

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Jeane Marlene Fogaça de Assis

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE A MORFOLOGIA E O CRESCIMENTO DO TECIDO MUSCULAR NO PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

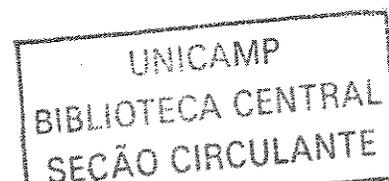
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Jeane Marlene Fogaça de Assis e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Maeli Dal Pai Silva

200311128

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva



UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
As76i
V _____ EX _____
TOMBO 53065
PROC 16-124/03
C _____ D _____ X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 09/04/03
Nº CPD _____

CM001B1047-0

BIBID. 286509

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

As76i **Assis, Jeane Marlene Fogaça de**
Influência da temperatura de incubação sobre a morfologia e o crescimento
do tecido muscular no PACU (*Piaractus mesopotamicus*) / Jeane Marlene
Fogaça de Assis. –
Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientadora: Maeli Dal Pai Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Morfologia. 2. Temperatura. 3. Tecidos. I. Silva, Maeli Dal Pai.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

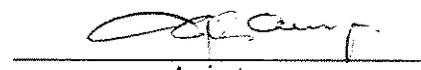
Data da Defesa: 21 de novembro de 2002

BANCA EXAMINADORA

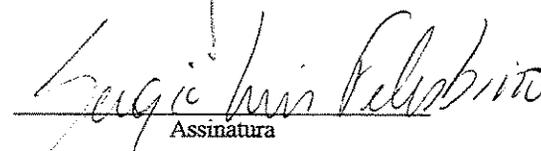
Profª. Dra. Maeli Dal Pai Silva (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Assinatura

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pela dedicação, pelo profissionalismo, pelo exemplo de vida mostrando a capacidade de ser orientadora e amiga nos momentos certos, fazendo com que as dificuldades fossem superadas com êxtase.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e pelas avaliações dos relatórios.

Ao Prof. Dr. Cláudio Ângelo Agostinho pelo empenho e interesse na elaboração e realização do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia da Unesp, Jarbas, Sueli, Cristina e aos técnicos do Departamento de Reprodução Animal em especial ao Denílson por todo esforço e boa vontade na realização desse trabalho.

Aos docentes de todas disciplinas cursadas nos programas de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp e Biologia Estrutural da Unesp, por contribuírem para minha formação acadêmico - científica.

A Deus pelo amor que tens por todos nós, por todas as portas abertas, por me guiar e tornar possível a realização dos meus projetos.

Aos meus pais, Cilíneu e Euclésia, que me deram a possibilidade de optar pelo caminho a seguir, acompanham-me em todos os momentos vibrando junto comigo a cada conquista e principalmente por todo amor dedicado desde de que existo.

Às minhas irmãs, Silvia e Renata, meus cunhados, Reinaldo e Gilmar, meus sobrinhos, Yago e João Pedro e especialmente à minha afilhada Yara, pelas alegrias, pelo carinho, pela torcida e por toda energia positiva que me passam sempre.

À todos meus familiares em especial ao tio Benedito, à tia Abadia e à madrinha Evalda pelo incentivo e pelo amor que demonstram com pequenos gestos e palavras.

Às secretárias do Programa de P's – Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Liliam Panagio, e do Departamento de Morfologia, Patricia e Luciana, pela atenção e ótimo desempenho profissional.

Ao meu querido mestre Fernando que me acompanhou nos meus primeiros passos, por todo incentivo, força e pela sua capacidade de fazer do ensino uma paixão.

Aos meus amigos, Patrizzia, Graziela, Ana Claudia, Ana Carolina, Claudia, Viviane, Zélia, Virgínia, Ana, Adelina, Iraceles, Clarissa, Angélica, Valdemir, Lu Cande, Genair, Geise, Alessandra, Silvia, Eliandra, Maristela, Sabrina, Juliana, Tatiana, Robson, Fabriciano, Thomas, Samantha, Lu e Xexeo pelas alegrias, apoio e por me sentir em casa logo que cheguei em Botucatu. Aos que me acompanham sempre, agradeço pela compreensão, por partilharem comigo muitos momentos alegres, tristes, importantes ou não e por estarem sempre ao meu lado.

À Dona Hilda, Regina, Livia e Ana Paula por me assumirem como parte dessa família que admiro muito, pela força, pela alegria e por todo carinho.

Ao meu noivo Marcelo, o companheiro, o amigo e o amor que me trouxe força, luz, alegria e paz. Por ser tão importante na minha vida, pelos seus carinhos, sua compreensão, sua generosidade, e principalmente pelo amor que existe entre nós.

Dedicatória

*Aos meus pais, Cilíneu e Euclésia, e
ao meu noivo, aos quais amo muito e devo
toda alegria dos meus melhores momentos.*

Sumário

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS.....	16
ARTIGO 1.....	18
ARTIGO 2.....	42
CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS GERAIS.....	69

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da variação da temperatura de incubação dos ovos sobre a morfologia e o crescimento do tecido muscular no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) durante as fases iniciais do desenvolvimento. Os ovos do pacu foram incubados em três temperaturas: 25°C, 27°C e 29°C. Após cinco dias da eclosão as larvas foram transferidas para caixas individuais de cimento amianto (500L) abastecidas com água corrente em temperatura ambiente (25°C a 28°C). Na eclosão e com 5, 25 e 60 dias exemplares de pacu foram sacrificados e amostras de músculo estriado esquelético foram congeladas em nitrogênio líquido, outras foram fixadas em paraformaldeído a 4% ou em glutaraldeído a 2,5% para análise morfológica, histoquímica, imunohistoquímica e morfométrica.

Na eclosão observou-se uma monocamada de células colunares superficiais adjacente ao tegumento, envolvendo várias camadas de células com aspecto arredondado. A partir de 5 dias foram observadas duas populações distintas de fibras musculares distribuídas em compartimentos. O vermelho, localizado na região superficial, com fibras de metabolismo oxidativo e contração lenta e o branco, constituindo a maior parte da musculatura, formado por fibras com metabolismo glicolítico e contração rápida. Um compartimento intermediário foi evidenciado 25 dias após a eclosão juntamente com as zonas de proliferação celular no ápice da região dorsal. No decorrer do experimento observou-se um espessamento da massa muscular. Esse foi decorrente do aparecimento de novas fibras na zona de proliferação celular e entre as fibras das musculaturas vermelha, intermediária e branca. Fato melhor observado a partir de 25 dias da eclosão, sendo mais acentuado na temperatura de incubação de 29°C. O aumento do diâmetro das fibras demonstrou o processo de hipertrofia desde a eclosão até 60 dias, sendo predominante no período entre 5 e 25 dias. O número de núcleos em proliferação aumentou no decorrer do experimento, sendo maior na temperatura de 29°C aos 60 dias. Os resultados mostram que nas temperaturas de incubação de 25°C, 27°C e 29°C, a hipertrofia foi o mecanismo de crescimento predominante na fase inicial (até 25 dias) e a partir desse período a hiperplasia ocorre de forma mais intensa. A interação dos processos hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares dos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C resultou no maior tamanho desses ao final do experimento.

