimento, 1992; Cavero *et al.*, 2002).

In order to understand the molecular mechanisms involved in regulating fish muscle growth, we analyzed the muscle morphology and *myoD*, *myogenin*, and *myostatin* genes expression in red and white muscle of pirarucu.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Fish

This experiment was approved by the Bioscience Institute Ethics Committee, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol N° 72/07-CEEA). The specimens of pirarucu (*Arapaima gigas*) (n=7; 47.94 ± 3.64 g) were euthanized with MS-222 (Tricaine Methanensulfonate-SIGMA®). White and red muscles were isolated from deep and superficial layers, respectively, close to the head near the lateral line (Figure 1). Muscle samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

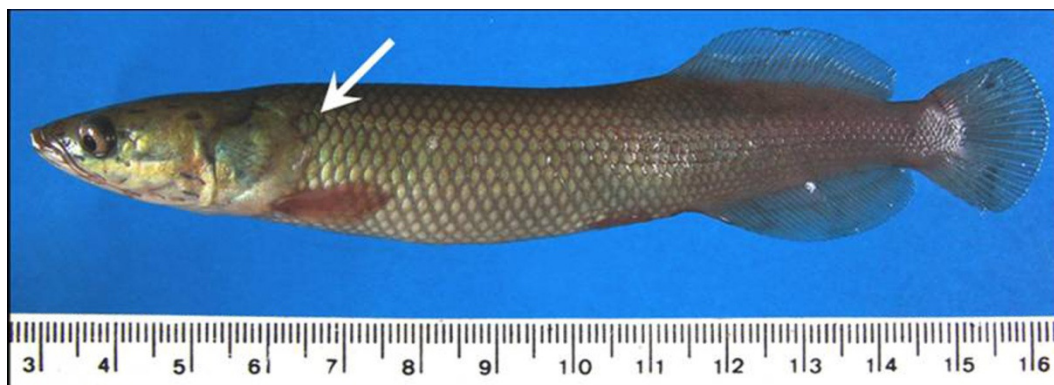


Figure 1: Pirarucu specimen (*Arapaima gigas* C.). Muscle sample area is highlighted.

3.2 Morphological analysis

Histological transversal sections of red and white muscle fiber (10 μ m thick) were obtained in a -20°C cryostat and submitted to Haematoxilin-Eosin staining (Bancroft and Steven, 1990).

3.3. RNA extraction and Reverse Transcription

Total RNA was extracted from muscle samples using *TRIzol*[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions; purity and yield were determined by measuring absorbance of aliquots at 260 and 280 nm. RNA integrity was confirmed by inspecting the electrophoretic pattern of 28S and 18S ribosomal RNA in *SYBR*[®] *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 1,5% agarose gels visualized under ultraviolet light (not shown). Total RNA was incubated with *DNase I - Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove any DNA present in the samples.

Two micrograms of RNA were reverse transcribed using the *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), with 10 µL of reverse transcriptase buffer (10X RT buffer), 4 µL of dNTP (25X), 10 µL of *Random Primers* (10X), 2.5 µL of *MultiScribe*[™] *Reverse Transcriptase* (50 U/µL), 2.5 µL of Recombinant Ribonuclease Inhibitor *RNaseOUT* (40 U/µL), and the final volume adjusted to 100 µL with RNase-free water.

These samples were then PCR amplified with specific primers pairs to *myoD*, *myogenin* and *myostatin* genes, designed from *Ictalurus furcatus* sequences (Accession N° AY562555, AY540993 and AY540992, respectively), available in GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), in order to amplify a segment of these genes. A set of primers designed from the 18S ribosomal RNA consensus fish sequences was used to amplify a segment of 18S rRNA gene in pirarucu muscle samples (Tom *et al.*, 2004), used as reference gene to normalize the relative quantification results.

All PCR products were sequenced using *BigDye*[®] *Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) procedures. The partial nucleic acid sequences obtained (unpublished data) were analyzed in BLASTn search tool (Altschul *et al.*, 1990) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and used to design primer pairs for the qPCR analysis with *Primer Express*[®] software (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA): *myoD* (forward) 5' CCA GCC CCA GGT CCA ACT, (reverse) 5' ACA CGT TGG GCC ATT GAA A; *myogenin* (forward) 5' AGG CTA CCC AAG GTG GAG ATC, (reverse) 5'

TGC AGC CGC TCG ATG TAC T; *myostatin* (forward) 5' CGA AGT ACA TGC ACC TGC AGA A, (reverse) 5' CGT GGG TTG GCC TTG TTT AC; *18S rRNA* (forward) 5' TAC CAC ATC CAA AGA AGG CAG, (reverse) 5' TCG ATC CCG AGA TCC AAC TAC.

3.4. Quantitative RT-PCR

MyoD, *myogenin*, and *myostatin* genes expression analysis were performed with an *ABI 7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A sample without cDNA template was used to verify whether the master mix was free from contamination. Real-time conditions were: 10 min at 95°C, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. Wells contained 25 µL of PCR mixture including 2 µL cDNA at a 1:2 dilution for both red and white muscle samples. Two replicates of each sample and the reference gene were amplified. Data from *Power SYBR[®] Green PCR* amplicons were collected with *ABI 7300 System SDS software v. 1.4* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Fluorescence signal baseline and threshold were set manually for each detector (*myoD*, *myogenin*, *myostatin*, and *18S rRNA*), generating a threshold cycle (Ct) for each sample.

Standard curves for all targets and the reference gene, created on the basis of a linear relationship between the Ct value and the log of the starting cDNA quantity, showed acceptable slope values, between -3.8 and -3.3 (according to Patrino *et al.*, 2008). Standard curves were obtained by using seven serial dilutions of sample cDNAs (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, and 1:128).

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

$\Delta C_{t_{\text{calibrator}}}$). According to *User Bulletin #2* (Applied Biosystems, 2001), the calibrator sample served as reference for comparison with other samples in a gene expression analysis. It could represent an untreated control or a particular stage of development (see Chemistry Guide, Applied Biosystems, 2003).

Red muscle (which had the lowest relative expression, i.e., highest Ct value, for all genes) was chosen as the calibrator sample in order to evaluate putative target gene differential mRNA expression between the two muscle types.

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

3.5. Statistical Analysis

The unpaired t-Test was performed to compare differences in *myoD* and *myogenin* mRNA levels between calibrator sample (red muscle) and white muscle samples. The Welch corrected unpaired t-Test was used to compare differences in *myostatin* mRNA expression levels for both groups. The level of statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$) for all analysis. We used *GraphPad InStat v. 3.01 software for Windows* for both tests (1998, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

4. RESULTS

4.1. Muscle morphology

Skeletal muscle fibers in pirarucu are organized into distinct compartments: the superficial red layer, immediately under the skin, composed of slow-twitch oxidative fibers, and the deep white layer, which predominates into the myotome, is formed by fast-twitch glycolytic fibers. Morphological analysis of skeletal muscle in pirarucu showed a similar muscle fibers pattern within the compartments; fibers were polygonal or round in shape,

multinucleated, and with peripheral nuclei. Both muscles had fibers of different sizes separated by connective tissue, usually called endomysium, and arranged in fascicles by a thick connective septum (Figure 2).

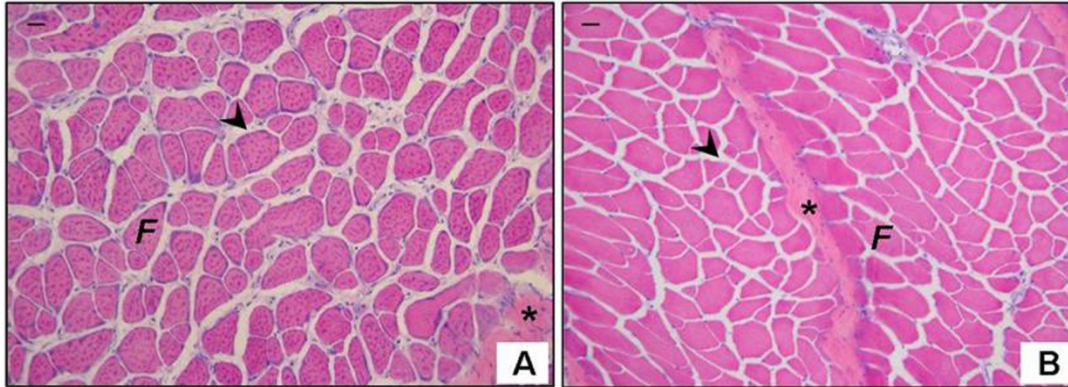


Figure 2: Transverse sections of red (A) and white (B) muscle from juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*); Polygonal fibers (F); Endomysium (arrowheads); Connective septum (*); Scale: 20 μ m. (HE)

4.2. *MyoD*, *myogenin* and *myostatin* mRNA expression

Muscle samples collected from pirarucu were processed for real time PCR analysis to show any differences in *myoD*, *myogenin*, and *myostatin* gene expression levels between red and white muscle. Real time PCR data were recorded as expression relative to red muscle as the calibrator sample (see Material and Methods), normalized to 18S rRNA expression values.

Quantitative analysis showed that estimated *myoD* mRNA levels were not statistically different ($p > 0.05$) between red and white muscle in pirarucu (Figure 3). Similarly, estimated *myogenin* mRNA levels were not different ($p > 0.05$) between the two muscle types (Figure 4). In contrast, estimated *myostatin* mRNA levels showed a striking difference ($p < 0.01$) between muscle types (Figure 5). Data are expressed as mean $\pm$ SEM, represented as arbitrary units.

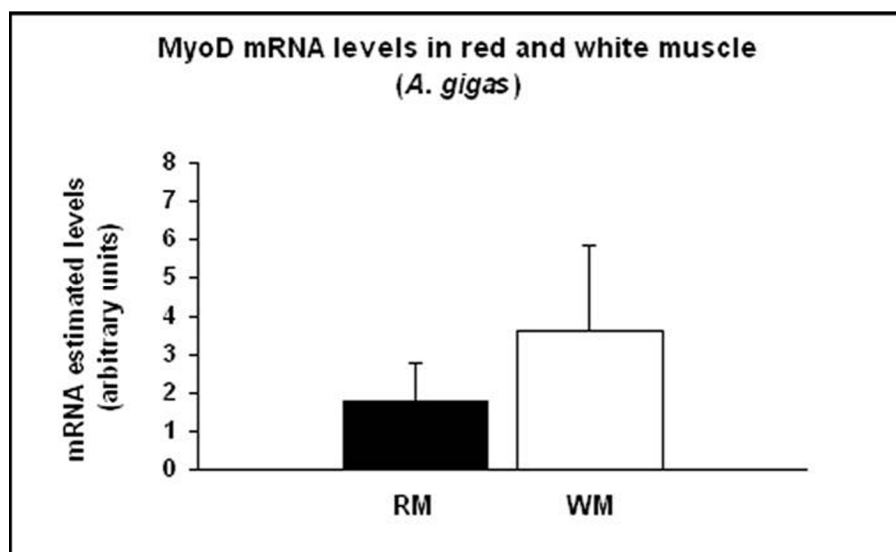


Figure 3: Relative MyoD mRNA expression in red (*RM*) and white (*WM*) muscle of pirarucu (*Arapaima gigas*) by Real-time PCR. No significant difference between groups by Unpaired t-Test ($p > 0.05$).

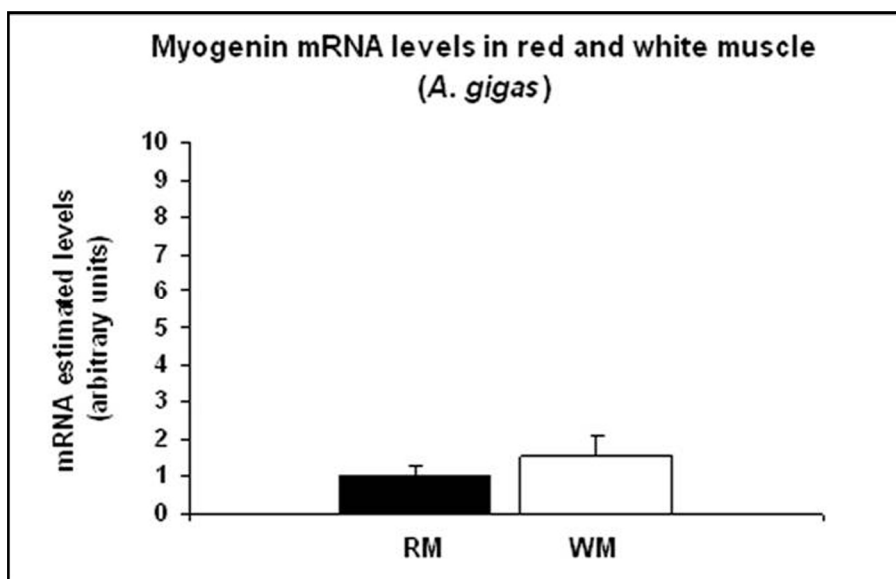


Figure 4: Relative myogenin mRNA expression in red (*RM*) and white (*WM*) muscle of pirarucu (*Arapaima gigas*). No significant difference between groups by Unpaired t-Test ($p > 0.05$).

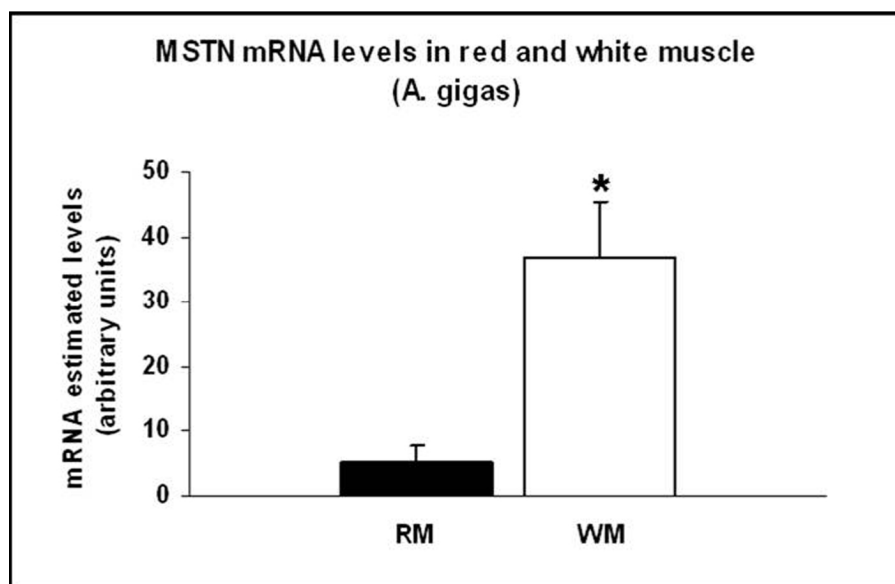


Figure 5: Relative myostatin mRNA expression in red (RM) and white (WM) muscle of pirarucu (*Arapaima gigas*) by Real-time PCR. The Welch corrected Unpaired t-Test shows significant difference between groups (* $p < 0.01$).

5. DISCUSSION

Morphological analysis of pirarucu (*Arapaima gigas*) skeletal muscle showed different muscle fiber types organized into discrete layers: a *superficial red layer*, comprising less than 10% of muscle bulk, mainly consisting of small diameter fibers - the slow-twitch muscle fibers; and a *deep white layer*, thicker than the other, formed by larger diameter fibers, comprising around 70% of muscle bulk - the fast-twitch muscle fibers. This compartmental muscle fiber organization in pirarucu is well-described and has also been well documented in many other fish species (Johnston, 1981; Weatherley and Gill, 1987; Veggetti *et al.*, 1993; Johnston, 1999).