Abstract

This study describes the influence of different temperature regimes during the initial phase of development on morphology and muscle growth characteristics in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Pacu eggs were incubated at 25°C, 27°C, and 29°C until hatching. After day five the fish from each temperature were transferred to 500L tanks. Tank water temperature varied between 25°C to 28°C for all treatments. At hatching and after 5, 25 and 60 days, muscle samples were collected, some were frozen in liquid nitrogen and others fixed in 4% paraformaldehyde or 2.5% glutaraldehyde. These samples were used for morphological, histochemical, immunohistochemical and morphometric analysis. At hatching, we observed a superficial monolayer of small and column cells, lying just beneath the skin surrounding several round cells. From 5 days, we observed two distinct populations of muscle fibers distributed in two layers or compartments: red, in a superficial region presenting fibers with oxidative metabolism and slow contraction and white with fibers presenting glycolytic metabolism and fast contraction. Twenty five days after hatching, intermediate compartments and cell proliferating zones could be seen in the dorsal apex region. Throughout the experimental period, there was an increase in muscle mass due to the arising of new fibers in the cell proliferating zones and between the more differentiated fibers in red, intermediate, and white muscles. It was more obvious from 25 days after hatching, and it was better observed to 29°C than at 25°C and 27°C. From hatching to 60 days, fiber diameter increase was correlated to hypertrophy and it was more evident from 5 to 25 days. The number of proliferating nuclei (PCNA-labeling) increased from hatching to 60 days, what was better observed at 29°C in 60 days. Ours results show that at incubation temperatures of 25°C, 27°C and 29°C, hypertrophy was predominantly from hatching to 25 days, after this muscle growth by hyperplastic mechanism increased. The interaction of the hypertrophic and hyperplastic process of the muscle fiber of the fish hatched at 29°C resulted in the largest size themselves at the end of the experiment.

Introdução

A maior parte da massa corporal nos peixes é formada pelo tecido muscular estriado esquelético, que constitui cerca de 40 a 75% do peso total. Esta abundante massa muscular serve como fonte de proteínas utilizadas na alimentação. Assim, é importante a realização de pesquisas que visam a caracterização do padrão morfológico, bioquímico e fisiológico do tecido muscular em espécies animais de interesse econômico, em condições normais e experimentais.

Na maioria das espécies de peixes a musculatura estriada esquelética, ou musculatura miotomal, está organizada em unidades morfofuncionais, os miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal. Na região onde se encontra o nervo da linha lateral há um septo de tecido conjuntivo denominado de septo transverso, que separa a massa muscular em regiões epiaxial e hipoaxial (Alexander, 1969; Grizzle and Rogers, 1979).

A análise morfológica e histoquímica do tecido muscular estriado nas diferentes espécies animais mostra três tipos básicos de fibras, as vermelhas, as brancas e as intermediárias (Johnston, 1981). A distribuição dessas fibras nos peixes difere do padrão encontrado nos demais vertebrados onde as fibras estão distribuídas em um padrão em mosaico. Na maioria das espécies de peixes as fibras estão distribuídas em compartimentos: vermelho, intermediário e branco (Weatherley and Gill, 1987).

A distribuição das fibras musculares nos compartimentos é variável entre as espécies de peixes, como também nos diferentes estágios de desenvolvimento destes animais. Assim, o músculo vermelho pode aparecer na região subdermal como uma camada fina e uniforme ao longo de todo o corpo do animal (Egginton and Johnston, 1982; Dal Pai-Silva et al., 1995) ou pode apresentar uma distribuição mais localizada aparecendo somente na região do nervo da linha lateral, onde assume um aspecto triangular (Hoyle et al., 1986).

As fibras musculares vermelhas normalmente são menores (25 a 45 μ m de diâmetro), apresentam alta concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídeos e excelente suprimento sanguíneo, sendo utilizadas na realização de movimentos lentos e de sustentação, como durante a migração (Johnston, 1999). A musculatura branca forma a maior parte da massa muscular. As fibras são maiores (50 a 100 μ m de diâmetro ou mais), apresentam baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias, lipídeos e as miofibrilas ocupam entre 75 a 95% do volume total da fibra, são utilizadas nos movimentos de aceleração e em movimentos

bruscos, obtendo energia a partir da glicólise anaeróbica (Johnston, 1994; Johnston, 1999). As fibras intermediárias normalmente apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias entre as das fibras musculares brancas e vermelhas (Mascarello et al., 1986; Romanello et al., 1987).

O crescimento do tecido muscular nos peixes, ocorre pela associação dos processos de hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares. Esse fato permite evidenciar fibras musculares com diferentes diâmetros em alguns períodos do crescimento, por um período permanente ou na dependência da sazonalidade (Carpene and Veggetti, 1981; Rowlerson et al., 1985). A análise da celularidade muscular, representada pelo número e tamanho das fibras musculares, é variável entre as espécies e na dependência da ação de fatores ambientais como dieta, exercício, luz e temperatura (Johnston, 1999).

De acordo com a literatura, a contribuição dos processos hipertrófico e hiperplásico no crescimento do tecido muscular nas diferentes espécies de peixes é ainda assunto de muitas controvérsias (Carpene et al., 1983; Stickland et al., 1988; Vieira and Johnston, 1992; Brooks and Johnston, 1993; Johnston, 1993). Assim, o conhecimento efetivo da ação dos fatores que influenciam os mecanismos de crescimento do tecido muscular nos peixes é de grande interesse biológico e possui um significado prático na pesquisa em aquicultura e pesca.

Os estudos sobre o crescimento do tecido muscular têm mostrado que os mecanismos hiperplásico e hipertrófico podem ser regulados independentemente, na dependência da espécie e da fase do crescimento considerada. Assim, no salmão, em fase juvenil, a hiperplasia foi mais acentuada durante o crescimento rápido, enquanto a hipertrofia mostrou-se predominante durante o crescimento mais lento (Higgins and Thorpe, 1990). Por outro lado, um estudo pós-larval de truta mostrou um crescimento rápido do tecido muscular por hipertrofia das fibras, sendo mais lento pelo processo de hiperplasia (Kiessling et al., 1991).

Nesta linha de investigação, a obtenção de subsídios que quantificam e expressam o grau de interação entre os processos hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares é de fundamental importância na piscicultura. Apesar das escassas informações sobre o assunto em espécies brasileiras, destacam-se os trabalhos de Brooks et al. (1995) e Dal Pai et al. (2000). Conforme Brooks et al. (1995), o crescimento do tecido muscular na espécie *Prochilodus marginatus* (curimatã-pacú), da eclosão até 14 dias, ocorreu por hipertrofia das fibras pré-existentes. Por outro lado, os estudos de Dal Pai et al. (2000), envolvendo o pacu (*Piaractus mesopotamicus*),

com comprimento corporal entre 10 e 50 cm demonstraram a ocorrência de um número significativo de fibras pequenas e de aspecto indiferenciado, nas sucessivas fases do crescimento. Os peixes com aproximadamente 10 cm apresentaram hiperplasia intensa diminuindo, significativamente, e de modo diferencial, nas fases posteriores. O crescimento hipertrófico nestes animais mostrou-se particularmente aumentado nos peixes com 20 e 30 cm, sendo mais acentuado na musculatura branca (Dal Pai et al., 2000).