Morphological analysis of red and white muscle showed a typical muscle fiber pattern - polygonal or round, multinucleated, and with peripheral nuclei. Both muscles had fibers of different sizes separated by connective tissue, usually called endomysium, and arranged in fascicles by a thick connective septum (Figure 2). This fiber arrangement is similar to many other teleost fish (Alexander, 1969; Hoyle *et al.*, 1986; Dal Pai-Silva *et al.*,

1995; Dal Pai *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2000; Aguiar *et al.*, 2005) and depends on fish environment requirements (Zhang *et al.*, 1996). Fiber arrangement in fish skeletal muscle depends on fish species, developmental growth stage, and swimming behaviour movement (Veggetti *et al.*, 1990; Dal Pai-Silva *et al.*, 1995; Johnston, 1999; Dal Pai-Silva *et al.*, 2003a, 2003b).

White muscle is the most widely studied compartment in fish because of its importance as food for man. It is the main edible part of a fish and usually makes up 70% of myotomal muscle bulk (Zhang *et al.*, 1996). Red muscle is less important in terms of aquaculture production, but this is not the case for pirarucu breathing behaviour. In this species, there is a thick layer of red muscle fibers along the body lateral line supporting slow continuous swimming movements during aerial respiratory behaviour (Carani *et al.*, 2008).

It is well documented that the intensity and temporal activation of muscle growth mechanisms (hypertrophic and hyperplastic) in teleosts are directly related to growth rate and final fish size (Steinbacher *et al.*, 2006). In slow-growing fish, which reach small sizes, muscle fiber hyperplasia stops early and hypertrophy becomes the predominant growth mechanism (Veggetti *et al.*, 1993; Koumans and Akster, 1995). In fast-growing fish that reach large sizes, fiber hyperplasia and hypertrophy both remain active for a long time (Rowlerson and Veggetti, 2001; Steinbacher *et al.*, 2006). In previous studies we showed that pirarucu has a large proportion of new fibers formed in slow and fast muscles during the initial growth phase, which evidently shows that hyperplasia predominates in this stage, independent of muscle fiber type (Carani *et al.*, 2008). This is consistent with many studies (Alami-Durante *et al.*, 1997; Valente *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 2000; Rowlerson and Veggetti, 2001), and is probably due to the fact that pirarucu needs a lot of fibers for muscle compartments as they reach large sizes in a very short time (Souza and Val, 1991).

As part of a program to understand how fiber type-specific gene expression is controlled, we have focused on transcription factors in postnatal muscle growth that may differentially regulate gene expression between fast and slow muscles. From such factors, we have singled out *myoD*, *myogenin*, and *myostatin*.

During postnatal muscle growth in fish, hyperplasia is mainly regulated by Myogenic Regulatory Factor *myoD*, which is responsible for stimulating myoblast

proliferation and posterior myotube formation (Goulding *et al.*, 1994; Williams and Ordahl, 1994; Rescan, 2001). In this study we found no difference in *myoD* gene expression between red and white muscle.

These results are similar to *myoD* gene expression studies in other fish such as rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Johansen and Overturf, 2005); however, there are many other studies that compare *myoD* expression in fish muscles which have no similarity between their results (Weinberg *et al.*, 1996; Delalande and Rescan, 1999; Tan and Du, 2002; Zhang *et al.*, 2006). These incoherent results, along with ours, presume that differential *myoD* gene expression in fast and slow muscles reflects a difference in regulating the growth mechanisms of these two types of muscle fiber in different fish species. Also, during initial pirarucu growth phases, red and white muscles are being formed at an intense rate, fact also demonstrated by morphological analysis (Carani *et al.*, 2008).

We know that *myogenin* is characterized by regulating the late stages of muscle fiber formation and growth, which culminate in myoblast fusion, myotube formation, and finally, adult muscle fiber differentiation (Megeney and Rudnicki, 1995; Decary *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1997; Schmalbruch and Lewis, 2000).

In our work, *myogenin* gene expression had a similar pattern to *myoD* expression: there was no difference between red and white muscles. This could be related to the intense process of muscle fiber differentiation occurring during this growth stage in pirarucu. These fibers, primarily like undifferentiated myoblasts which are first stimulated by *myoD* expression to proliferate, now have to fuse and form multinucleated myotubes that differentiate into muscle fibers; these late processes are mainly regulated by *myogenin*. We can therefore attribute the similar *myogenin* expression levels in red and white muscle to the intense muscle fiber formation rate and differentiation that occur in a highly activated state in both muscles in pirarucu initial stage.

There are different regulators for muscle growth processes, one of the most important being *myostatin*. Although there are few studies on the functions of *myostatin* in fish, it is known to negatively regulate myoblast proliferation and differentiation (Thomas *et al.*, 2000; Langley *et al.*, 2002). It therefore appears that the biological action of fish

myostatin is not limited to muscle growth suppression, and that it acts in multiple tissues (Roberts and Goetz, 2001).

There are few studies analyzing *myostatin* expression in slow and fast muscles separately. According to Roberts and Goetz (2001), *myostatin* mRNA is higher in red muscle from adult brook trout, king mackerel, and yellow perch; it is also predominantly expressed in white muscle from little tunny; and equally expressed in both muscle types in mahi-mahi (Roberts and Goetz, 2001). Ostbye *et al.* (2001) have demonstrated that in salmon, *myostatin* mRNA is detectable in red muscle only. Furthermore, Patruno *et al.* (2008) have shown high levels of *myostatin* in red and low levels in white muscle of adult sea bass; however no significant difference was found in juvenile.

In our study, we showed a dramatic difference in *myostatin* expression between slow and fast muscles of pirarucu. Red muscle exhibited low levels of *myostatin* mRNA content whereas *myostatin* expression was extremely high in white muscle. This *myostatin* expression pattern is analogous to that observed in adult mammals, where *myostatin* mRNA levels are higher in fast-glycolytic fibers than in slow fibers (Carlson *et al.*, 1999; Matsakas *et al.*, 2006).

Numerous studies have investigated the effect of *myostatin* signalling on muscle cells. In vitro studies on cultured myogenic cell lines or primary myoblasts have shown that *myostatin* inhibits myoblast proliferation and activates Cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which forces withdrawal from the cell cycle (Thomas *et al.* 2000; Taylor *et al.*, 2001; Rios *et al.*, 2002; Joulia *et al.*, 2003). In parallel, activation of *myostatin* signalling is associated with strong inhibition of myogenic differentiation (Langley *et al.* 2002; Rios *et al.* 2002; Joulia *et al.* 2003). Based on these results and the observation that satellite cells express *myostatin* and are quiescent (McCroskery *et al.*, 2003), it has been suggested that the normal function of *myostatin* in postnatal muscle is to maintain satellite cells in a quiescent, undifferentiated state (Manceau *et al.*, 2008).

Our results showed that pirarucu red muscle has low *myostatin* mRNA levels, which indicates intense satellite cell proliferation and hyperplasia. In contrast, white muscle has high *myostatin* mRNA levels, which could indicate that it is acting on the white muscle fiber inhibiting satellite cell proliferation. This is in disagreement with the high myoblast proliferation rate and fiber hyperplasia that are occurring at this development stage,

independent of the slow/fast phenotype. However, we need to consider that, although satellite cells are highly activated, a large population of myotubes has already been formed and their next step is to differentiate into new myofibers. The differentiation process is well characterized and is controlled by the Myogenic Regulatory Factor *myogenin* (Megeney and Rudnicki, 1995; Grobet *et al.*, 1997). The idea that myostatin is regulating the differentiation process by controlling *myogenin* action is well supported by studies that show *myogenin* as a probable major target of endogenous *myostatin* (Joulia *et al.*, 2003). Actually, the effects of *myostatin* on muscle growth are not as well understood in fish as in mammals.

Altogether, our data suggest that *myoD*, *myogenin*, and *myostatin* act to modulate the balance between proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells (or satellite cells) during postnatal muscle growth in the initial growth phase of pirarucu.

Pirarucu is a useful model in aquaculture programs because of its astoundingly fast muscle growth ratio, which makes it unique among teleosts when studying muscle growth patterns. Moreover, fillet yield is high, and the meat possesses a spectacular flavour and texture. Improving this fish production is an ongoing process in aquaculture, and a better understanding of molecular control in muscle development for this economically important species could provide benefits for more intense farming and production quality.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Águas Claras pisciculture (Mococa, SP, Brazil) for providing pirarucu specimens. This work was supported by grants from the FAPESP Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Process N° 2007/59584-0 and 2007/58896-9) and CNPq Foundation (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Process N° 304070/2009-2 and 474084/2009-4XXX).

7. REFERENCES

- Acosta J, Carpio Y, Borroto I, Gonzalez O and Estrada MP (2005) Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of Biotechnology* 119:324-331.
- Aguiar DH, Barros MM, Padovani CR, Pezzato LE and Dal Pai-Silva M (2005) Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of Fish Biology* 67:1-12.
- Alami-Durante H, Fauconneau B, Rouel M, Escaffre AM and Bergot P (1997) Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth rate. *Journal of Fish Biology* 50:1285-1302.
- Alcántara FB and Guerra HF (1992) Cultivo de paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlassoma bimaculatum*, como presa. *Folia Amazônica* 4:129-139.
- Alexander R (1969) The orientation of muscle in the myomers of fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49:263-290.
- Altringham JD and Johnston IA (1990) Modelling muscle power output in a swimming fish. *Journal of Experimental Biology* 148:395-402.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Amali AA, Lin CJ, Chen YH, Wang WL, Gong HY, Lee CY, Ko YL, Lu JK, Her GM, Chen TT *et al.* (2004) Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Developmental Dynamics* 229:847-856.
- Bancroft JD and Steven A (1990) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, New York, 704 pp.
- Carani FR, Aguiar DH, Almeida FLA, Gonçalves HS, Padovani CR and Dal-Pai Silva M (2008) Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). *Acta Scientiarum Biological Sciences* 30:205-211.
- Carlson CJ, Booth FW and Gordon SE (1999) Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fibre-type specific and increases during hindlimb unloading. *American Journal of Physiology* 277:601-606.

- Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú DR, Gandra ALE and Crescêncio R (2002) Capacidade de sustentação e biomassa econômica de juvenis de pirarucu criados em tanques-rede de pequeno volume no período de pré-engorda. In: Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura. Goiânia, GO p13.
- Dal Pai V, Dal Pai-Silva M, Carvalho ED, Fujihara CY, Gregorio EA and Curi PR (2000) Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anatomia Histologia Embryologia* 29:283-289.
- Dal Pai-Silva M, Dal Pai V, Mota DL and Rodrigues AC (1995) Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* Boch, 1795. *Annals of Anatomy* 177:65-70.
- Dal Pai-Silva M, Carvalho RF, Pellizzon CH and Dal Pai V (2003a) Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell* 35:179-187.
- Dal Pai-Silva M, Freitas EMS, Dal Pai V and Rodrigues AC (2003b) Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Archive of Fishery And Marine Research* 50:149-160.
- Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP and Butler-Browne GS (1997) Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Human Gene Therapy* 8:1429-1438.
- Delalande JM and Rescan PY (1999) Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Development Genes And Evolution* 209:432-437.
- Delgado I, Fuentes E, Escobar S, Navarro C, Corbeaux T, Reyes AE, Vera MI, Alvarez M and Molina A (2008) Temporal and spatial expression pattern of the myostatin gene during larval and juvenile stages of the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 151:197-202.
- Fernandez DA, Calvo J, Franklin CE and Johnston IA (2000) Muscle fibre types and size distribution in sub-antarctic notothenoid fishes. *Journal of Fish Biology* 56:1295-1311.
- Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M *et al.* (1998) Organization of the human myostatin gene and

- expression in healthy men and HIV infected men with muscle wasting. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 95:14938-14943.
- Goulding M, Lumsden A and Paquette AJ (1994) Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. Development 120:957-971.
- Grobet L, Royo Martin LJ and Poncelet DA (1997) Deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. Nature Genetics 17:71-74.
- Helterline DLI, Garikipati D, Stenkamp DL and Rodgers BD (2007) Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish. General and Comparative Endocrinology 151:90-97.
- Hoyle J, Gill HS and Weatherley AH (1986) Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellinge, *E. masquinongy* (Mitchill). Journal of Fish Biology 28:393-401.
- Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FF and Spurlock ME (1998) Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. American Journal of Physiology 275:R1265-R1273.
- Johansen KA and Overturf K (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine Biotechnology 7:576-587.
- Johnston IA (1981) Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. Cell And Tissue Research 214:369-379.
- Johnston IA (1999) Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. Aquaculture 177:99-115.
- Johnston IA (2006) Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. The Journal of Experimental Biology 209:2249-2264.
- Johnston IA, Davison W and Goldspink G (1977) Energy metabolism of carp swimming muscles. Journal of Comparative Physiology 114:203-216.
- Johnston IA, Alderson R, Sandham C, Dingwall A, Mitchell D, Selkirk C, Nickell D, Baker R, Robertson B, Whyte D *et al.* (2000) Muscle fibre density in relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo solar* L.). Aquaculture 189:335-349.

- Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B and Cabello G (2003) Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research* 286:263-275.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP and Bass JJ (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research* 7:910–916.
- Kerr T, Roalson EH and Rodgers BD (2005) Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evolution Development* 7:390-400.
- Ko CF, Chiou TT, Chen TT, Wu JL, Chen JC and Lu JK (2006) Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Marine Biotechnology* 9:20-32.
- Kocabas AM, Kucuktas H, Dunham RA and Liu Z (2002) Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1575:99-107.
- Kocamis H, Kirkpatrick-Keller DC, Richter J and Killefer J (1999) The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B mRNA expression during chicken embryonic development. *Growth Development and Aging* 63:143-150.
- Koumans JTM and Akster HA (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110A:3-20.
- Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S and Kambadur R (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry* 277:49831-49840.
- Lee S-J (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:61-86.
- Lee C-Y, Lu J-K and Wu J-L (2009) Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387:766-771.
- Li GQ and Wilson MVH (1996) Phylogeny of Osteoglossomorpha. In: Stiassny ML, Parenti LR and Johnson GD (ed) *Interrelations of Fishes*. Academic Press, San Diego, California/USA, pp 163-174.

- Livak KJ and Schmittgen TD (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 and Patarnello T (2001a) Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Marine Biotechnology* 3:224-230.
- Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, Rizzo G and Patarnello T (2001b) A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Letters* 509:36-40.
- Manceau M, Gros J, Savage K, Thomé V, McPherron A, Paterson B and Marcelle C (2008) Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes & Development* 22:668-681.
- Matsakas A, Bozzo C, Cacciani N, Caliaro F, Reggiani C, Mascarello F and Patruno M (2006) Effects of swimming exercise and training on myostatin expression in red and white gastrocnemius muscle and in the heart of the rat. *Experimental Physiology* 91:983-994.
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M and Kambadur R (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Journal of Cell Biology* 162:1135-1147.
- McPherron AC, Lawler AM and Lee S-J (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90.
- Megeney LA and Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochemistry and Cell Biology* 73:723-732.
- Moura Carvalho LOD and Nascimento CNB do (1992) Engorda de pirarucus (*Arapaima gigas*) em associação com búfalos e suínos. Belém: EMBRAPA-CPATU. Circular Técnica 65:21p.
- Nelson JS (1994) *Fishes of the World*. 3rd edition. John Wiley and Sons Inc., New York, 600 pp.
- Ostbye TK, Galloway TF, Nielsen C, Gabestad I, Bardal T and Andersen O (2001) The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European Journal of Biochemistry* 268:5249-5257.
- Patruno M, Sivieri S, Poltronieri C, Sacchetto R, Maccatrozzo L, Martinello T, Funkenstein B and 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 and Tissue Research* 331:643–658.
- Rescan PY (2001) Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130:1-12.
- Rescan PY (2005) Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *General and Comparative Endocrinology* 142:111-116.
- Rescan PY, Jutel I and Ralliere C (2001a) Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204:3523-3529.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM and Devesa J (2002) Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 282:C993-C999.
- Roberts SB and Goetz FW (2001) Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Letters* 491:212-216.
- Rodgers BD and Garikipati DK (2008) Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine Reviews* 29:513-534.
- Rodgers BD, Weber GM, Sullivan CV and Levine MA (2001) Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142:1412-1418.
- Rodgers BD, Roalson EH, Weber GM, Roberts B and Goetz FW (2007) A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 292:E371-E372.
- Rome LC, Loughna PT and Goldspink G (1984) Muscle fibre activity in carp as a function of swim speed and muscle temperature. *American Journal of Physiology* 247:R272-R278.
- Rowlerson A and Veggetti A (2001) Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. In: Johnston IA (ed) *Muscle development and growth. Fish Physiology* 18. Academic Press, San Diego, California/USA, pp 103-140.