A análise do processo de miogênese nos peixes mostra que a origem das primeiras fibras musculares ocorre nas fases iniciais da embriogênese, sob a ação de fatores de regulação miogênica, pertencentes à família “basic helix-loop-helix” (bHLH), da qual fazem parte a MyoD, miogenina, Myf5 e MFR4 (Rudnick and Jaenisch, 1995; Molkenin and Olson, 1996). Esse fatores regulam a ativação, proliferação e diferenciação programada das células progenitoras miogênicas (Watabe, 2001). MyoD e Myf5 são os fatores de regulação miogênica primários envolvidos na determinação enquanto que a miogenina e o MFR4 estão envolvidos na iniciação e estabilização do programa de diferenciação (Rudnick and Jaenisch, 1995; Molkenin and Olson, 1996).

Na fase embrionária, células que expressam fatores de transcrição miogênica, como MyoD, começam a determinar a linhagem das células musculares ao final da gastrulação (Currie and Ingham, 2001). As células localizadas adjacentes a notocorda com morfologia cuboide (células adaxiais) originam as primeiras células específicas de músculo, conhecidas como células pioneiras ou mioblastos embrionários (Watabe, 1999; Johnston, 2001). Uma parte dessas células adaxiais migra para superfície do miótomo, onde originarão as fibras vermelhas, e outra parte permanece na região medial onde desempenharão diferentes funções na morfogênese dos somitos diferenciando-se em fibras musculares brancas (Devoto et al., 1996; Bladgen et al., 1997; Recan et al., 2001). Durante esse processo, ocorre a fusão de mioblastos, originando os miotubos ou fibras musculares imaturas que expressam proteínas contráteis no seu sarcoplasma (Johnston et al., 1995; Watabe, 1999). Esses miotubos possuem um ou mais núcleos em posição central, miofibrilas em posição periférica e características morfológicas e fisiológicas próprias. No decorrer do crescimento os núcleos migram para a periferia das fibras e as miofibrilas passam a ocupar quase todo o sarcoplasma (Van Raamsdonk et al., 1978; Ashby et al., 1993; Johnston et al., 1995).

Durante a embriogênese das fibras musculares alguns mioblastos não se fundem, permanecendo como células indiferenciadas no tecido muscular. Esse tipo celular é referido pelos pesquisadores como mioblasto adulto, mioblasto persistente ou célula mio-satélite, sendo responsável pelo processo de crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura estriada nos peixes, no período pós-embriônico (Johnston, 1999).

Conforme os estudos de Johnston et al. (1998), durante a formação da musculatura miotomal podem ser reconhecidas três fases distintas em algumas espécies de peixes. Na primeira fase ocorre a formação das fibras musculares embrionárias a partir de mioblastos que surgiram antes da eclosão. Nesta fase há um aumento na área ocupada por tecido muscular decorrente da hipertrofia dessas fibras. Na segunda fase da miogênese ocorre a proliferação dos mioblastos com o aparecimento das zonas germinais ou zonas de proliferação de mioblastos, localizadas na extremidade apical da região dorsal (epiaxial) e na região ventral (hipoaxial) dos miótomos. Já na terceira fase da miogênese ocorre a ativação de mioblastos adultos ou células mio-satélites localizadas no tecido conjuntivo, entre as fibras musculares diferenciadas ou entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular (Veggetti et al., 1990; Stoiber and Sanger, 1996). Essas células estão envolvidas com o crescimento hipertrófico e hiperplásico, sendo a hiperplasia mais evidente nas espécies que atingem um tamanho final maior. Nesse caso, observa-se, principalmente na musculatura branca, fibras grandes e pequenas associadas (aspecto em mosaico das fibras, quanto ao diâmetro) (Rowlerson and Veggetti, 2001). Segundo Johnston (1999) e Veggetti et al. (1999) durante o crescimento muscular as células em proliferação podem ser marcadas *in vivo*, usando-se 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), um análogo da timidina, ou após a fixação do material, usando PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).

Nas várias fases de crescimento dos peixes, as fibras da musculatura miotomal apresentam características morfológicas e funcionais distintas. Nas primeiras fases do desenvolvimento, na maioria dos teleósteos, a musculatura branca está envolvida por uma monocamada de fibras vermelhas, pequenas, com características embrionárias, podendo ser mais diferenciada em algumas espécies (Talessara and Urfi, 1987). Posteriormente, ocorre o desenvolvimento da musculatura intermediária (Nag and Nursall, 1972). As pesquisas realizadas têm mostrado que as fibras musculares vermelhas e brancas originam-se de diferentes populações de mioblastos (Devoto et al., 1996; Blagden et al., 1997).

Os estudos envolvendo espécies de interesse econômico referem que o desenvolvimento do tecido muscular no período embrionário e larval dos peixes, bem como, o crescimento pós-larval da musculatura, é variável em função do regime alimentar, do ciclo biológico e das condições ambientais (Willemse, 1976; Weatherley et al., 1979; Talessara and Urfi, 1987; Johnston, 1999). Em especial, os fatores como temperatura, nutrição e pH podem influenciar os mecanismos de crescimento hipertrófico e hiperplásico do tecido muscular, especialmente nas espécies de crescimento corporal prolongado, que atingem um tamanho final maior e possuem maior potencialidade econômica (Carpenè and Veggetti, 1981; Weatherley and Gill, 1985; Weatherley et al., 1988; Johnston, 1993).

O pacu é um dos principais peixes dos rios do Pantanal, bacia do rio Paraguai e da bacia do Prata. A pesca e o mercado de consumo dessa espécie sempre foi abundante na região Centro-Oeste, principalmente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. No entanto a disponibilidade do pacu oriundo de piscicultura vem aumentando e pode ajudar a popularizar o consumo em outras regiões. Sua carne é saborosa, porém pode apresentar alto teor de gordura dependendo da idade, época de captura ou tipo de alimento utilizado no cultivo. É um peixe de crescimento rápido, que atinge um tamanho final grande e pode atingir 1,0 a 1,5 kg no primeiro ano de cultivo. Os mecanismos de crescimento por hiperplasia e hipertrofia das fibras ocorrem por um longo período, sendo a hiperplasia predominante na fase juvenil (Dal Pai et al., 2000).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a temperatura pode influenciar a ingestão de alimentos e a taxa de crescimento dos peixes (Moksness et al., 1995). Por outro lado, a variação na temperatura, durante a incubação dos ovos ou nas fases juvenis, também pode influenciar a diferenciação das células musculares produzidas durante o desenvolvimento inicial, alterar a taxa de crescimento e o tamanho final do peixe no estágio adulto (Barnabé, 1990).

As pesquisas demonstram que a temperatura pode modular as taxas de hiperplasia e hipertrofia nas fases iniciais do desenvolvimento. Embora o mecanismo não seja conhecido, alguns autores preconizam que a temperatura pode alterar o número de “stem cells” e/ou as propriedades dos tipos celulares envolvidos na regulação do crescimento. A determinação, diferenciação e a proliferação das células precursoras miogênicas são eventos exclusivos regulados pelo balanço de vários fatores de regulação miogênica, que tem uma função essencial na inibição da proliferação e na diferenciação terminal das fibras musculares (Rudnicki and Jaenisch, 1995). Segundo Watabe (2001) e Johnston et al. (1998), esse sistema de regulação

pouco conhecido, é responsável pela modulação do crescimento muscular e a temperatura poderia modular potencialmente um ou mais dos numerosos genes e fatores de regulação miogênica determinando o número de fibras e a massa muscular.

Stickland et al. (1988), observaram que a incubação com temperatura em torno de 10°C, no salmão, provocou alteração no número e no diâmetro das fibras musculares dos peixes, logo após a eclosão, quando comparada com a incubação realizada em temperaturas inferiores, de 5°C. Segundo os autores, temperaturas mais altas propiciaram um crescimento hipertrófico mais intenso nas fibras musculares. Por outro lado, Alami-Durante et al. (1997), observaram que a incubação dos ovos de carpa utilizando-se temperaturas de 15°C, 19°C e 23°C, não provocou nenhum efeito sobre o número total de fibras musculares após a eclosão. Vieira and Johnston, (1992), analisando o desenvolvimento embrionário da espécie *Clupea harengus*, que normalmente ocorre em temperaturas em torno de 5 a 10°C, com temperatura acima de 15°C, observaram um maior número de fibras musculares brancas com diâmetro pequeno, caracterizando o processo de hiperplasia. Esse fato está correlacionado a um maior recrutamento de mioblastos para a formação de novas fibras musculares. Segundo vários autores, como o músculo estriado esquelético apresenta plasticidade, diferenças na temperatura de incubação dos ovos podem afetar a celularidade muscular, a composição das proteínas miofibrilares e as características morfofisiológicas das fibras musculares (Vieira and Johnston, 1992; Veggetti et al., 1993; Nathanailides et al., 1996). Conforme os estudos de Calvo and Johnston (1992), alterações na temperatura de incubação podem levar a alterações na distribuição das fibras musculares durante as várias fases do desenvolvimento, podendo influenciar a capacidade de locomoção, o crescimento somático e o tamanho final de determinada espécie de peixe.

Os dados apresentados mostram que os primeiros estágios de desenvolvimento nos peixes são sensíveis a pequenas mudanças de temperatura. Esse fato pode acarretar consequências marcantes sobre o desenvolvimento e crescimento de algumas espécies.

Objetivos

1 - Avaliar as características morfológicas, morfométricas, histoquímicas e ultraestruturais das fibras musculares do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) durante as primeiras fases de desenvolvimento:

2 - Avaliar se a temperatura de incubação influencia as características morfológicas do crescimento do tecido muscular nas fases iniciais do desenvolvimento, modulando o recrutamento e a celularidade da musculatura.

3 - Avaliar a importância dos processos de hipertrofia e hiperplasia nas fases iniciais de desenvolvimento.

Artigo 1: Influência da temperatura de incubação sobre a morfologia e o crescimento do tecido muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases iniciais do desenvolvimento. (*)

Artigo 2: Histoquímica e ultraestrutura do tecido muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases iniciais do desenvolvimento, após diferentes temperaturas de incubação. (**)

* Foi feita a versão para língua inglesa para submeter à revista Aquaculture.

** Está sendo feita a versão para língua inglesa para submeter à revista Tissue and Cell.

Influência da temperatura de incubação sobre a morfologia e o crescimento do tecido muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases iniciais do desenvolvimento.

Jeane Marlene Fogaça de Assis¹, Cláudio Ângelo Agostinho² e Maeli Dal Pai-Silva³

¹Departamento de Biologia Celular – IB – UNICAMP – Campinas - SP

² Departamento de Produção e Exploração Animal – FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

² Departamento de Morfologia – IBB – UNESP – Botucatu - SP

Endereço para correspondência:

Departamento de Morfologia
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP: 18 618 000
Email: dpsilva@ibb.unesp.br
Tel: (14) 6802 6264

Resumo

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da variação da temperatura de incubação dos ovos, sobre a morfologia e o crescimento do tecido muscular no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) durante as fases iniciais do desenvolvimento. Os ovos do pacu foram incubados em três temperaturas: 25°C, 27°C e 29°C. Após cinco dias da eclosão as larvas foram transferidas para caixas individuais de cimento amianto (500L) abastecidas com água corrente a temperatura ambiente (25°C a 28°C). Aos 5, 25 e 60 dias após a eclosão, exemplares de pacu foram sacrificados e amostras de músculo estriado esquelético foram congeladas em nitrogênio líquido ou fixadas em paraformaldeído a 4% e processadas para as análises morfológica, imunohistoquímica e morfométrica.

A partir de cinco dias da eclosão foram observadas duas populações distintas de fibras musculares distribuídas em compartimentos; o vermelho, localizado na região superficial, e o branco, constituindo a maior parte da musculatura. O compartimento intermediário foi bem definido aos 60 dias e zonas de proliferação celular no ápice da região dorsal foram evidenciadas aos 25 dias após a eclosão. No decorrer do experimento observou-se um espessamento da massa muscular. Esse foi decorrente do aparecimento de novas fibras na zona de proliferação celular e entre as fibras das musculaturas vermelha, intermediária e branca. Esse fato foi melhor observado a partir de 25 dias da eclosão, sendo mais acentuado na temperatura de incubação de 29°C. O aumento do diâmetro das fibras demonstrou o processo de hipertrofia desde a eclosão até 60 dias, sendo predominante no período entre 5 e 25 dias. O número de núcleos em proliferação aumentou no decorrer do experimento, sendo maior na temperatura de 29°C aos 60 dias. Os resultados mostram que nas três temperaturas de incubação, a hipertrofia foi o mecanismo de crescimento predominante na fase inicial (até 25 dias) e a partir desse período a hiperplasia ocorre de forma mais intensa. A interação dos processos hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares dos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C resultou no maior tamanho desses ao final do experimento.

Palavras chaves: Morfologia, crescimento, tecido muscular, temperatura, *Piaractus mesopotamicus*

Introdução

Na maioria das espécies de peixes a musculatura estriada esquelética está organizada em unidades morfofuncionais, os miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal. Na região onde se encontra o nervo da linha lateral há um septo de tecido conjuntivo denominado de septo transverso, que separa a massa muscular em regiões epiaxial e hipoaxial (Alexander, 1969; Grizzle and Rogers, 1979). Em contraste com o padrão de distribuição das fibras em mosaico encontrado nos vertebrados, a maioria dos peixes apresenta as fibras musculares distribuídas em compartimentos vermelho, intermediário e branco. As fibras musculares são principalmente do tipo branca, são maiores e estão envolvidas por uma fina camada de fibras menores do tipo vermelha. Entre esses dois compartimentos encontra-se o intermediário, com fibras apresentando características intermediárias às brancas e vermelhas. Essa distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares em compartimentos é característica da maioria dos peixes teleósteos. (Johnston, 1981; Weatherley and Gill, 1987).