- Sabourin LA and Rudnicki MA (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics* 57:16-25.
- Schmalbruch H and Lewis DM (2000) Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle and Nerve* 23:617-626.
- Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ and Bass JJ (1999) Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *Journal of Cellular Physiology* 180:1-9.
- Souza RH de S and Val AL (1991) O gigante das águas doces. *Ciência Hoje* 11:129-133.
- Steinbacher P, Haslett JR, Six M, Gollmann HP, Sängner AM and Stoiber W (2006) Phases of myogenic cell activation and possible role of dermomyotome cells in teleost muscle formation. *Developmental Dynamics* 235:3132-3143.
- Tan X and Du SJ (2002) Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Development Genes And Evolution* 212:207-217.
- Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard Jr DH, Kull Jr FC and Gonzalez-Cadavid N (2001) Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 280:E221-E228.
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 275:40235-40243.
- Tom, M, Chen, N, Segev, M, Herut, B and Rinkevich, B (2004) Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an environmental biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 48:705-710.
- Valente LMP, Rocha E, Gomes EFS, Silva MW, Oliveira MH, Monteiro RAF and Fauconneau B (1999) Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 55:675-691.
- Veggetti A, Mascarello F and Scapolo PA (1990) Hiperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural and morphometric study. *Anatomy and Embriology* 182:1-10.

- Veggetti A, Mascarello F, Scapolo PA, Rowlerson A and Candia CMD (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. *Anatomy and Embryology* 187:353-361.
- Watabe S (2001) Myogenic regulatory factors. In: Johnston IA (ed) *Muscle development and Growth Fish Physiology* 18. Academic Press, San Diego, California/USA, pp 19-41.
- Weatherley AH and Gill HS (1985) Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia* 41:353-354.
- Weatherley AH and Gill HS (1987) *The biology of fish growth*. Academic Press, London.
- Weinberg ES, Allende ML, Kelly CS, Abdelhamid A, Murakami T, Andermann P, Doerre OG, Grunwald DJ and Riggleman B (1996) Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development* 22:271-280.
- Williams BA and Ordahl CP (1994) Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* 120:785-796.
- Xu C, Wu G, Zohar Y and Du SJ (2003) Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 206:4067-4079.
- Xue L, Qian K, Qian H, Li L, Yang Q and Li M (2006) Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in croceine croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Molecular Biology Reports* 33:129-135.
- Zhang G, Swank DM and Rome LC (1996) Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *Journal of Morphology* 229:71-81.
- Zhang Y, Tan X, Zhang P and Xu Y (2006) Characterization of Muscle-Regulatory Gene, MyoD, from Flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Analysis of Its Expression Patterns During Embryogenesis. *Marine Biotechnology* 8:139-148.

6.2. ARTIGO 2: a ser submetido para publicação no periódico *The Journal of Experimental Biology*.

CELLULARITY AND EXPRESSION OF GROWTH-RELATED FACTORS IN SKELETAL MUSCLE OF PIRARUCU (*Arapaima gigas*) DURING GROWTH

Fernanda Regina Carani², Bruno Oliveira da Silva Duran¹, Caroline Nebo¹, Fernanda Losi Alves de Almeida¹, Warlen Pereira Piedade¹, Rodrigo Wagner Alves de Souza², Vera Maria Fonseca de Almeida-Val³, Maeli Dal-Pai-Silva¹

¹*Department of Morphology, Institute of Biosciences, State University of Sao Paulo - UNESP 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.*

²*Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics, Institute of Biology, CP 6109, University of Campinas – UNICAMP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.*

³*Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM, National Institute of Amazonian Researches, INPA, Manaus, AM, Brazil.*

Running Title: Skeletal muscle growth in pirarucu.

Key-words: *Myogenic Regulatory Factors; Myostatin; Skeletal Muscle Growth; Pirarucu (Arapaima gigas); RT-qPCR; Western Blot.*

Corresponding author:

MAELI DAL-PAI-SILVA

Address: Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Morfologia, Distrito de Rubião Jr, s/n, CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

Telephone/fax number: +55 14 3811 6264

E-mail: dpsilva@ibb.unesp.br

ABSTRACT

Pirarucu (*Arapaima gigas*) is one of the most important fish species of the Amazon basin because of its large adult body size and fast growth rate. Skeletal muscle in this species constitutes the major edible part of fish, being an important protein source for human consumption. Post-natal muscle growth is regulated by expression of myogenic regulatory factors (MRFs) MyoD and Myogenin, and also by Myostatin. We hypothesize that, as pirarucu is a fish that reaches a large adult size, muscle growth control by MRFs and Myostatin occurs differentially, in accordance on growth stage considered. Then, in the present study, we evaluated the morphological aspects and the expression of growth-related factors in skeletal muscle of pirarucu. Specimens were grouped according to their average body weight: group A (50 g, n=7), group B (420 g, n=7), group C (5.5 kg, n=7) and group D (9.1 kg, n=7). Transverse sections of red and white muscles were obtained to evaluate muscle fibers morphology and morphometry. Hypertrophy and hyperplasia rates were described by classifying the small diameters of white muscle fibers into classes: class 10, class 20, class 30, class 50, class 80 and class >80. MyoD, myogenin and myostatin genes and protein expression were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-qPCR) and by Western Blot, respectively. Pirarucu skeletal muscle had similar morphology at all growth stages. Morphometric analysis showed that group A had the majority of fibers in class 20; group B exhibit most fibers in class 50; group C showed fibers predominating in classes 50 and 80, and group D had most fibers in class 80, demonstrating that hyperplasia and hypertrophy are the main muscle growth mechanisms acting at initial and later stages, respectively. Both mRNA and protein levels for myoD and myogenin were similar in all groups. However, myostatin mRNA levels were low in group A, increasing in groups B, C and D. Myostatin protein levels were high in group A, decreasing in groups B, C and D. The MRFs and myostatin levels could be involved with the modulation of a balance between proliferation and differentiation of satellite cells, controlling the hyperplasia and hypertrophy that occur during postnatal muscle growth. As pirarucu represents an interesting model for aquaculture programs, there is currently interest in the development of suitable strategies that could in order improve fish and fillet production.

INTRODUCTION

Pirarucu (*Arapaima gigas*), a member of the largest freshwater fish group in the world, is considered one of the most important species of Amazonian ichthyofauna. Reaching up to three meters in length and 250 kilograms in weight (Salvo-Souza and Val, 1990; Graham, 1997), this species carries some intrinsic characteristics, such precocity and rusticity, which enable them to be included in intensive rearing programs and produce great performance results. For this reason, to investigate some aspects of skeletal muscle growth mechanisms in this species is of great interest, since skeletal muscle comprises the whole fillet totality and meat is tasty, devoid of spines and widely accepted by population (Carvalho and Nascimento, 1992; Imbiriba, 2001).

Fish skeletal muscle covers between 40 to 75% of total body mass and is constituted by different muscle fibers type, organized in distinct areas. Myotomes of adult fish contain a superficial lateral zone with slow-red aerobic fibers and the bulk of musculature consists of fast-white anaerobic fibers. Between them, there is an intermediate layer of fibers with intermediate characteristics related to metabolic and contractile activities (Hoyle *et al.*, 1986; Weatherley and Gill, 1987; Sanger and Stoiber, 2001; Rescan, 2005). During slow swimming speeds, as fish migrates, the red muscle layer is the major active portion of muscle mass, whereas white muscle is mostly recruited for bursts of rapid vigorous activity. Intermediate fibers usually are associated with many movements, using energy from both metabolic processes (Johnston *et al.* 1977, 1999; Weatherley and Gill, 1987; Zhang *et al.*, 1996).

Postnatal muscle growth in fish involves activation and proliferation of a set of quiescent myogenic precursor cells, termed satellite cells, located at fiber periphery (Alfei *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 2000). Their nuclei are absorbed by existing fibers as they expand in size (hypertrophy) or they fuse each other to form multinucleated myotubes and new fibers (hyperplasia). In fish, muscle growth continues by both hyperplasic and hypertrophic mechanisms throughout animal life (Valente *et al.*, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001). These muscle growth mechanisms are regulated by several muscle-specific transcriptional factors, as the Myogenic Regulatory Factors (MRFs), and by growth factors

produced locally by muscle cells or neighboring tissues (Hawke and Garry, 2001; Rescan, 2001; Stamler and Meissner, 2001; Watabe, 2001).

There are four MRFs described in literature, termed MyoD, Myf5, Myogenin and MRF4. During post-natal muscle growth, MyoD and Myf5 are the first MRFs to be expressed in active satellite cells, regulating its proliferation and therefore controlling hyperplasia. Otherwise, Myogenin and MRF4 are involved with cell differentiation, and they can be involved with the hypertrophy process, leading to fiber maturation (Goulding *et al.*, 1994; Williams and Ordahl, 1994; Megeney and Rudnicki, 1995; Watabe, 2001; Johansen and Overturf, 2005).

Another important regulator of skeletal muscle growth is the Growth and Differentiation Factor 8 (GDF-8), widely known as Myostatin. Myostatin is a member of TGF- β superfamily proteins that negatively regulates muscle growth, inhibiting both myoblast proliferation and differentiation (McPherron *et al.*, 1997; Lee and McPherron, 1999; Thomas *et al.*, 2000; Langley *et al.*, 2002). Mice and cattle carrying myostatin mutations have shown a significant increase of skeletal muscle mass (Grobet *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997). Moreover, myostatin blockade in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced larger fish, with increased average body weight and a giant phenotype, due to high muscle hypertrophy and hyperplasia processes (Acosta *et al.*, 2005; Rebhan and Funkenstein, 2008; Medeiros *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).

Myostatin has been isolated and characterized in several fish species (Maccatrozzo *et al.*, 2001a,b; Ostbye *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001a; Roberts and Goetz, 2001; Rodgers *et al.*, 2001; Langley *et al.*, 2002; Radaelli *et al.*, 2003). In contrast with mammals, whose a single myostatin gene is specific to skeletal muscle, myostatin expression in fish is related to at least two genes, presents in muscle and non-muscle tissues (Maccatrozzo *et al.*, 2001a,b; Rodgers *et al.*, 2001; Østbye *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001a; Kocabas *et al.*, 2002); this fact reinforces the idea that Myostatin function in fish is not limited to skeletal muscle.

Considering the dynamics of fast growing in pirarucu development, it is very important to elucidate the morphological aspects, and the cellular and molecular mechanisms that control skeletal muscle growth in this species. These results will be of

great interest to aquaculturists contributing with improvements in intensive rearing programs, which leads to increase fish fillet production. Then, the aim of the present study was to investigate the morphological aspects of red and white muscles, the white muscle growth mechanisms and the expression of growth-related factors in skeletal muscle of pirarucu during growth.

MATERIAL AND METHODS

Fish and Sample Collection

This study was approved by Biosciences Institute Ethics Committee, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (Protocol N° 72/07-CEEA). The specimens of pirarucu (*Arapaima gigas*) were obtained from Liberdade fish-farming, located in Uirapuru, GO, Brazil. Specimens were grouped according to their average body weight, as follows: group A (50 grams, n=7), group B (420 grams, n=7), group C (5.5 kilograms, n=7) and group D (9.1 kilograms, n=7).

The animals were euthanized in a tank containing ice. Red and white muscle samples were obtained from superficial and deep lateral line region, respectively; white muscle was also collected from dorsal region. Both sample areas were located close to the cranial region. Muscle samples collected were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Morphological and Morphometric Analysis

To evaluate morphological aspects, histological transverse sections of red and white muscle samples (10 µm thick) were obtained in a -20°C cryostat microtome and stained with Haematoxylin-Eosin (Bancroft and Steven, 1990). For muscle fiber oxidative metabolism activity analysis, histological sections were submitted to Nicotinamide Adenine Dinucleotide – Tetrazolium Redutase (NADH-TR) reaction.

Hyperplasic and hypertrophic white muscle growth rates were analyzed by measure of the smallest diameter of 150 white muscle fibers per animal using a computerized image

analyzer (*Digital Image Analysis System QWin v.3 for Windows/Leica*, Wetzlar, Germany). We analyzed white muscle because it is the most important tissue required during movements and comprises the whole fillet totality. Muscle fibers were grouped into classes, according to their diameter: class 10 ($<10\ \mu\text{m}$), class 20 ($\geq 10\ \mu\text{m}$, $<20\ \mu\text{m}$), class 30 ($\geq 20\ \mu\text{m}$, $<30\ \mu\text{m}$), class 50 ($\geq 30\ \mu\text{m}$, $<50\ \mu\text{m}$), class 80 ($\geq 50\ \mu\text{m}$, $<80\ \mu\text{m}$) and class >80 ($\geq 80\ \mu\text{m}$), adapted from Veggetti *et al.* (1990) and Valente *et al.* (1999).

Gene Expression Analysis

Total RNA Isolation and Reverse Transcription

Total RNA was extracted from white muscle tissue of pirarucu, using *Trizol*[®] reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and following the manufacturer's protocol. RNA samples were eluted in nuclease-free water and quantified by measuring the optical density (OD) at 260 and 280 nm, using a *NanoVue™ Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). RNA purity was ensured by obtaining a 260/280 nm OD ratio ≥ 1.8 , and its integrity confirmed by electrophoresis on agarosis gels. Total RNA was incubated with *DNase I - Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to remove any residual genomic DNA present in the samples. Two micrograms of RNA were reverse transcribed using the *High Capacity cDNA archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), as per manufacturer's recommendations, and the final volume adjusted to 100 μL with RNase-free water.

Reverse Transcription - Polimerase Chain Reaction (RT-PCR), Sequencing and Sequence Analysis

Complementary DNA (cDNA) was amplified using primers pairs designed from *Ictalurus furcatus* myoD (Acession N° AY562555), myogenin (Acession N° AY540993) and myostatin (Acession N° AY540992) genes sequences available in GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), in order to amplify a segment of these genes. A set of

primers designed from the 18S ribosomal RNA consensus fish sequences was used to amplify a segment of 18S rRNA gene in pirarucu muscle samples (Tom *et al.*, 2004).

Each PCR consisted of 0.2 µg of cDNA, 0.2 mM of each primer, 22,5 µL of *Platinum[®] PCR Supermix* (22 U/mL *Platinum[®] Taq DNA Polymerase*, 22 mM Tris-HCl pH 8.4, 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dNTPs - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), in a final volume of 25 µL. PCR amplifications were carried out with an initial denature step at 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 1 minute, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1,5 minute, with an additional extension step at 72°C for 5 minutes. PCR products were fractioned on 1.5% agarosis gel, stained with *GelRed[®]* (Biotium, Hayward, CA, USA), and visualized under UV light using an image documentation system.