Conforme os estudos de Johnston et al. (1998), em algumas espécies de peixes, durante a formação da musculatura miotomal podem ser reconhecidas três fases distintas. Na primeira fase ocorre a formação das fibras musculares embrionárias a partir de mioblastos que surgiram antes da eclosão. Nesta fase há um aumento na área ocupada por tecido muscular decorrente da hipertrofia dessas fibras. Na segunda fase da miogênese ocorre a proliferação dos mioblastos com o aparecimento das zonas germinais ou zonas de proliferação de mioblastos, localizadas na extremidade apical da região dorsal (epiaxial) e na região ventral (hipoaxial) dos miótomos. Na terceira fase da miogênese ocorre a ativação de mioblastos adultos ou células mio-satélites, localizadas no tecido conjuntivo entre as fibras musculares diferenciadas ou entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular (Veggetti et al., 1990; Stoiber and Sanger, 1996).

O músculo estriado esquelético é um tecido pós-mitótico e nos peixes, no período pós-embrionário, o crescimento desse tecido ocorre pela associação dos processos de hipertrofia (aumento do diâmetro das fibras musculares) e pela hiperplasia (recrutamento de novas fibras musculares), a partir de mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites. Em determinado momento, essas células proliferam e se diferenciam para formar novas fibras ou são incorporadas às fibras pré-existentes, processos regulados por vários fatores de regulação miogênica (Johnston, 1999). Isso reflete em fibras musculares com diferentes diâmetros, principalmente na

musculatura branca, em alguns períodos do crescimento, por um período permanente ou na dependência da sazonalidade (Carpene and Veggetti, 1981; Rowleron et al., 1985). Durante o desenvolvimento e crescimento muscular, as células em proliferação podem ser evidenciadas utilizando-se anticorpo monoclonal específico para PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) ou utilizando-se uma marcação in vivo pelo BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine), um marcador análogo à timidina (Johnston, 1999; Veggetti et al., 1999).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a temperatura pode influenciar a ingestão de alimentos, a celularidade muscular a dinâmica do desenvolvimento e o crescimento dos peixes comprometendo o tamanho final no estágio adulto (Stickland et al., 1988; Barnabé, 1990; Moksness et al., 1995; Wilkes et al., 2001). Nesta linha de investigação, Stickland et al. (1988), observaram que a incubação de ovos de salmão com temperatura em torno de 10° C provocou alteração no número e no diâmetro das fibras musculares dos peixes logo após a eclosão, quando comparada com a incubação realizada em temperaturas inferiores a 5° C. Segundo os autores, temperaturas mais altas propiciaram um crescimento hipertrófico mais intenso nas fibras musculares. Vieira and Johnston, (1992), analisando a espécie *Clupea harengus*, na qual o desenvolvimento embrionário ocorre normalmente em temperaturas em torno de 5 a 10°C, observaram um maior número de fibras musculares brancas com diâmetro pequeno caracterizando o processo de hiperplasia, quando incubados à temperatura acima de 15°C. Esse fato está correlacionado a um maior recrutamento de mioblastos para a formação de novas fibras musculares. Por outro lado Alami-Durante et al. (1997) observaram que a incubação dos ovos de carpa utilizando-se temperaturas de 15 °C, 19 °C e 23°C, não provocou nenhum efeito sobre o número total de fibras musculares após a eclosão.

Nesse estudo foram analisados os aspectos morfológicos e o crescimento das fibras da musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases iniciais do desenvolvimento, após diferentes temperaturas de incubação dos ovos.

Material e Métodos

Obtenção dos peixes

Os peixes utilizados neste estudo foram obtidos após a fertilização dos gametas de 02 machos e de 03 fêmeas. A reprodução foi realizada no Setor de Piscicultura da FMVZ, Unesp–Campus de Botucatu. Após a fertilização, os ovos foram divididos em volumes iguais e colocados em incubadoras previamente preparadas e mantidas nas temperaturas de 25 °C, 27°C e 29°C. Os tratamentos foram mantidos em triplicata. A manutenção das temperaturas no experimento foi controlada. O pH ($6,65 \pm 0,2$), o oxigênio ($6,7 \text{ mmHg} \pm 0,9$) e a temperatura da água foram monitorados periodicamente. Os peixes foram mantidos neste ambiente até cinco dias após a eclosão, quando ocorre a abertura da boca e enchimento da bexiga natatória. A seguir foram transferidos para tanques individuais de cimento amianto com capacidade de 500L e densidade de aproximadamente 150 peixes/m³. Em todos os tratamentos as caixas foram abastecidas com água corrente proveniente de uma mina, na qual a temperatura variou entre 25 °C e 28°C, durante todo o dia (24h). A partir da abertura da boca os peixes foram alimentados com artemia (Cistos de *Artemia sp*, INVE) até o décimo quinto dia de vida e a partir desse período receberam ração farelada com 40% de proteína bruta. Exemplos de pacu foram coletados aos 5, 25 e 60 dias após a eclosão.

Morfologia e Morfometria

Foi mensurado o comprimento de cinco indivíduos de cada tratamento. Esses foram fixados em paraformaldeído a 4% (Bancroft and Stevens, 1990), processados e embebidos em Historesina (Kit Historesin, Leica). Cortes histológicos com 3 µm de espessura, obtidos transversalmente ao corpo do animal, na região da nadadeira dorsal, foram submetidos à coloração pela Hematoxilina-Eosina (Behmer et al., 1976). Algumas amostras de músculo foram congeladas em n-hexana (Dinâmica) a -70°C, resfriada em nitrogênio líquido a -190°C. Quando o material era muito pequeno, foi envolvido em outro tecido (fígado ou músculo de rato), para facilitar a microtomia. Cortes histológicos com 9 µm, obtidos em criostato (-20°C) foram submetidos à coloração pela Hematoxilina e Eosina (Behmer et al., 1976). O material embebido

em historresina e o congelado foram utilizado para a análise morfológica da musculatura. Foi utilizado um quadrante da musculatura epiaxial (Fig. 1) para a contagem do número total de fibras musculares. Também foi realizada a mensuração do menor diâmetro de aproximadamente 500 fibras musculares vermelhas e 500 brancas em cada tratamento. Para essas análises foi utilizado o sistema de análise de imagens Qwin (Leica, Germany).

Imunohistoquímica

Exemplares de pacu foram fixados em paraformaldeído a 4% (Bancroft and Stevens, 1990), processados e embebidos em Paraplast (Polywax, Difco Laboratories). Cortes histológicos com 6 μm de espessura, obtidos transversalmente ao corpo dos exemplares na região da nadadeira dorsal, foram colocados em lâminas histológicas silanizadas. O material foi submetido à reação imunohistoquímica para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), para avaliar o grau de proliferação celular na musculatura estriada. Os cortes histológicos foram rehidratados e incubados com o anticorpo primário NCL-PCNA, (Novocastra). Após isso, foram incubadas com anticorpo secundário anti-mouse IgG (Vector), e posteriormente com a solução ABC (Avidina-Biotina-Peroxidase, Vector). Após a revelação com DAB (Diamino benzidina, Sigma), as lâminas foram montadas em permount (Hsu et al., 1981; Foley et al., 1993). Foi realizada a contagem do número de núcleos em proliferação (PCNA positivos), em um quadrante epiaxial, utilizando o sistema de análise de imagens Qwin (Leica, Germany).

Análise estatística

Os dados referentes ao comprimento dos peixes e diâmetro das fibras foram representados como média \pm desvio padrão, sendo submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste Tukey. Para o número de fibras musculares e número de núcleos em proliferação, foi feita a transformação em raiz quadrada antes da realização da Análise de Variância. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

O processo de eclosão do pacu ocorreu em tempos diferentes de acordo com a temperatura de incubação. À 25°C, 27°C e 29°C, a eclosão de 50% dos ovos ocorreu após 20:20hs, 16:30hs e 14hs respectivamente.

Em relação ao comprimento dos peixes, aos 5 dias não houve diferença significativa entre as três temperaturas de incubação. Aos 25 dias o comprimento foi significativamente menor na temperatura de 25°C e aos 60 dias, foi significativamente maior na temperatura de 29°C (Fig. 3).

Análise morfológica

Aos 5 dias, nas três temperaturas, foi possível identificar dois compartimentos distintos na musculatura estriada esquelética do pacu: o superficial, formado por uma camada de fibras pequenas adjacentes ao tegumento, com aspecto colunar em corte transversal, e o profundo, formando a maior parte da musculatura, constituído por fibras de aspecto arredondado em corte transversal, separadas por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo, o endomísio. A maioria das fibras apresentou núcleos centrais, porém em algumas os núcleos estavam localizados na periferia da fibra. Na região do septo transversal, que divide a musculatura nas regiões epiaxial e hipoaxial, a camada de fibras com aspecto colunar adentrava a musculatura em direção ao plano mediano, assumindo um aspecto triangular (Fig.1).

Aos 25 e 60 dias, nas três temperaturas, observou-se um espessamento da massa muscular epiaxial (Fig. 2). Septos de tecido conjuntivo separando a massa muscular em fascículos foram observados com frequência, mais evidentes nos peixes que eclodiram nas temperaturas de 27°C e 29°C (Fig. 2A, C e E). No compartimento superficial foi observado um maior número de fibras na região do septo transversal e no profundo, foram identificadas muitas fibras pequenas entre as maiores (Fig 2B, D e F). Nas temperaturas de 27°C e 29°C, a maioria das fibras apresentou núcleo localizado na periferia (Fig. 2C e E). Na temperatura de 25°C, fibras com núcleo central foram mais frequentes (Fig. 2A). Foram observadas também áreas dorsais na região epiaxial, de tecido conjuntivo frouxo, com grupos de fibras pequenas, melhor evidenciadas nos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C (Fig 2A, C e E). Aos 60 dias, também foram evidenciados

aglomerados de fibras menores, no compartimento profundo, nos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C (Fig. 2F).

Análise morfométrica

Aos 5 dias não houve diferença significativa quanto ao número de fibras, entre as temperaturas, no compartimento superficial. Aos 25 dias, o aumento do número de fibras foi significativamente menor na temperatura de 25°C, e com 60 dias os peixes que eclodiram à temperatura de 29°C apresentaram um maior número de fibras no compartimento superficial em relação à temperatura de 27°C, mas não significativo para 25°C. No período de 5 a 25 dias, houve um aumento significativo no número de fibras, apenas na temperatura de 27°C e a partir de 25 dias, esse aumento foi significativo em todas as temperaturas (Tabela 1). No compartimento profundo, aos 5 dias, os peixes que eclodiram na temperatura de 29°C, apresentaram um número de fibras significativamente maior em relação à temperatura de 27°C, mas não significativo para 25°C. Aos 25 dias, o número de fibras foi significativamente maior nas temperaturas de 27 e 29°C e com 60 dias, os peixes que eclodiram na temperatura de 29°C mostraram o número de fibras significativamente maior em relação à temperatura de 25°C, mas não significativo para a temperatura de 27°C. Houve aumento significativo do número de fibras a partir de 25 dias em todas as temperaturas (Tabela 1).

No compartimento superficial, aos 5 dias, o diâmetro das fibras foi significativamente maior nas temperaturas de 27°C e 29°C. Aos 25 e 60 dias, o diâmetro das fibras foi significativamente maior proporcionalmente ao aumento das temperaturas. A partir de 25 dias, houve aumento significativo no diâmetro das fibras na temperatura de 25°C. Na temperatura de 27°C esse aumento foi significativo durante todo o período do experimento e na temperatura de 29°C, não houve aumento significativo a partir dos 25 dias. No compartimento profundo, aos 5 dias, não houve diferença significativa no diâmetro das fibras entre as temperaturas. Com 25 dias, o diâmetro das fibras foi maior nas temperaturas de 27°C e 29°C e com 60 dias, foi maior na temperatura de 29°C. Durante o período do experimento, houve um aumento significativo no diâmetro das fibras na temperatura de 25°C. Nas temperaturas de 27°C e 29°C, esse aumento foi significativo no período de 5 a 25 dias, sendo que na temperatura de 27°C houve uma redução na média do diâmetro das fibras, entre 25 e 60 dias. (Tabela 1).

Os núcleos em proliferação no quadrante da musculatura epiaxial foram evidenciados pela reação imunohistoquímica PCNA. O número de núcleos da musculatura aumentou no decorrer do experimento em todas as temperaturas. Com 5 dias não houve diferença significativa no número de núcleos entre as temperaturas. Aos 25 dias o número de núcleos foi significativamente maior na musculatura dos peixes que eclodiram na temperatura de 25°C, e com 60 dias, foi significativamente maior nos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C (Fig. 4).

Tabela 1– Média \pm Desvio Padrão do diâmetro e do número de fibras do compartimento superficial - vermelhas (V) e do compartimento profundo - brancas (B) no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas temperaturas de incubação de 25°C, 27°C e 29°C, aos 5, 25 e 60 dias após a eclosão.

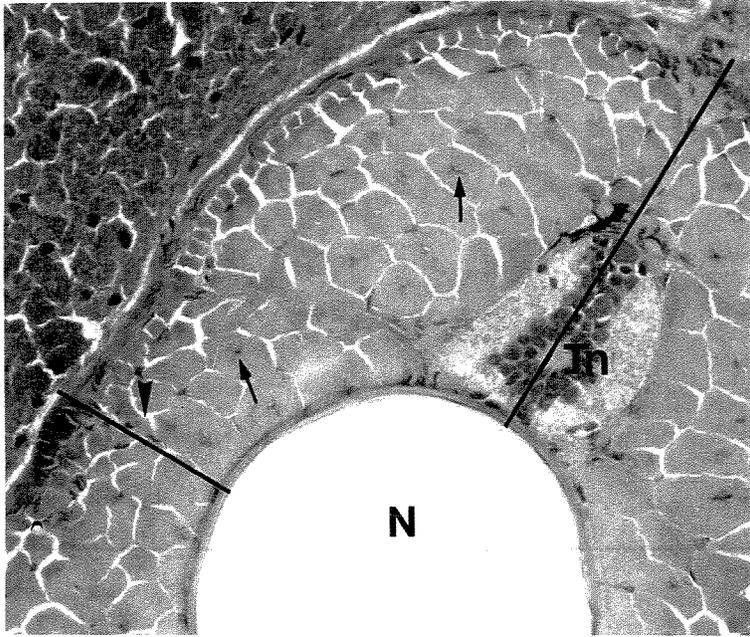
Dias		Diâmetro das fibras			Número de fibras		
		5	25	60	5	25	60
25°C	B	9,2 \pm 3,4 ^{1A}	11,5 \pm 4,3 ^{2A}	15,6 \pm 13,0 ^{3A}	64,2 \pm 7,2 ^{1AB}	80,5 \pm 8,7 ^{1A}	834,2 \pm 383,3 ^{2A}
	V	2,2 \pm 0,5 ^{1a}	2,34 \pm 0,5 ^{1a}	6,8 \pm 3,5 ^{2a}	46,4 \pm 3,5 ^{1a}	44,5 \pm 1,7 ^{1a}	192,4 \pm 44,4 ^{2ab}
27°C	B	9,1 \pm 3,4 ^{1A}	16,77 \pm 7,5 ^{2B}	14,77 \pm 11,0 ^{3A}	58,0 \pm 7,1 ^{1A}	226,0 \pm 33,8 ^{1B}	1111,6 \pm 237,8 ^{2AB}
	V	2,4 \pm 0,6 ^{1b}	3,5 \pm 0,9 ^{2b}	6,6 \pm 2,9 ^{3b}	48,8 \pm 7,7 ^{1a}	78,2 \pm 6,1 ^{2b}	183,6 \pm 42,5 ^{3a}
29°C	B	8,9 \pm 3,6 ^{1A}	16,8 \pm 8,0 ^{2B}	17,2 \pm 16,4 ^{2B}	79,4 \pm 16,3 ^{1B}	270,2 \pm 127,3 ^{1B}	1961,8 \pm 906,8 ^{2B}
	V	2,4 \pm 0,5 ^{1b}	3,8 \pm 1,2 ^{2c}	8,7 \pm 4,1 ^{2c}	47,2 \pm 4,1 ^{1a}	92,2 \pm 40,2 ^{1b}	246,8 \pm 28,2 ^{2b}