RT-PCR products were submitted to automated sequencing on *ABI 377 Automated DNA Sequencer* (Applied Biosystems, USA) using *BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), according manufacturer's instructions. Nucleic acid sequence database searches were performed using *BLASTn* tool (Altschul *et al.*, 1990) at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

MyoD, myogenin, myostatin and 18S rRNA partial sequences obtained in skeletal muscle of pirarucu were used to design primers pairs to the quantitative PCR analysis.

Quantitative PCR

MyoD, myogenin and myostatin genes expression analysis were performed using *ABI 7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Primers were designed using *Primer Express[®]* software (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) from pirarucu sequences obtained in RT-PCR procedures. Primers sequences are listed: *MyoD* (forward) 5' CCA GCC CCA GGT CCA ACT, (reverse) 5' ACA CGT TGG GCC ATT GAA A; *Myogenin* (forward) 5' AGG CTA CCC AAG GTG GAG ATC, (reverse) 5' TGC AGC CGC TCG ATG TAC T; *Myostatin* (forward) 5' CGA AGT ACA TGC ACC TGC AGA A, (reverse) 5' CGT GGG TTG GCC TTG TTT AC; *18S rRNA*

(forward) 5' TAC CAC ATC CAA AGA AGG CAG, (reverse) 5' TCG ATC CCG AGA TCC AAC TAC. Ribosomal RNA 18S gene was used as the reference gene in this study.

PCR efficiencies for target and reference genes were evaluated from a seven serial dilutions (1:10) of sample cDNAs and showed an acceptable slope value of -3.32 (Medhurst *et al.*, 2000).

Each qPCR reaction mixture contained 12.5 μ L of 2.5X *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 40 ng of cDNA (20 ng/ μ L), 500 nM of each primer and RNase-free water in a final volume of 25 μ L. Amplification was performed in duplicate (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) with the following thermal cycling conditions: initial activation 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 15s at 95°C and 1 minute at 60°C. Control reactions included a no template control (NTC) and no reverse transcription control (-RT). Dissociation analysis of the PCR products was performed by running a gradient from 60°C to 95°C to confirm the presence of a single PCR product. Products were also sequenced to confirm identity. Fluorescent signal baseline and threshold were set manually for each detector (MyoD, myogenin, myostatin, and 18S rRNA), generating a threshold cycle (Ct) for each sample.

Sample quantification was determined by the Comparative Ct method ($\Delta\Delta C_t$ method) and 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).

Protein Expression Analysis

Protein levels of MyoD, Myogenin and Myostatin from white muscle of pirarucu were determined by Western Blot technique, using β -actin protein as normaliser.

Muscle samples were homogenized in lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 μ g/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride - PMSF, 0.25 mM Na₃VO₄, NaCl 150 mM, and Tris-HCl 50 mM pH 7.5). The samples were centrifuged at 11,000 rpm for 20 min, and 50 μ L of homogenate fraction was re-suspended in 25 μ L of Laemmli loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/mL bromophenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M b-

mercaptoethanol). An amount of 70 µg of total protein was fractioned by one-dimensional SDS-PAGE gel (12%), stained with Coomassie blue, to confirm equal loading of each sample. Proteins were transferred from gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

Nonspecific binding sites were blocked using skim milk/Tris-HCl buffered saline-Tween buffer (TBS-T: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20), followed by specific primary antibody incubation overnight at 4°C (Table 1). After three washing steps of 10 minutes using TBS-T buffer, membranes were incubated with specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, according to the primary antibodies used (Table 1). Procedures ranged according to each specific protein analyzed, varying among blocking solution concentration, blocking time period, primary and secondary antibody dilution.

Immunoreactive protein signals were detected using *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), according manufacturer's recommendations. Signals were captured in a immunoblotting film paper and the bands intensities were quantified using a densitometry analysis software (*Image J software for windows*, version 1.71, 2006, Austria).

Table 1: Primary and secondary antibodies used in Western Blot analysis.

Protein	Primary Antibody	Secondary Antibody	Manufacturer
MyoD	M-318 (sc-760)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	Santa Cruz Biotechnology California, USA
Myogenin	M-225 (sc-576)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	
Myostatin	C-20 (sc-6884)	donkey anti-goat IgG-HRP/ sc-2020	
β-actin	R-22 (sc-130657)	goat anti-rabbit IgG-HRP/ sc-2004	

Statistical Analysis

Goodman statistical test for multinomial proportions was used for muscle fiber's class distribution analysis (Goodman, 1964; Goodman, 1965). For gene and protein expression analysis, the statistical test applied was Kruskal-Wallis, followed by Dunn multiple comparisons post-test, when detected any statistical significance. For all analysis, statistical significance level adopted was 5% ($p < 0.05$) and the *GraphPad InStat v. 3.01 software for Windows* (1998, GraphPad Software, San Diego, California, USA) was used.

RESULTS

Morphological Analysis

In all studied groups, red and white muscles exhibited a similar morphological pattern. Muscle fibers presented a normal aspect, polygonal or round in shape, multinucleated, with nuclei located in fiber periphery. There were fibers with different size, separated by a thin connective tissue, also called endomysium. Groups of fibers were distributed in fascicles, separated by a connective tissue, named perimysium (Figure 1).

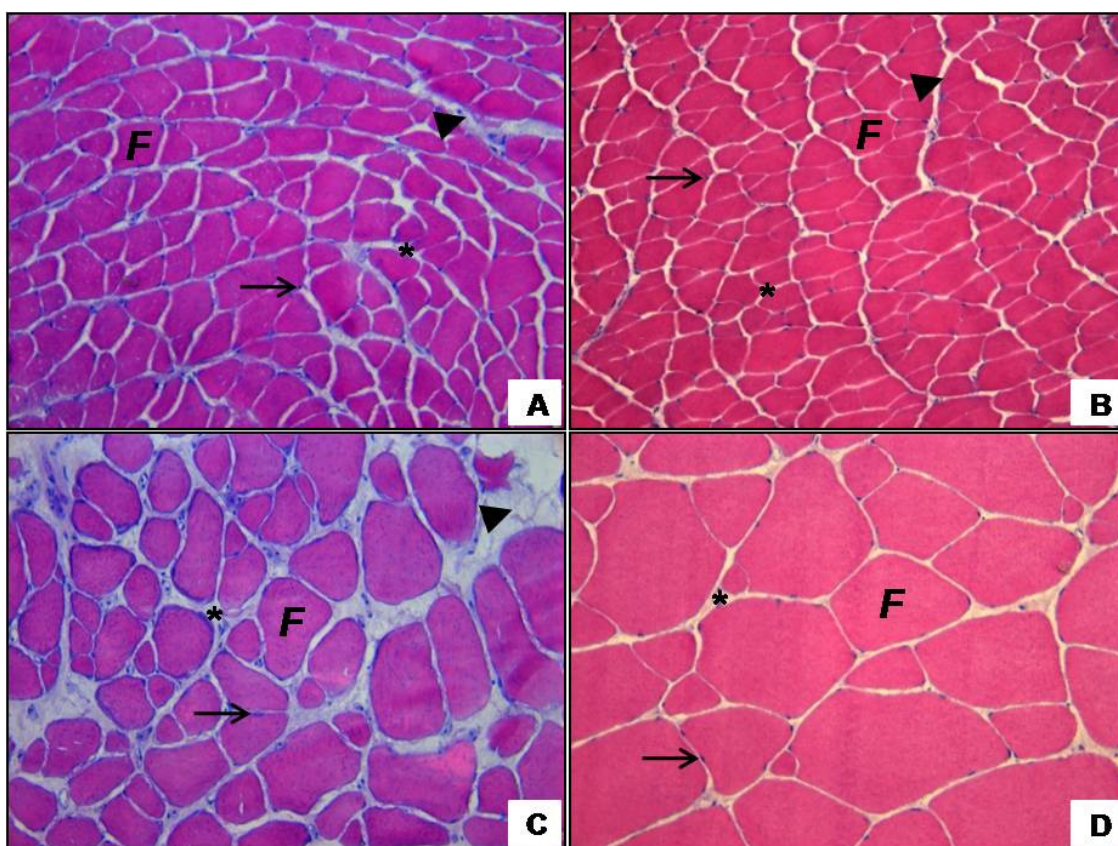


Figure 1: Histological sections of pirarucu (*A. gigas*) skeletal muscle from group A (**A** and **B**) and group C (**C** and **D**). In **A** and **C** red muscle and in **B** and **D**, white muscle. Polygonal or round muscle fibers (**F**) surrounded by a thin connective tissue, the endomysium (*). Note the perimysium (arrowhead) grouping muscle fibers into fascicles. Nuclei (arrow) are in the peripheral location. *HE stain (40X)*

In white muscle of dorsal region, the connective tissue of the perimysium was thicker and arranged in concentric layers, surrounding groups of muscle fibers (Figure 2).

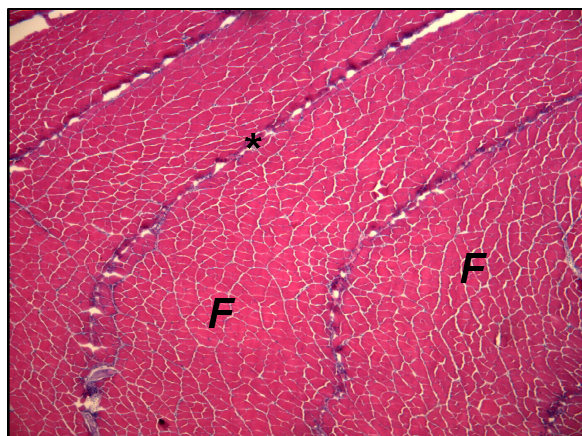


Figure 2: Transversal section of white muscle from dorsal region of pirarucu (*A. gigas*) of group A. Note a thick connective tissue of perimysium (*) which organizes sets of fibers into concentric layers (F). HE stain (20X)

The NADH-TR reaction allowed us to differentiate muscle fibers according to their oxidative metabolism activity. In white muscle from both dorsal and deep lateral regions, there were white fibers with weak stain to the enzyme; on the other hand, red muscle from superficial lateral region exhibited fibers with intense NADH-TR reaction (Figure 3). In lateral line region, between red and white fibers, there were fibers with moderate reaction, forming a layer of intermediate muscle fibers (not shown).

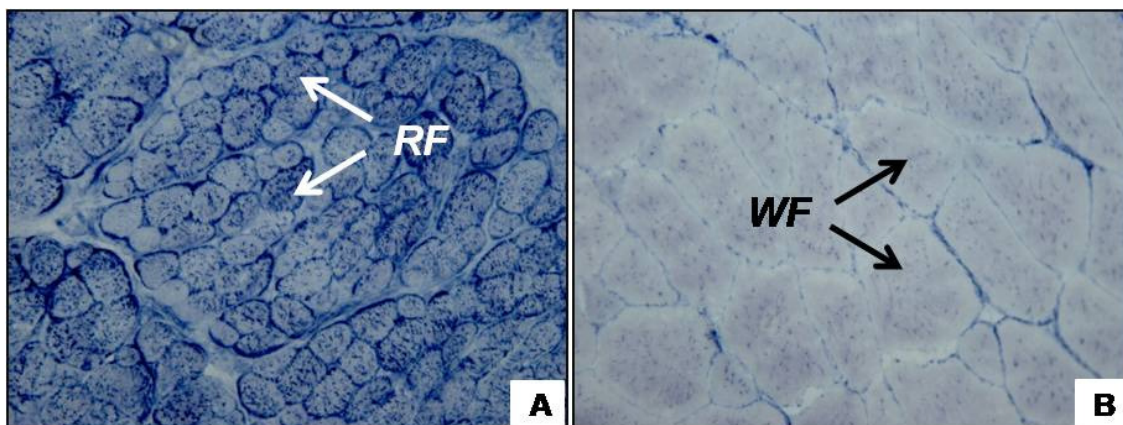


Figure 3: Transversal sections of superficial red (A) and deep white (B) muscle of pirarucu (*A. gigas*) from groups C and D, respectively. Red muscle fibers (RF) strongly stained. White muscle fibers (WF) weakly stained. NADH-TR reaction (40X)

Morphometric Analysis

Transverse sections of white muscle fibers in different groups of pirarucu showed small-diameter fibers between larger fibers, resulting in a mosaic appearance of fiber diameter (Figures 1B and 1D). This pattern was observed in both dorsal and lateral white musculature.

Morphometry involved the small fiber diameter measurement, and Figure 4 shows the frequency distribution of muscle fibers according to their diameter. The following muscle fibers distribution pattern was observed among the fish groups: group A had the majority of fibers in class 20; group B exhibited most fibers in class 50; group C showed fibers predominating in classes 50 and 80, and group D had most fibers in class 80.

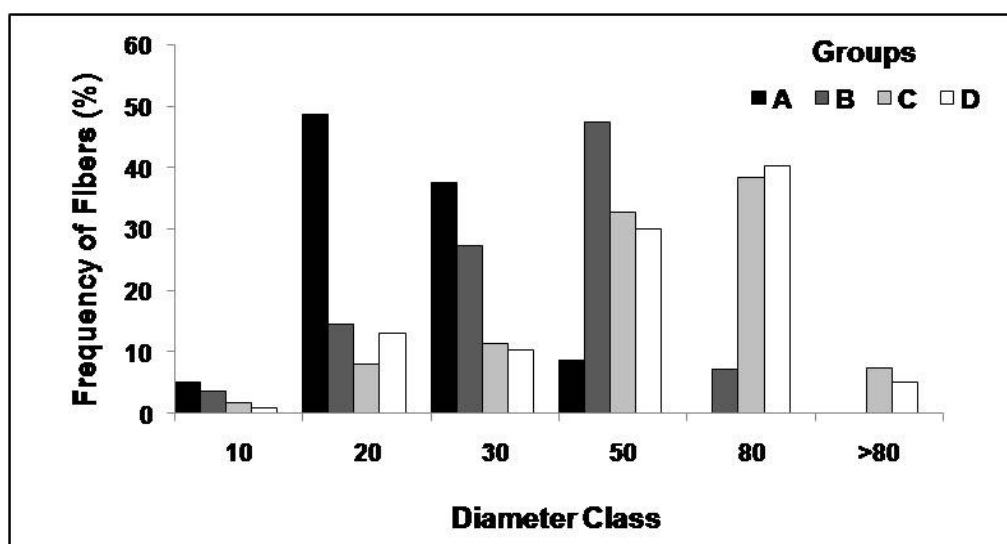


Figure 4: Frequency distribution of lateral white muscle fibers in pirarucu (*A. gigas*), according to their diameter classes. Group A: 50 g weight, Group B: 420 g weight, Group C: 5,5 Kg weight, Group D: 9,1 Kg weight.

Expression of muscle growth-related genes

Statistical analysis showed no variation of 18S rRNA gene expression among groups, indicating that it was a stable reference gene used in the present experiment (data not shown).

MyoD, myogenin and myostatin transcripts levels were evaluated by quantitative PCR (RT-qPCR) procedures. Data were normalized by the 18S rRNA transcript levels and the sample with the highest Ct value (i.e., the one with the lowest gene expression) was chosen as the calibrator sample. Since dorsal and deep lateral white muscles had similar gene expression results, we referred to them as white muscle. Figure 5 illustrates the relative quantification of myoD, myogenin and myostatin transcripts in white muscle of pirarucu.

Amplification of myoD and myogenin mRNA showed no statistical difference among groups (p values 0.5319 and 0.4686, respectively). In contrast, myostatin estimated levels exhibited significant variation. Group A showed the lowest myostatin mRNA expression compared to groups B, C and D (p value 0.0047); moreover, groups B, C and D had the highest myostatin mRNA levels which were statistically similar among them.