Diferenças significativas quando $P < 0,05$

-Valores nas linhas com mesmo número não estatisticamente significativos

-Valores nas colunas com as mesmas letras (maiúsculas para fibras brancas e minúsculas para fibras vermelhas), não estatisticamente significativos

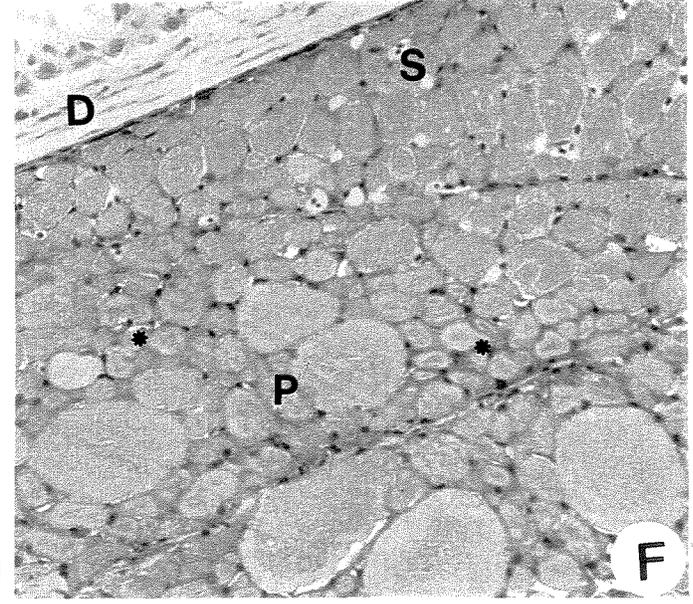
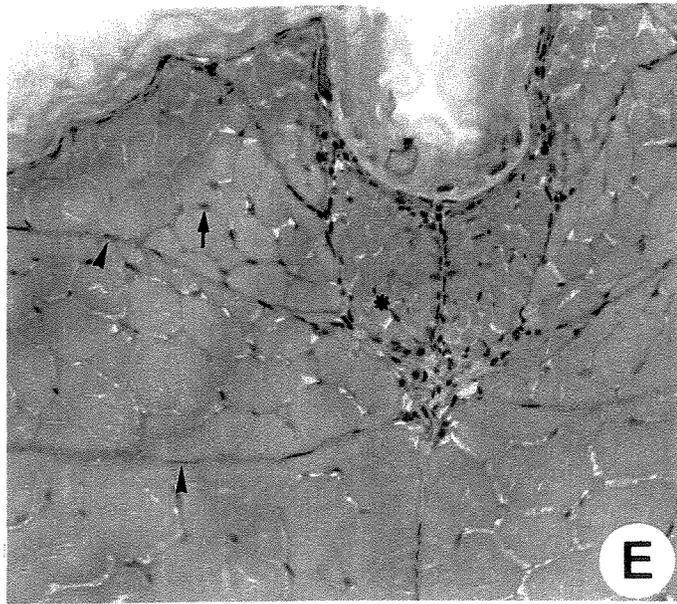
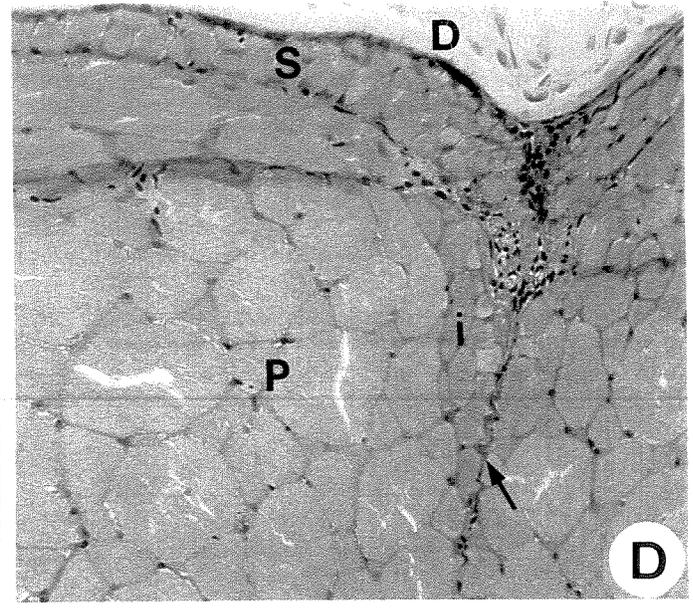
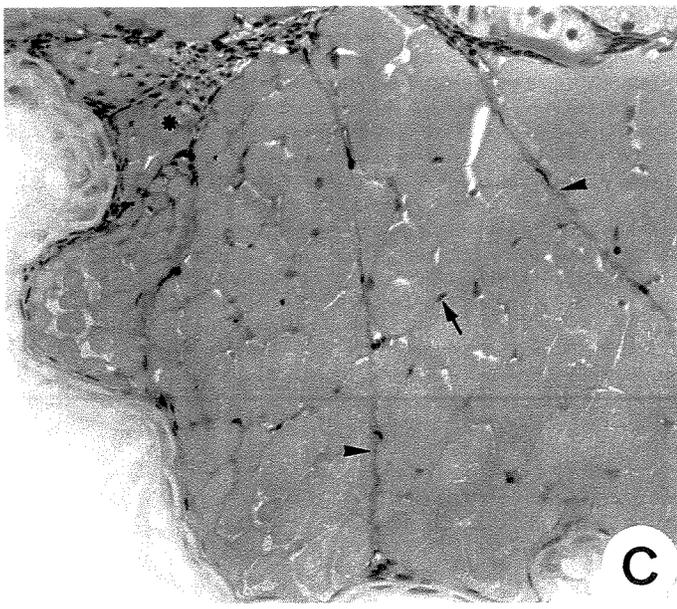
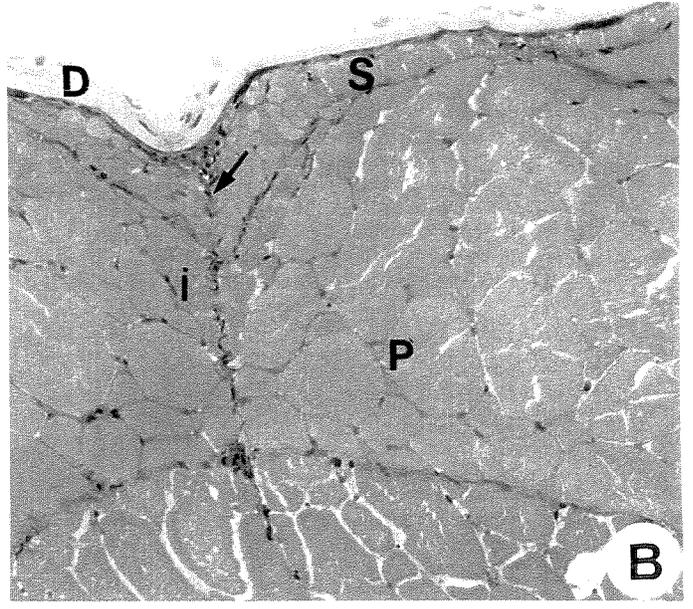
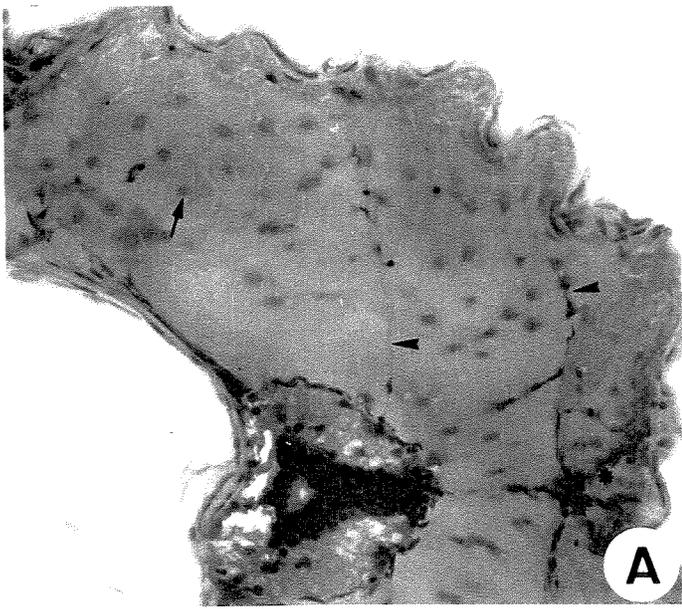
Figura 1: Fotomicrografia da musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em corte transversal, 5 dias após a eclosão. Delimitação do quadrante epiaxial (linhas contínuas). Fibras com núcleos centrais (setas). Fibras do compartimento superficial adentrando a musculatura em direção ao plano mediano (cabeça de seta). Tecido nervoso (Tn). Notocorda (N). HE, 80X.