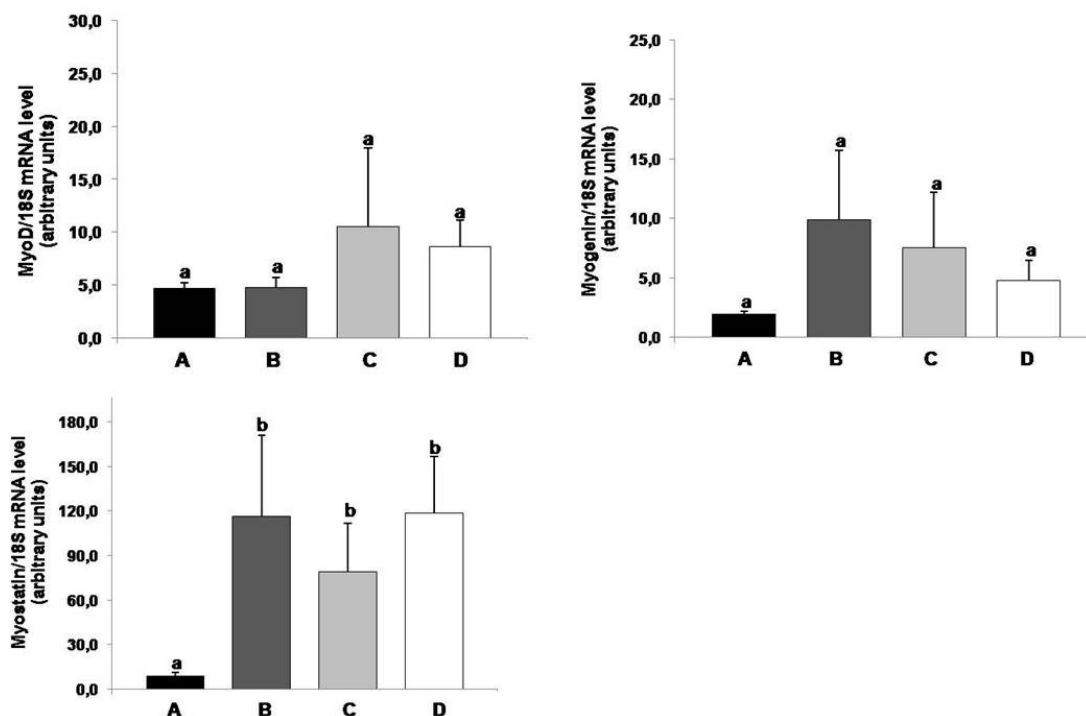


Figure 5: Expression of MyoD, myogenin and myostatin genes in white skeletal muscle of pirarucu (*A. gigas*) in the growth stages analyzed. Data are expressed as Mean $\pm$ SEM. For the myostatin graph: *same letters*, no statistical difference; *different letters*, statistical difference. Significance level 5%.

Protein Expression Analysis

MyoD, myogenin and myostatin protein expression levels were evaluated by Western Blot technique. Data were normalized by β -actin expression results. Figure 6 illustrates the muscle growth-related proteins content in white muscle of pirarucu.

Similarly with gene expression results, both MyoD and Myogenin expression did not vary among groups (p values 0.999 and 0.392, respectively). In contrast, Myostatin protein content exhibited significant variation. Group A showed the highest levels compared to groups B, C and D (p value 0.038); moreover, groups B, C and D had the lowest Myostatin protein levels which were statistically similar among them.

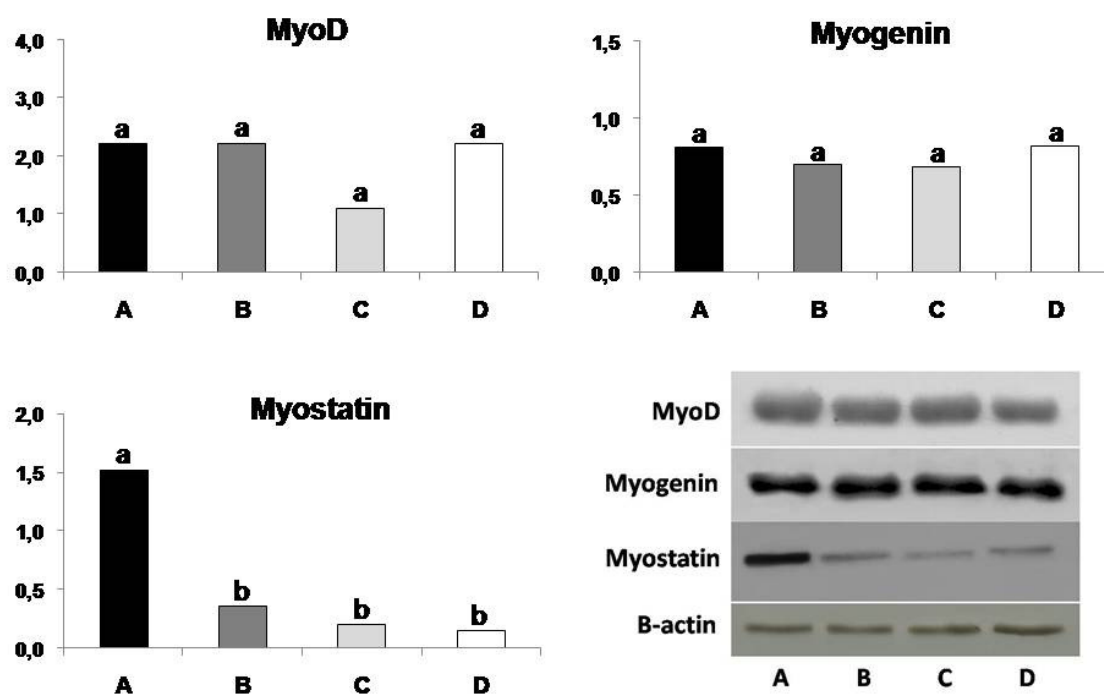


Figure 6: Western blot analysis in white skeletal muscle of pirarucu (*A. gigas*) in the growth stages analyzed. Levels of MyoD, Myogenin and Myostatin protein are expressed as arbitrary units, normalized to the β -actin levels used as loading control. In graphs: *same letters*, no statistical difference; *different letters*, statistical difference ($p < 0.05$). Figure shows protein bands identified by chemiluminescent detection.

DISCUSSION

This study is the first that describes the mechanisms that regulate skeletal muscle growth in pirarucu, one of the largest freshwater fish in the world and with important role in fishing economy of the Amazon region. As part of a program to better understand how the muscle growth control occurs in this species, we evaluated hyperplasic and hypertrophic muscle growth mechanisms and how the main factors involved in muscle growth control are expressed in different growth stages.

Morphological Analysis

In all groups studied, red and white muscle fibers showed a similar morphological pattern being polygonal or round, with several nuclei located in periphery; connective tissue of the extracellular matrix was distributed in the endomysium, surrounding each muscle fiber, and in the perimysium, that grouped muscle fibers in fascicles. These characteristics were quite similar to that found in other fish species (Alexander, 1969; Grizzle and Rogers, 1979, Hoyle *et al.*, 1986; Dal Pai-Silva *et al.*, 1995; Dal Pai *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2000; Aguiar *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2008). However, in white muscle of dorsal region, the connective tissue of perimysium was thicker and distributed in concentric layers involving muscle fibers. The connective tissue of skeletal muscle has a dynamic role during muscle differentiation and growth, serving as a supportive structure to skeletal muscle and tendon (Mayne and Sanderson, 1985). In most fish, the connective tissue distribution among muscle fibers is characteristic to each species and depends mainly on its swimming behavior (Sato *et al.*, 1986; Ando *et al.*, 1992; Ofstad *et al.*, 1996). In *A. gigas*, the thicker and concentric organization of the connective tissue found in white dorsal muscle could provide a support structure for whole body maintenance, allowing transmission of contraction force from muscle fibers to axial skeleton and caudal fin. These integrated and simultaneous events generate the body wave motion and a propulsion movement, extremely important during swimming behavior of large-size fishes (Chiquet *et al.*, 1996; Sanger and Stoiber, 2001), as pirarucu.

Based on histochemical NADH-TR reaction, three main muscle fiber types were identified in skeletal muscle of pirarucu, according to stain intensities pattern. Dorsal and deep lateral muscles were composed of white fibers, weakly stained to NADH-TR reaction, which highlights their glycolytic metabolism; on the other hand, superficial muscle exhibited red fibers, with intense reaction to NADH-TR enzyme, suggesting their high oxidative metabolic activity. Somewhat less abundant fibers were identified with moderate staining intensity, constituting the intermediate layer (not shown).

In most fish, red, intermediate and white muscle fibers occupy distinct regions. White muscle fibers have a glycolytic and fast-twitch characteristic and develop 3-5 times higher power outputs than superficial red muscle fibers at higher tail-beat frequencies (Altringham and Johnston, 1990; Rescan, 2005; Johnston, 2006), reflecting their role in providing the strength required for escape responses and predation behaviour. Pirarucu is a carnivorous fish that has a well-developed white muscle; this feature could be responsible for improve the sudden swimming movement performed during prey capture action as an explosive motion. In contrast, superficial red muscle, constituted by aerobic slow-twitch fibers with intense reaction to NADH-TR, are much recruited during movements that need sustained and prolonged activities (Rome *et al.*, 1984; Rescan, 2005; Jonhston, 2006). In pirarucu, a thick red muscle layer located in the lateral line region which could be co-related to the sustained activity required during their swimming movements as well as during their air-breathing behavior, typical of this species; during this activity, the fish often rises to water surface to take in oxygen and keeps his body in support through the slow and continuous movements of fins and whole body (Sawaya, 1946; Fontenele, 1948). Intermediate fibers showed an oxidative and glycolytic metabolism, as by moderate stain to NADH-TR reaction, showing their intermediate characteristics between red and white muscle fibres.

Morphometric Analysis

In all groups studied white muscle fibers morphometry analysis showed many small-diameter fibers surrounding larger fibers. This is commonly observed in most fish species during muscle growth and characterizes the occurrence of hypertrophy and

hyperplasia (Veggetti *et al.*, 1993; Johnston, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001; Almeida *et al.*, 2008). In most fish species, these mechanisms occurs throughout all the fish's lifetime and they had been well documented in a variety of species, mainly in those with high potential for intense aquaculture programs (Johnston *et al.*, 2000; Rowlerson and Veggetti, 2001; Almeida *et al.*, 2008).

In our work, we observed that pirarucu from group A had the majority of fibers in classes 20 and 30; this indicates the presence of many immature fibers, and demonstrates that hyperplasia is the main muscle growth mechanism acting at this stage. In this process, satellite cells proliferate and aggregate themselves to fiber surface, generating new myotubes, which separate from supportive fiber giving rise to new muscle fibers (Johnston *et al.*, 2000; Dal Pai-Silva *et al.*, 2003a).

Group B exhibited most fibers in classes 30 and 50, which indicates the presence of few small fibers together with many larger fibers, i.e., mature fibers that underwent the hypertrophy process. During this process, satellite cells fuse themselves to pre-existing fibers increasing protein synthesis and the whole fiber size (Valente *et al.*, 1999; Rowlerson and Veggetti, 2001). Groups C and D showed fibers predominating in classes 50 and 80. This pattern allows us to conclude that hypertrophy is the main mechanism of muscle growth which predominates in both pirarucu growth stages, although hyperplasia is still occurring.

It is well-documented that in large-size fishes hyperplasia predominates in early developmental stages and persists for a prolonged period during growth (Weatherley *et al.*, 1988; Kiessling *et al.*, 1991; Valente *et al.*, 1999; Dal Pai *et al.*, 2000; Rowlerson and Veggetti, 2001). This mechanism seems to have a significant contribution in pirarucu muscle growth during the early growth stages analyzed (groups A and B). In addition, hypertrophy is shown to be the main post-natal muscle growth mechanism during juvenile and adult phases (Rowlerson *et al.*, 1995; Zimmerman and Lowery, 1999), and this process can be responsible for the marked increase in muscle mass observed in pirarucu from groups C and D and could explain the fast growth rate that occurs in this species that reaches up to 10 kilograms in one year (Bard and Imbiriba, 1986; Souza and Val, 1991; Imbiriba *et al.* 1996).

Gene and Protein Expression Analysis

In all groups studied, gene and protein expression of myoD and myogenin mRNA in white skeletal muscle did not show significant difference.

In our work, and also in a previously study (Carani *et al.*, 2008), we showed that pirarucu has a large proportion of immature fibers, recently formed in white muscle during the initial growth phases (see *Morphometric Analysis* in Results section); this fact shows that muscle fiber hyperplasia predominates in this stage. This is consistent with many studies (Alami-Durante *et al.*, 1997; Valente *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 2000; Rowleron and Veggetti, 2001; Assis *et al.*, 2004), and is probably due to the high requirement of fibers for muscle compartment thickening, a process that occurs in a fast way, since pirarucu is shown to reach large sizes in a short time (Bard and Imbiriba, 1986; Souza and Val, 1991; Imbiriba *et al.* 1996).

It is well known that hyperplasia is mainly regulated by the Myogenic Regulatory Factor MyoD, which is responsible for stimulating myoblast proliferation and posterior myotube formation (Goulding *et al.*, 1994; Williams and Ordahl, 1994; Rescan, 2001). In this study we found no difference in myoD gene and protein expression among distinct growth stages. There are many studies that compare myoD gene expression in fish muscle; however these works have no similarity among their results, depending on fish muscle growth dynamics, on fish physiology and also on fish lifestyle (Weinberg *et al.*, 1996; Delalande and Rescan, 1999; Tan and Du, 2002; Zhang *et al.*, 2006). In this work, all groups were composed by specimens with intense growth rate, since a lot of fibers appeared as new-formed fibers; this state allows us to deduce that muscle growth rate in pirarucu is very different from that in other fish species. Moreover, we suppose that pirarucu specimens used in this work could be compared in the same way to the initial stages of the most fish species, because of their muscle growth rate characteristics that contribute to the large size reached in short periods (Imbiriba *et al.* 1996; Carvalho and Nascimento, 1992; Imbiriba, 2001). No difference among these stages was found in both myoD gene and protein expression, especially because pirarucu muscle growth control performed by this MRF is still occurring in a similar way in these stages. Since pirarucu can achieve a large

size in adult stage, it is of primary interest to form lots of fibers during early developmental stages.

Myogenin is characterized by regulating the late stages of muscle fiber formation and growth, which culminates to myoblast fusion, myotube formation, and finally, adult muscle fiber differentiation (Megeney and Rudnicki, 1995; Decary *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1997; Schmalbruch and Lewis, 2000).

In our study, both myogenin gene and protein expression pattern showed no difference among studied groups. This could be related to the intense process of muscle fiber differentiation occurring during all growth stages studied. These fibers, primarily like undifferentiated myoblasts which are first stimulated to proliferate by MyoD expression, have to fuse and form multinucleated myotubes that differentiate themselves into muscle fibers; these posterior processes are mainly regulated by myogenin (Megeney and Rudnicki, 1995; Watabe, 2001; Johansen and Overturf, 2005). Therefore, we can attribute the similar myogenin expression levels found in pirarucu skeletal muscle to the intense muscle fiber formation and differentiation rates that occur at a highly activated state, regardless of growth stage, as demonstrated by quantification of myogenin transcript and protein, corroborating the morphometric results.

Johansen and Overturf (2005) showed differential myoD and myogenin expression in rainbow trout skeletal muscle at different growth phases, including adults. Thus, considering that pirarucu specimens used in this work share similar characteristics of growth control by MRFs, it is possible that older animals probably could exhibit some difference in this expression pattern. We emphasize that all groups studied have an intense muscle growth rate, typically found during the earlier stages of other fish species (Xu *et al.* 2003; Assis *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2008).

Among factors that also control skeletal muscle growth, one of the most important is myostatin. In our work, we showed that myostatin estimated levels exhibited a wide variation comparing group A with the others. For the mRNA estimated levels, myostatin expression was low in group A and high in groups B, C and D. However, Myostatin protein expression was high in group A and had low values in groups B, C and D.

Although there are few studies on the functions of Myostatin in fish, it is known to negatively regulate myoblast proliferation and differentiation (Thomas *et al.*, 2000; Langley

et al., 2002). Numerous studies have investigated the effect of myostatin signalling on muscle cells. In vitro studies on cultured myogenic cell lines or primary myoblasts have shown that myostatin inhibits myoblast proliferation and activates cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which forces withdrawal from the cell cycle. In parallel, activation of myostatin signalling is associated with intense inhibition of myogenic differentiation (Thomas *et al.* 2000; Taylor *et al.*, 2001; Langley *et al.* 2002; Rios *et al.*, 2002; Joulia *et al.*, 2003). Based on these results and the observation that satellite cells express myostatin and actually are quiescent myoblasts (McCroskery *et al.*, 2003), it has been suggested that the normal function of myostatin in postnatal muscle is to keep satellite cells in a quiescent and undifferentiated state (Manceau *et al.*, 2008).

In this work, groups B, C and D had the higher myostatin mRNA levels, indicating an intense rate of gene transcription. This state could have been stimulated by the low content of myostatin protein found in these three groups, demonstrated by the protein analysis. We could infer that myostatin transcription was stimulated in B, C and D stages, but the most mRNA content was immediately translated into Myostatin protein. The balance between transcript and protein ratio control was probably due to a negative feedback cell mechanism or due a post-transcriptional regulation that prevents Myostatin protein formation.

The low levels of Myostatin protein found in groups B, C and D is an indicative that satellite cells of pirarucu are activated in these stages. This could be related to the intense muscle fiber formation that is occurring at these stages (see Figure 4). As Myostatin stops muscle growth, when it appears in a low level, muscle fiber formation and differentiation are totally activated. During the posterior growth stages of pirarucu, myostatin exhibited low levels, indicating that muscle growth rate has increased. Similarly to Myostatin results, MyoD and Myogenin expression in pirarucu were coherent with high proliferation and differentiation rates in groups B, C and D, confirming the intense muscle growth dynamic in these groups.

During the initial growth stage (group A), pirarucu had the lowest level of myostatin mRNA, which means that the most myostatin transcripts produced were translated into protein, as demonstrated by Western Blot analysis. In this early growth stage, the high levels of Myostatin protein found could be related to many processes control; Myostatin is

not restricted to skeletal muscle in fish and also is expressed in other tissues (Maccatrozzo *et al.*, 2001a,b; Østbye *et al.*, 2001; Rescan *et al.*, 2001a; Roberts and Goetz, 2001; Kocabas *et al.*, 2002; Radaelli *et al.*, 2003). Based on our results, the increased values for Myostatin protein in group A lead us to infer that, at this stage, muscle growth control by Myostatin has not yet started and is still in activation process, since satellite cells were not yet blocked, as demonstrated by morphometric and expression analysis.

In fish, the most researches attempt to describe the myostatin gene structure and/or simply determine its differential expression among distinct tissues (Maccatrozzo *et al.*, 2001a,b; Rescan *et al.*, 2001a; Rodgers *et al.*, 2001; Radaelli *et al.*, 2003; Amali *et al.*, 2004). There are few studies that show the myostatin levels during fish growth phases. Xu *et al.* (2003) showed in larval stage of zebrafish (*Danio rerio*), where hyperplasia is accentuated, a low level of myostatin; in juvenile and adult phases, where muscle hyperplastic growth is less intense, myostatin expression was higher. These results are in discordance with ours, since we have demonstrated intense muscle fiber recruitment during all stages studied, although hypertrophy is also occurring. Actually, the effects of myostatin on muscle growth in fish are not well understood as in mammals. These inconsistent data lead us to think about the biological function of myostatin in fish skeletal muscle growth dynamics. Also, it is possible that myostatin action in fish is not limited to muscle growth suppression, actuating also in multiple tissues, a process not yet described (Roberts and Goetz, 2001).

CONCLUSIONS

Altogether, our data suggest that MyoD, Myogenin, and Myostatin act to modulate the balance between proliferation and differentiation of satellite cell during hyperplastic and hypertrophic muscle growth in pirarucu. Moreover, muscle morphology and metabolism might be evolved to ensure that some features, like body maintenance and locomotion, be a mechanism that could best adapt them to their ecological environment.

Some variations observed in this work were not predictable, primarily due to its unprecedented nature. It is important to attempt that the present results can be used as reference to other studies involving muscle growth in this species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Liberdade fish-farming (Uirapuru, GO, Brazil), specially Mr. Gilberto Rabelo de Resende, for providing pirarucu specimens. This work was supported by grants from FAPESP Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Process N° 2007/59584-0 and 2007/58896-9) and CNPq Foundation (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Process N° 304070/2009-2 and 474084/2009-4).

REFERENCES

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., Gonzalez, O. and Estrada, M.P.** (2005). Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of Biotechnology*. **119**, 324-331.
- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L. E. and Dal Pai-Silva, M.** (2005). Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of Fish Biology*. **67**, 1-12.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A.M. and Bergot, P.** (1997). Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth rate. *Journal of Fish Biology*. **50**, 1285-1302.
- Alexander, R.** (1969). The orientation of muscle in the myomers of fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. **49**, 263-290.
- Alfei, L., Onali, A., Spano, L., Columbari, P.T., Altavista, P.L. and De Vita, R.** (1994). PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). *European Journal of Histochemistry*. **38**, 151-162.

Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal D., Padovani, C.R., Martins, C. and 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. and Johnston, I.A. (1990). Modelling muscle power output in a swimming fish. *Journal of Experimental Biology*. **148**, 395-402.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **215**, 403-410.

Amali, A.A., Lin, C.J., Chen, Y.H., Wang, W.L., Gong, H.Y., Lee, C.Y., Ko, Y.L., Lu, J.K., Her, G.M., Chen, T.T., et al. (2004). Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Developmental Dynamics*. **229**, 847-856.

Ando, M., Toyohara, H. and Sakaguchi, M. (1992). Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by desintegration of collagen fibers in the pericellular connective tissue. *Bull Jpn. Soc. Sci. Fish.* **58**, 567-570.

Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A. and 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. and Steven, A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. New York: Churchill Livingstone, 704p.

Bard, J. and Imbiriba, E.P. (1986). Piscicultura do pirarucu (*Arapaima gigas*). EMBRAPA-CPATU. *Circular Técnica*. **52**, 17p.

Carani, F.R., Aguiar, D.H., Almeida, F.L.A., Gonçalves, H.S., Padovani, C.R. and Dal-Pai Silva, M. (2008). Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*. **30**, 205-211.

Carvalho, L.O.D.M. and Nascimento, C.N.B. (1992). Fattening pirarucu (*Arapaima gigas*) in association with buffalo and pigs. Belém, EMBRAPA-CPATU, 21p. (Circular técnica, 65).

Chiquet, M., Matthisson, M., Koch, M., Tannheimer, M. and Chiquet-Ehrismann, R. (1996). Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem. Cell Biol.* **74**, 737-744.

Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregorio, E.A. and Curi, P.R. (2000). Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anatomia Histologia Embryologia*. **29**, 283-289.

Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D. L. and Rodrigues, A.C. (1995). Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* Boch, 1795. *Annals of Anatomy*. **177**, 65-70.

Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R.F., Pellizzon, C. H. and Dal Pai, V. (2003a). Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell*. **35**, 179-187.

Decary, S., Mouly, V., Hamida, C.B., Sautet, A., Barbet, J.P. and Butler-Browne, G.S. (1997). Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Human Gene Therapy*. **8**, 1429-1438.

Delalande, J.M. and Rescan, P.Y. (1999). Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Development Genes And Evolution*. **209**, 432-437.

Fernandez, D.A., Calvo, J., Franklin, C. E. and Johnston, I.A. (2000). Muscle fibre types and size distribution in sub-antarctic notothenoid fishes. *Journal of Fish Biology*. **56**, 1295-1311.

Fontenele, O. (1948). Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Revista Brasileira de Biologia*. **8(4)**, 445-459.

Goodman, L.A. (1964). Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics*. **35(2)**, 716-725.

Goodman, L.A. (1965). On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*. **7(2)**, 247-254.

Goulding, M., Lumsden, A. and Paquette, A.J., (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development*. **120**, 957-971.

Graham, J.B. (1997). Air-Breathing Fishes; Evolution, Diversity and Adaptation, San Diego: Academic Press.

Grizzle, J.M. and Rogers, W.A. (1979). Anatomy and histology of the channel cat fish. University Agricultural Experiment Station, Opelika, 94p.

Grobet, L., Royo Martin, L.J. and Poncelet, D.A. (1997). Deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics*. **17**, 71-74.

Hawke, T.J. and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* **91**, 534-551.

Hoyle, J., Gill, H.S. and Weatherley, A.H. (1986). Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esoxamericanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellunge, *E. masquinongy* (Mitchill). *J. Fish Biol.* **28**, 393-401.

Imbiriba, E.P., Lourenço Júnior, J.B., Moura Carvalho, L.O.D., Goes, L.B., Uliana, D., Brito Filho, L. (1996). *Criação de Pirarucu*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental. Brasília: EMBRAPA-SPI, (Coleção Criar, 2). 93p.

Imbiriba, E.P. (2001) Creation potential pirarucu, *Arapaima gigas*, in captivity. *Acta Amazônica*. **31**, 299-316.

Johansen, K.A. and Overturf, K. (2005). Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*. **7**, 576-587.

Johnston, I.A. (1999). Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*. **177**, 99-115.

Johnston, I.A. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*. **209**, 2249-2264.

Johnston, I. A., Davison, W. and Goldspink, G. (1977). Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.* **114**, 203–216.

Johnston, I.A., Alderson, R., Sandham, C., Dingwall, A., Mitchell, D., Selkirk, C., Nickell, D., Baker, R., Robertson, B., Whyte, D., et al. (2000). Muscle fibre density in

relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. **189**, 335-349.

Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B. and Cabello, G. (2003). Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research*. **286**, 263-275.

Kiessling, A., Storebakken, T. and 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.

Kocabas, A.M., Kucuktas, H., Dunham, R.A. and Liu, Z. (2002). Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochimica et Biophysica Acta*. **1575**, 99-107.

Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S. and Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 49831-49840.

Lee, C-Y., Lu, J-K. and Wu, J-L. (2009). Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **387**, 766-771.

Lee, S.J. and McPherron, A.C. (1999). Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **9**, 604–607.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. **25**, 402-408.

Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F. and Patarnello, T. (2001a). Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Marine Biotechnology*. **3**, 224-230.

Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G. and Patarnello, T. (2001b). A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Letters*. **509**, 36-40.

Manceau, M., Gros, J., Savage, K., Thomé, V., McPherron, A., Paterson, B. and Marcelle, C. (2008). Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes & Development*. **22**, 668-681.

Mayne, R. and Sanderson, R.D. (1985). The extracellular matrix of muscle. *Coll Rel Res*. **5**, 449-468.

McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M. and Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Journal of Cell Biology*. **162**, 1135-1147.

McPherron, A.C., Lawler, A.M. and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. **387**, 83-90.

Medeiros, E.F., Phelps, M.P., Fuentes, F.D. and Bradley, T.M. (2009). Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. **297**, R235-R242.

Medhurst, A.D., Harrison, D.C., Read, S.J., Campbell, C. A., Robbins, M. J. and Pangalos, M.N. (2000). The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J. Neurosci. Methods*. **98**, 9-20.

Megeney, L.A. and Rudnicki, M.A. (1995). Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochemistry and Cell Biology*. **73**, 723-732.

Ofstad, R., Egelanddal, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R.L. and Hermansson, A.M. (1996). Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: Cod (*Gadusmorhua* L) and salmon (*Salmo salar*). *Journal of The Science of Food and Agriculture*. **71(3)**, 301-312.

Østbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T. and Andersen, O. (2001). The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European Journal of Biochemistry*. **268**, 5249-5257.

Radaelli, G., Rowlerson, A., Mascarello, F., Patruno, M. and Funkenstein, B. (2003). Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell Tissue Res*. **311**, 239-250.

Rebhan, Y. and Funkenstein, B. (2008). Inhibition of fish myostatin activity by recombinant fish follistatin and myostatin prodomain: Potential implications for enhancing muscle growth in farmed fish. *Aquaculture*. **284**, 231-238.

Rescan, P.Y. (2001). Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **130**, 1-12.

Rescan, P.Y. (2005). Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *General and Comparative Endocrinology*. **142**, 111-116.

Rescan, P.Y., Jutel, I. and Ralliere, C. (2001a). Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*. **204**, 3523-3529.

Rios, R., Carneiro, I., Arce, V.M. and Devesa, J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. **282**, C993-C999.

Roberts, S.B. and Goetz, F.W. (2001). Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple isoforms. *FEBS Letters*. **491**, 212-216.

Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V. and 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., Loughna, P.T. and Goldspink, G. (1984). Muscle fibre activity in carp as a function of swim speed and muscle temperature. *American Journal of Physiology*. **247**, R272-R278.

Rowlerson, A. and Veggetti, A. (2001). Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. In *Muscle development and growth. Fish Physiology 18* (ed. I. A. Johnston), pp. 103-140. San Diego: Academic Press.

Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G. and 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 Motility*. **16**, 223-236.

Salvo-Souza, R. and Val, A.L. (1990). O gigante das águas amazônicas. *Ciência Hoje*. **11**, 9-12.

Sänger, A.M. and Stoiber, W. (2001). Muscle fiber diversity and plasticity. In *Muscle development and growth* (ed. I.A. Johnston), pp. 187-250. San Diego: Academic Press.

Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M. and Shimizu, Y. (1986). Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bulletin of The Japanese Society of Scientific Fisheries*. **52**, 1595-1600.

Sawaya P. (1946). Sobre a biologia de algumas espécies de peixes de respiração aérea (*Lepidosiren paradoxa*, Fitz. e *Arapaima gigas* Cuv. Bol. Facul. Filosof. Cien Let. Universidade de São Paulo, Zoologia. **11**, 255-286.

Schmalbruch, H. and Lewis, D.M. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle and Nerve*. **23**, 617-626.

Souza, R.H.S. and Val, A.L. (1991). O gigante das águas doces. *Ciência Hoje*. **11**, 129-133.

Stamler, J.S. and Meissner, G. (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **81**, 209-237.

Tan, X. and Du, S.J. (2002). Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Development Genes And Evolution*. **212**, 207-217.

Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard Jr, D.H., Kull Jr, F.C. and Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. **280**, E221-E228.

Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. and Kambadur, R. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* **275(51)**, 40235-40243.

Tom, M., Chen, N., Segev, M., Herut, B. and Rinkevich, B. (2004). Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an environmental biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*. **48**, 705-710.

Valente, L.M.P., Rocha, E., Gomes, E.F.S., Silva, M.W., Oliveira, M.H., Monteiro, R.A. F. and Fauconneau, B. (1999). Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. **55**, 675-691.

Veggetti, A., Mascarello, F. and Scapolo, P.A. (1990). Hiperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural and morphometric study. *Anatomy and Embriology*. **182**, 1-10.

Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A. and Candia, C.M.D. (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. *Anatomy and Embryology*. **187**, 353-361.

Watabe, S. (2001). Myogenic regulatory factors. In *Muscle development and Growth. Fish Physiology 18* (ed. I.A. Johnston), pp. 19-41. San Diego: Academic Press.

Weatherley, A.H. and Gill, H.S. (1987). The biology of fish growth. London: Academic Press.

Weatherley, A.H., Gill, H. S. and 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. and Riggleman, B. (1996). Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spade tail embryos. *Development*. **22**, 271-280.

Williams, B.A. and Ordahl, C.P. (1994). Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development*. **120**, 785-796.

Xu, C., Wu, G., Zohar, Y. and Du, S.J. (2003). Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *Journal of Experimental Biology*. **206**, 4067-4079.

Zhang, G., Swank, D.M. and Rome, L.C. (1996). Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *Journal of Morphology*. **229**, 71-81.

Zhang, Y., Tan, X., Zhang, P. and Xu, Y. (2006). Characterization of Muscle-Regulatory Gene, MyoD, from Flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Analysis of Its Expression Patterns During Embryogenesis. *Marine Biotechnology*. **8**, 139-148.

Zimmerman, A.M. and Lowery, M.S. (1999). Hyperplastic Development and Hypertrophic Growth of Muscle Fibers in the White Sea bass (*Atractoscion nobilis*). *Journal of Experimental Zoology*. **284**, 299–308.

7. CONCLUSÕES

A análise morfológica da musculatura esquelética do pirarucu mostrou uma organização característica, com fibras envoltas por tecido conjuntivo espesso e organizado em camadas concêntricas, o que favorece a sustentação do corpo e a transmissão da força de contração para o eixo axial. Nas fases iniciais de desenvolvimento, o pirarucu possui crescimento muscular hiperplásico predominante; nas fases posteriores, a hipertrofia predomina, embora ainda ocorra formação de novas fibras. A expressão gênica da MyoD e da Miogenina foi semelhante nos diferentes tipos de músculo estudados, indicando a importância desses fatores regulando os processos de crescimento muscular, independente do tipo de fibra.

Para MyoD e Miogenina, a expressão do gene e da proteína foram similares nos diferentes estágios de crescimento do pirarucu, o que reforça o papel desses fatores no controle do crescimento muscular nessa espécie, processo que ocorre de forma intensa durante todas as fases estudadas. Para a Miostatina, a expressão do gene e da proteína mostrou diferenças quando comparamos o grupo inicial (A) com os demais. O gene da Miostatina é menos expresso nos animais menores, porém o contrário é válido para a proteína. Nos animais maiores temos alta expressão gênica e baixa expressão da proteína. Isso mostra que, nos animais muito jovens, embora a proteína esteja presente, o controle da Miostatina não é expressivo, uma vez que a taxa de crescimento muscular é alta neste período. Além disso, podemos concluir que a atuação da Miostatina controlando negativamente o crescimento muscular ocorre somente em fases posteriores às analisadas no presente trabalho, uma vez que altas taxas de formação de fibras e baixíssimos níveis da proteína Miostatina foram encontrados nos animais maiores.

Finalmente, esses resultados poderão servir como base para outros trabalhos que envolvam o estudo do crescimento muscular nesta espécie e poderão auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de criação que beneficiem o aumento da produção e a manutenção da espécie.

8. ANEXO I: aprovação do Projeto de Doutorado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa), Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP.

DECLARAÇÃO	
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE FATORES REGULADORES MIOGÊNICOS E DA MIOSTATINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DO PIRARUCU (<i>Arapaima gigas</i>) DURANTE O CRESCIMENTO":	
☐ não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.	
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):	
☐	CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____
☒	CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 72/07, Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Botucatu, SP.
☐	CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____
* Caso a Comissão seja externa ao IB/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 Regina Carani Aluna: Fernanda Regina Carani	
Maeli Dal Pai Silva Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva	
Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:	
☒	Deferido ☐ Indeferido
Carimbo e assinatura	
Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:	
☐	Deferido ☐ Indeferido
Carimbo e assinatura	
Ana Maria Aparecida Guaraldo Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP	



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **72/07-CEEA**, sobre "*Expressão gênica e protéica de fatores reguladores miogênicos e da miostatina no músculo esquelético do pirarucu (Arapaima gigas Cuvier 1817) 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 pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de 14/12/2007.

Botucatu, 14 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

Acosta J, Carpio Y, Borroto I, Gonzalez O and Estrada MP (2005) Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of Biotechnology* 119, 324-331.

Adams GR and Mccue SA (1998) Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. *J. Appl. Physiol.* 84, 1716-1722.

Aguilar DH, Barros MM, Padovani CR, Pezzato LE and Dal Pai-Silva M (2005) Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of Fish Biology* 67, 1-12.

Aigner S, Gohlsch B, Hamalainen N, Staron RS, Uber A, Wehrle U and Pette D (1993) Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IId, not IIb predominates. *Eur. J. Biochem.*, 211(1-2), 367-372.

Alami-Durante H, Fauconneau B, Rouel M, Escaffre AM and Bergot P (1997) Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth rate. *Journal of Fish Biology* 50, 1285-1302.

Alcántara FB and Guerra HF (1992) Cultivo de paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlassoma bimaculatum*, como presa. *Folia Amazônica* 4, 129-139.

Alexander R (1969) The orientation of muscle in the myomers of fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49, 263-290.

Alfei L, Onali A, Spano L, Columbari PT, Altavista PL and De Vita R (1994) PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). *European Journal of Histochemistry* 38, 151-162.

Allen RE and Boxhorn LK (1989) Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J. Cell Physiol.*, 138, 311-315.

Almeida FLA, Carvalho RF, Pinhal D, Padovani CR, Martins C and 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 JD and Johnston IA (1990) Modelling muscle power output in a swimming fish. *Journal of Experimental Biology* 148, 395-402.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Amali AA, Lin CJ, Chen YH, Wang WL, Gong HY, Lee CY, Ko YL, Lu JK, Her GM, Chen TT *et al.* (2004) Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Developmental Dynamics* 229, 847-856.

Ando M, Toyohara H and Sakaguchi M (1992) Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by desintegration of collagen fibers in the pericellular connective tissue. *Bull Jpn. Soc. Sci. Fish* 58, 567-570.

Arantes CC (2009) Ecologia do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) na várzea da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus, Bahia. 85p.

Ashby PR, Pincon-Raymond M and Harris AJ (1993) Regulation of myogenesis in paralysed muscles in the mouse mutants peroneal muscular atrophy and muscular dysgenesis. *Dev. Biol.* 156, 529-536.

Ashmore CR and Doerr L (1971) Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Exp. Neurol.* 31(3), 408-418.

Assis JMF, Carvalho RF, Barbosa L, Agostinho CA and Dal-Pai-Silva M (2004) Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 237, 251-267.

Bancroft JD and Steven A (1990) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, New York, 704p.

Bard J and Imbiriba EP (1986) *Piscicultura do pirarucu (Arapaima gigas)*. EMBRAPA-CPATU. Circular Técnica. 52, 17p.

Biral D, Betto R, Danieli-Betto D and Salviati G (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem. J.* 250(1), 307-308.

Blagden CS, Currie PD, Inghan PW and Hughes SM (1997) Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Gen. and Dev.* 11, 2163-2175.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brooke MH and Kaiser KK (1970) Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18(9), 670-672.

Caiozzo VJ, Baker MJ, Huang K, Chou H, Wu YZ and Baldwin KM (2003) Single-fiber myosin heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285(3), R570-R580.

Carani FR, Moreira PSA, Carvalho RF, Padovani CR, Chardulo LAL and Dal Pai-Silva M (2006) Histochemistry and growth characteristics of bovine semitendinosus muscle exposed to recombinant bovine somatotropin (rbST). *Braz. J. Morphol. Sci.* 23(1), 129-136.

Carani FR, Aguiar DH, Almeida FLA, Gonçalves HS, Padovani CR and Dal-Pai Silva M (2008) Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). *Acta Scientiarum Biological Sciences* 30, 205-211.

Carlson CJ, Booth FW and Gordon SE (1999) Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fibre-type specific and increases during hindlimb unloading. *American Journal of Physiology* 277, 601-606.

Carvalho LODM and Nascimento CNB (1992) Fattening pirarucu (*Arapaima gigas*) in association with buffalo and pigs. Belém, Circular técnica 65, EMBRAPA-CPATU, 21p.

Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú DR, Gandra ALE and Crescêncio R (2002) Capacidade de sustentação e biomassa econômica de juvenis de pirarucu criados em tanques-rede de pequeno volume no período de pré-engorda. *In: Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura*. Goiânia, GO p13.

Cavero BAS, Pereira-Filho M., Bordinhon AM, Fonseca FAL, Ituassú DR, Roubach R and Ono EA (2004) Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39, 513–516.

Chargé SB and Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84(1), 209-238.

Chiquet M, Matthisson M, Koch M, Tannheimer M and Chiquet-Ehrismann R (1996) Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem. Cell Biol.*, 74, 737-744.

Crescêncio R (2001) Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), utilizando atrativos alimentares. 2001. 26 f. Dissertação de Mestrado - Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Crescêncio R, Ituassú DR, Roubach R, Pereira-Filho M, Cavero BAS and Gandra AL (2005) Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu. *Pesq. agropec. bras.* 40(12), 1217-1222.

Currie PD and Ingham PW (2001) Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. *In*: Johnston, I.A. (Ed). *Muscle Development and Growth*. London: Academic Press, pp. 1-17.

Dal Pai V, Dal Pai-Silva M, Carvalho ED, Fujihara CY, Gregorio EA and Curi PR (2000) Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anatomia Histologia Embryologia* 29, 283-289.

Dal Pai-Silva M, Dal Pai V, Mota DL and Rodrigues AC (1995) Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* Boch, 1795. *Annals of Anatomy* 177, 65-70.

Dal Pai-Silva M, Carvalho RF, Pellizzon CH and Dal Pai V (2003a) Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell* 35, 179-187.

Dal Pai-Silva M, Freitas EMS, Dal Pai V and Rodrigues AC (2003b) Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Archive of Fishery And Marine Research* 50, 149-160.

Dal Pai-Silva M, Dal Pai V and Carvalho RF (2005) Célula Muscular Estriada Esquelética. In: Carvalho, H.F.; Collares-Buzato, C.B. (Eds.). Células: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Manole, p. 83-94.

Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP and Butler-Browne GS (1997) Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. Human Gene Therapy 8, 1429-1438.

Delalande JM and Rescan PY (1999) Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). Development Genes And Evolution 209, 432-437.

Delgado I, Fuentes E, Escobar S, Navarro C, Corbeaux T, Reyes AE, Vera MI, Alvarez M and Molina A (2008) Temporal and spatial expression pattern of the myostatin gene during larval and juvenile stages of the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). Comparative Biochemistry and Physiology B 151, 197-202.

Devoto SH, Melançon EJS and Westerfield M (1996) Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. Development 122, 3371-3380.

Di Maso NA, Caiozzo VJ and Baldwin KM (2000) Single-fiber myosin heavy chain polymorphism during postnatal development: modulation by hypothyroidism. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 278(4), R1099-R1106.

Driedzic WR and Hochachka PW (1976) Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol. 230, 579-582.

Du SJ, Devoto SH, Westerfield M and Moon RT (1997) Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and TGF- β gene families. The Journal of Cell Biology 139(1), 145–156.

Dubowitz V and Pearse AG (1960) A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Z Zellforsch Microsk. Anat. Histochem.* 2, 105-117.

Fernandez DA, Calvo J, Franklin CE and Johnston IA (2000) Muscle fibre types and size distribution in sub-antarctic notothenoid fishes. *Journal of Fish Biology* 56, 1295-1311.

Florini JR, Ewton DZ, Magri KA and Mangiacapra FJ (1993) IGFs and muscle differentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 343, 319-326.

Fontenele O (1948) Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Revista Brasileira de Biologia* 8(4), 445-459.

Funkenstein B, Balas V, Skopal T, Radaelli G and Rowlerson A (2006) Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. *Tissue and Cell* 38, 399-415.

Glass DJ (2003) Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature Cell Biology* 5, 87-90.

Goldspink G, Wilkes D and Steven E (1972) Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth and adaptation. *In: Johnston, I.A. (Ed). Muscle Development and Growth.* London: Academic Press, 318p.

Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M et al. (1998) Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV infected men with muscle wasting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 14938-14943.

Goodman LA (1964) Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics* 35(2), 716-725.

Goodman LA (1965) On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 7(2), 247-254.

Goulding M, Lumsden A and Paquette AJ (1994) Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120, 957-971.

Graham JB (1997) *Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity and Adaptation*. San Diego: Academic Press.

Greene EA and Allen RE (1991) Growth factor regulation of bovine satellite cell growth in vitro. *J. Anim. Sci.* 69, 146-152.

Greer-Walker M and Pull GA (1975) A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.* 7, 295-300.

Grizzle JM and Rogers WA (1979) *Anatomy and histology of the channel cat fish*. University Agricultural Experiment Station, Opelika, 94p.

Grobet L, Royo Martin LJ and Poncelet DA (1997) Deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics* 17, 71-74.

Harris AJ (1988) Critical periods in the development of motoneurons. *Rev. Neurol.* 144(11), 643-647.

Hawke TJ and Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* 91, 534-551.

Helterline DLI, Garikipati D, Stenkamp DL and Rodgers BD (2007) Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology* 151, 90-97.

Hilber K, Galler S, Gohlsch B and Pette D (1999) Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in single fibers from human skeletal muscle. FEBS Lett. 455(3), 267-270.

Hirayama Y and Watabe S (1997) Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle. European Journal of Biochemistry 246, 380-387.

Hoyle J, Gill HS and Weatherley AH (1986) Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellunge, *E. masquinongy* (Mitchill). Journal of Fish Biology 28, 393-401.

Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ and Peterson CA (1993) Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. Development 118(4), 1137-1147.

Huxley HE (1969) The mechanism of muscular contraction. Science 164(886), 1356-1365.

Imbiriba EP (2001) Creation potential pirarucu, *Arapaima gigas*, in captivity. Acta Amazônica 31, 299-316.

Imbiriba EP, Lourenço-Júnior JB, Moura-Carvalho LOD, Goes LB, Uliana D and Brito Filho L (1996) Criação de Pirarucu. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental. Brasília: EMBRAPA-SPI, Coleção Criar, 2, 93p.

Ituassú DR, Pereira-Filho M, Roubach R, Crescêncio R, Cavero BAS and Gandra AL (2005) Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu. Pesquisa Agropecuária Brasileira 40, 255-259.

Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FF and Spurlock ME (1998) Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and

developmental and postnatal regulation. American Journal of Physiology 275, R1265-R1273.

Johansen KA and Overturf K (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine Biotechnology 7, 576-587.

Johnston IA (1980) Specialization of fish muscle. In: Goldspink, DF (Ed). "Development and specializations of muscle. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. Symp. 7". p. 123-148, Cambridge: Cambridge University Press.

Johnston IA (1981) Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. Cell And Tissue Research 214, 369-379.

Johnston IA (1999) Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. Aquaculture 177, 99-115.

Johnston IA (2001) Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth, and adaptation. In: Muscle Development and Growth. Ed.Academic Press, pp. 43-70.

Johnston IA (2006) Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. The Journal of Experimental Biology 209, 2249-2264.

Johnston IA and Hall TE (2004) Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. Am. Fish Soc. Symposium 40, 85-116.

Johnston IA, Davison W and Goldspink G (1977) Energy metabolism of carp swimming muscles. Journal of Comparative Physiology 114, 203-216.

Johnston IA, Cole NJ, Abercromby M and Vieira VLA (1998) Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring (*Clupea harengus*). J. Exp. Biol. 201, 623-646.

Johnston IA, Alderson R, Sandham C, Dingwall A, Mitchell D, Selkirk C, Nickell D, Baker R, Robertson B, Whyte D et al. (2000) Muscle fibre density in relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture 189, 335-349.

Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B and Cabello G (2003) Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. Experimental Cell Research 286, 263-275.

Kambadur R, Sharma M, Smith TP and Bass JJ (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Research 7, 910–916.

Karasinski J (1993) Diversity of native myosin and myosin heavy chain in fish skeletal muscles. Comp. Biochem. Physiol. 106, 1041-1047.

Karasinski J and Kilarski W (1989) Polymorphism of myosin isoenzymes and myosin heavy chain in histochemically typed skeletal muscles of the roach. Comp. Biochem. Physiol. 92B, 727-731.

Kelly AM and Rubinstein NA (1994) The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. Myology (2nd ed). London: McGraw-Hill, p.119-133.

Kerr T, Roalson EH and Rodgers BD (2005) Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. Evolution Development 7, 390-400.

Kiessling A, Storebakken T and 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.

Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL and Baile CA (2001) Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 902-906.

Kimmel CB, Warga RM and Schilling TF (1990) Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* 108, 581-584.

Kjaer M (2004) Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol. Rev.* 84(2), 649-698.

Ko CF, Chiou TT, Chen TT, Wu JL, Chen JC and Lu JK (2006) Molecular cloning of myostatin gene and characterization of tissue-specific and developmental stage-specific expression of the gene in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Marine Biotechnology* 9, 20-32.

Kocabas AM, Kucuktas H, Dunham RA and Liu Z (2002) Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1575, 99-107.

Kocamis H, Kirkpatrick-Keller DC, Richter J and Killefer J (1999) The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B mRNA expression during chicken embryonic development. *Growth Development and Aging* 63, 143-150.

Kollias HD and McDermott JC (2008) Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 104(3), 579-587.

Koumans JTM and Akster HA (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110A, 3-20.

Koumans JTM, Akster HA, Witkam A and Osse JWM (1994) Number 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.

Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S and Kambadur R (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry* 277, 49831-49840.

Lee C-Y, Lu J-K and Wu J-L (2009) Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387, 766-771.

Lee S-J (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 61-86.

Lee S-J and McPherron AC (1999) Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 604–607.

Lee S-J and McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(16), 9306-9311.

Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H and Sebille A (1996) Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J. Neuroimmunol.* 70, 37-44.

Li GQ and Wilson MVH (1996) Phylogeny of Osteoglossomorpha. *In*: Stiassny ML, Parenti LR and Johnson GD (ed) Interrelations of Fishes. San Diego: Academic Press, pp. 163-174.

Livak KJ and Schmittgen TD (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 PC, Rould MA, Weintraub H and Pabo CO (1994) Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77(3), 451-459.

Maccatrozzo L, Bargelloni L, Radaelli G, Mascarello F and Patarnello T (2001a) Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Marine Biotechnology* 3, 224-230.

Maccatrozzo L, Bargelloni L, Cardazzo B, Rizzo G and Patarnello T (2001b) A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Letters* 509, 36-40.

Manceau M, Gros J, Savage K, Thomé V, McPherron A, Paterson B and Marcelle C (2008) Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes & Development* 22, 668-681.

Martinez I, Bang B, Hatlen B and Blix P (1993) Myofibrillar proteins in skeletal muscles of parr, smolt and adult atlantic salmon (*Salmo salar*) – comparison with another salmonid, the arctic charr *salvelinus-alpinus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 106, 1021-1028.

Matsakas A, Bozzo C, Cacciani N, Caliaro F, Reggiani C, Mascarello F and Patrino M (2006) Effects of swimming exercise and training on myostatin expression in red and white gastrocnemius muscle and in the heart of the rat. *Experimental Physiology* 91, 983-994.

Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 9, 493-494.

Mayne R and Sanderson RD (1985) The extracellular matrix of muscle. *Coll Rel Res.* 5, 449-468.

McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M and Kambadur R (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Journal of Cell Biology* 162, 1135-1147.

McPherron AC and Lee S-J (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12457-12461.

McPherron AC, Lawler AM and Lee S-J (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90.

Medeiros EF, Phelps MP, Fuentes FD and Bradley TM (2009) Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297, R235-R242.

Medhurst AD, Harrison DC, Read SJ, Campbell CA, Robbins MJ and Pangalos MN (2000) The use of TaqMan RT-PCR assays for semiquantitative analysis of gene expression in CNS tissues and disease models. *J. Neurosci. Methods* 98, 9-20.

Megeney LA and Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochemistry and Cell Biology* 73, 723-732.

Michelin AC, Justulin LA, Delella FK, Padovani CR, Felisbino SL and Dal-Pai-Silva M (2009) Differential MMP-2 and MMP-9 activity and collagen distribution in skeletal muscle from pacu during juvenile and adult growth phases. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 292, 387-395.

Morissette MR, Cook SA, Foo S, McKoy G, Ashida N, Novikov M, Scherrer-Crosbie M, Li L, Matsui T, Brooks G and Rosenzweig A (2006) Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ. Res.* 99, 15–24.

Moura Carvalho LOD and Nascimento CNB (1992) Engorda de pirarucus (*Arapaima gigas*) em associação com búfalos e suínos. Belém: EMBRAPA-CPATU. Circular Técnica 65, 21p.

Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H and Baltimore D (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

Musaro A, Mccullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL and Rosenthal N (2001) Localized IGF-I transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* 27, 195-200.

Narusawa M, Fitzsimons RB, Izumo S, Nadal-Ginard B and Rubinstein NA (1987) Slow myosin in developing rat skeletal muscle. *J.Cell Biol.* 104, 447-459.

Nelson JS (1994) *Fishes of the World*. 3rd edition. New York: John Wiley, 600 pp.

Nicoll CS, Rodgers BD and Kelley KM (1999) Hormonal regulation of growth and development of nonmammalian vertebrates. *In*: J.L. Kostyo, and H.M. Goodman, eds. *Handbook of Physiology. The endocrine systems: hormonal control of growth*. New York: Oxford University Press, pp. 73-98.

Noguchi S (2005) The biological function of insulin-like growth factor-I in myogenesis and its therapeutic effect on muscular dystrophy. *Acta Myol.* 24(2), 115-118.

Ochi H and Westerfield M (2007) Signaling networks that regulate muscle development: Lessons from zebrafish. *Develop. Growth Differ.* 49, p. 1-11.

Ofstad R, Egelanddal B, Kidman S, Myklebust R, Olsen RL and Hermansson AM (1996) Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: Cod (*Gadus morhua* L) and salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71(3), 301-312.

Ogata T (1958) A histochemical studies on red and white muscle fibres. Part III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibres. *Acta Med. Okayama* 12, 233-240.

Oldham JM, Martyn JAK, Sharma M, Jeanplong F, Kambadur R and Bass JJ (2001) Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1488-R1493.

Ono EA, Halverson MR and Kubitza F (2004) Pirarucu - O gigante esquecido. *Panorama Aqüic.* 14(81), 14-25.

Ontell M and Kozeka K (1984) The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. *Am. J. Anat.* 171, 133-148.

Ostbye TK, Galloway TF, Nielsen C, Gabestad I, Bardal T and Andersen O (2001) The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European Journal of Biochemistry* 268, 5249-5257.

Otto A and Patel K (2010) Signalling and the control of skeletal muscle size. *Exp. Cell Res.* 316, 3059-3066.

Patrino M, Sivieri S, Poltronieri C, Sacchetto R, Maccatrozzo L, Martinello T, Funkenstein B and 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 and Tissue Research* 331, 643–658.

Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA and Stempel KE (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11(14), 2627-2633.

Pette D and Staron RS (1997) Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.* 170, 143-223.

Pette D and Staron RS (2000) Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* 50, 500-509.

Radaelli G, Rowleron A, Mascarello F, Patruno M and Funkenstein B (2003) Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell Tissue Res.* 311, 239-250.

Ranvier L (1873) Properties et structures differentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *CR Hebd. Seances Acad. Sci.* 7, 2062-2072.

Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ and Attisano L (2003) Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* 23, 7230–7242.

Rebhan Y and Funkenstein B (2008) Inhibition of fish myostatin activity by recombinant fish follistatin and myostatin prodomain: Potential implications for enhancing muscle growth in farmed fish. *Aquaculture* 284, 231-238.

Rescan PY (2001) Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130, 1-12.

Rescan PY (2005) Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. *General and Comparative Endocrinology* 142, 111-116.

Rescan PY, Jutel I and Ralliere C (2001a) Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204, 3523-3529.

Rescan PY, Collet B, Ralliere C, Cauty C, Delalande JM, Goldspink G and Fauconneau B (2001b) Red and white muscle development in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) as shown by in situ hybridization of fast and slow myosin heavy chain transcripts. *J. Exp. Biol.* 204, 2097-2101.

Rios R, Carneiro I, Arce VM and Devesa J (2002) Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 282, C993-C999.

Roberts SB and Goetz FW (2001) Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Letters* 491, 212-216.

Rodgers BD and Garikipati DK (2008) Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocrine Reviews* 29, 513-534.

Rodgers BD, Weber GM, Sullivan CV and Levine MA (2001) Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142, 1412-1418.

Rodgers BD, Roalson EH, Weber GM, Roberts B and Goetz FW (2007) A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 292, E371-E372.

Rome LC, Loughna PT and Goldspink G (1984) Muscle fibre activity in carp as a function of swim speed and muscle temperature. *American Journal of Physiology* 247, R272-R278.

Rowlerson A and Veggetti A (2001) Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. *In: Johnston IA (ed) Muscle development and growth. Fish Physiology* 18. San Diego: Academic Press, pp 103-140.

Rowlerson A, Mascarello F, Radaelli G and 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.

Rudnicki MA and Jaenisch R (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays* 17, 203-209.

Sabourin LA and Rudnicki MA (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics* 57, 16-25.

Salvo-Souza R and Val AL (1990) O gigante das águas amazônicas. *Ciência Hoje* 11, 9-12.

Sanes JR (2003) The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 278(15), 12601-12604.

Sänger AM and Stoiber W (2001) Muscle fiber diversity and plasticity. *In: Muscle development and growth (I.A. Johnston, ed.)*, pp. 187-250. San Diego: Academic Press.

Sassoon DA (1993) Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev. Biol.* 156, 11-23.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M and Shimizu Y (1986) Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bulletin of The Japanese Society of Scientific Fisheries* 52, 1595-1600.

Sawaya P (1946) Sobre a biologia de algumas espécies de peixes de respiração aérea (*Lepidosiren paradoxa*, Fitz. e *Arapaima gigas* Cuv.). Bol. Facul. Filosof. Cien Let. 11, 255-286.

Scapolo PA, Veggetti A, Mascarello F and Romanello MG (1988) Developmental transitions of myosin isoforms and organization of the lateral muscle in the teleost *Discentrarchus labrax* (L.) Anat. Embriol. 178, 287-195.

Schiaffino S and Reggiani C (1994) Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. J. Appl. Physiol. 77(2), 493-501.

Schmalbruch H and Lewis DM (2000) Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. Muscle and Nerve 23, 617-626.

Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF and Lee SJ (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N. Engl. J. Med. 350, 2682–2688.

Schwander JC, Hauri C, Zapf J and Froesch ER (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.

Scorvo-Filho JD, Rojas NET, Silva CM And Konoike T (2004) Criação de *Arapaima gigas* (Teleostei Osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no Estado de São Paulo. B. Inst. Pesca 30(2), 161-170.

Scott W, Stevens J and Binder-Macleod SA (2001) Human skeletal muscle fiber type classifications. Phys. Ther. 81, 1810-1816.

Seale P, Ishibashi J, Holterman C and Rudnicki MA (2004) Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient myogenic cell. *Developmental Biology* 275, 287-300.

Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ and Bass JJ (1999) Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *Journal of Cellular Physiology* 180, 1-9.

Shyu KG, Ko WH, Yang WS, Wang B and Kuan P (2005) Insulin-like growth factor-1 mediates stretch-induced upregulation of myostatin expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 68, 405-414.

Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI and 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.

Souza RHS and Val AL (1991) O gigante das águas doces. *Ciência Hoje* 11, 129-133.

Stamler JS and Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 81, 209-237.

Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD and Campos GE (1999) Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem. Cell Biol.* 111(2), 117-123.

Staron RS and Pette D (1993) The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry* 100(2), 149-153.

Steinbacher P, Haslett JR, Six M, Gollmann HP, Sanger AM and Stoiber W (2006) Phases of myogenic cell activation and possible role of dermomyotome cells in teleost muscle formation. *Developmental Dynamics* 235, 3132-3143.

Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR (1993) Muscle fiber types and function. *Curr. Opin. Rheumatol.* 5(6), 695-705.

Tan X and Du SJ (2002) Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Development Genes And Evolution* 212, 207-217.

Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard Jr DH, Kull Jr FC and Gonzalez-Cadavid N (2001) Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 280, E221-E228.

Termin A, Staron RS and Pette D (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry* 92(6), 453-457.

Thisse C, Thisse B, Schilling TF and Postlethwait JH (1993) Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* 199, 1203-1215.

Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 40235-40243.

Tom M, Chen N, Segev M, Herut B and Rinkevich B (2004) Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an environmental biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 48, 705-710.

Valente LMP, Rocha E, Gomes EFS, Silva MW, Oliveira MH, Monteiro RAF and Fauconneau B (1999) Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 55, 675-691.

Van Leeuwen JL (1999) A mechanical analysis of myomere shape in fish. *The Journal of Experimental Biology* 202, 3405-3414.

Veggetti A, Mascarello F and Scapolo PA (1990) Hiperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural and morphometric study. *Anatomy and Embriology* 182, 1-10.

Veggetti A, Mascarello F, Scapolo PA, Rowleron A and Candia CMD (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. *Anatomy and Embryology* 187, 353-361.

Voytik SL, Przyborski M, Badylak SF and Konieczny SF (1993) Differential expression of muscle regulatory factor genes in normal and denervated adult rat hindlimb muscles. *Dev. Dyn.* 198(3), 214-224.

Watabe S (1999) Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55(A), 1-18.

Watabe S (2001) Myogenic regulatory factors. *In*: Johnston IA (ed) *Muscle development and Growth: Fish Physiology* 18. San Diego: Academic Press, pp. 19-41.

Watabe S, Hirayama Y, Nakaya M, Kakinuma M, Kikuchi K, Guo X-F, Kanoh S, Chaen S and Ooi T (1998) Carp expression fast skeletal myosin isoforms with altered motor functions and structural stabilities to compensate for changes in environmental temperature. *J. Therm. Biol.* 22, 375-390.

Weatherley AH and Gill HS (1985) Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia* 41, 353-354.

Weatherley AH and Gill HS (1987) *The biology of fish growth*. London: Academic Press.

Weatherley AH, Gill HS and Lobo AF (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.

Weaver FE, Stauffer KA and Coughlin DJ (2001) Myosin heavy chain expression in the red, white, and ventricular muscle of juvenile stages of rainbow trout. *J. Exp. Zool.* 290(7), 751-758.

Weinberg ES, Allende ML, Kelly CS, Abdelhamid A, Murakami T, Andermann P, Doerre OG, Grunwald DJ and Riggleman B (1996) Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development* 22, 271-280.

Williams BA and Ordahl CP (1994) Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* 120, 785-796.

Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS and Lee S-J (2003) Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(26), 15842-15846.

Xu C, Wu G, Zohar Y and Du SJ (2003) Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 206, 4067-4079.

Xue L, Qian K, Qian H, Li L, Yang Q and Li M (2006) Molecular cloning and characterization of the myostatin gene in croceine croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Molecular Biology Reports* 33, 129-135.

Zammit PS, Partridge TA and Yablonka-Reuveni Z (2006) The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54(11), 1177-1191.

Zhang G, Swank DM and Rome LC (1996) Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *Journal of Morphology* 229, 71-81.

Zhang Y, Tan X, Zhang P and Xu Y (2006) Characterization of muscle-regulatory gene, MyoD, from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis. *Marine Biotechnology* 8, 139-148.

Zimmerman AM and Lowery MS (1999) Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white sea bass (*Atractoscion nobilis*). *Journal of Experimental Zoology* 284, 299–308.

Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM and Lee S-J (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296, 1486-1488.