**Figura 2 – Fotomicrografias da musculatura estriada do pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) em corte transversal.**

A, C, E: Vinte e cinco dias após a eclosão, temperaturas de 25°C, 27°C e 29°C, respectivamente. Fibras do compartimento profundo. Septos de tecido conjuntivo dividindo a massa muscular em fascículos (cabeça de seta). Núcleos (seta). Grupos de fibras pequenas no ápice da região dorsal (*). HE, 80X.

B, D, F: Sessenta dias após a eclosão, temperaturas de 25°C, 27°C e 29°C, respectivamente. Derme (D). Fibras do compartimento superficial (S). Fibras do compartimento intermediário (i) em B e D. Fibras com diferentes tamanhos, mais evidentes no compartimento profundo (P). Notar o maior número de fibras menores no compartimento profundo (*) em F. Região do septo transversal em B e D (seta). HE, 62,5.



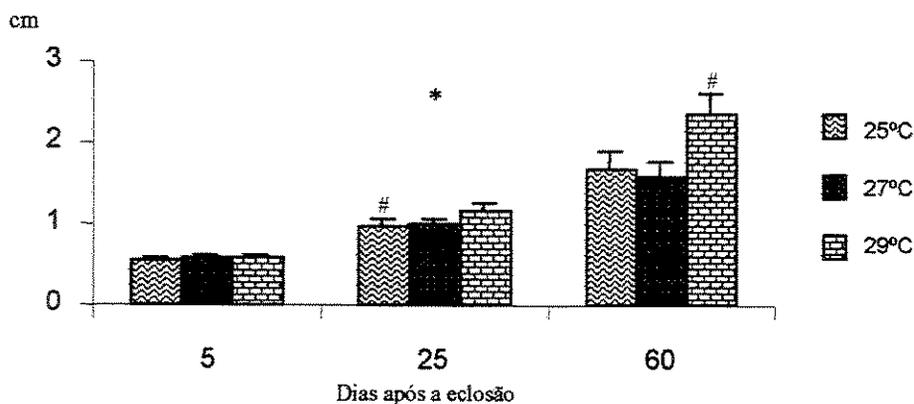


Fig.3 - Média e desvio padrão do comprimento total dos exemplares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) no decorrer do experimento, nas diferentes temperaturas de incubação. (*) Período a partir do qual o aumento do comprimento foi estatisticamente significativo. (#) Temperatura na qual houve diferença significativa.

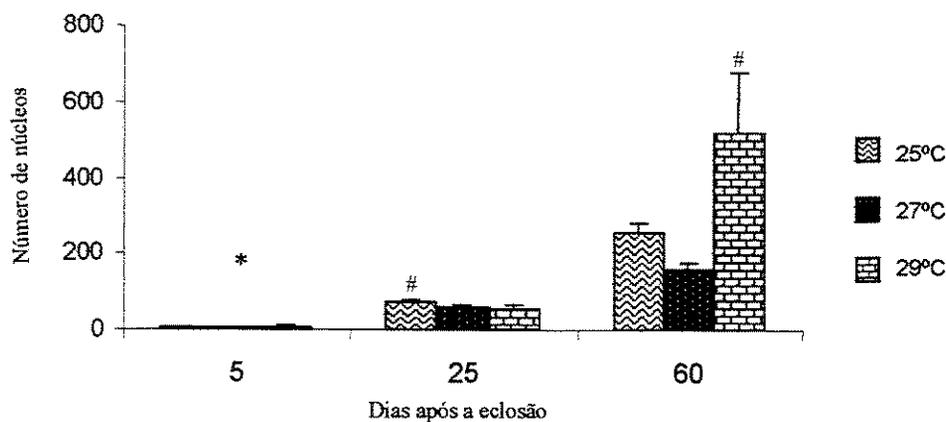


Fig.4 - Média e desvio padrão do número de núcleos em proliferação na musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) no decorrer do experimento, nas temperaturas estudadas. (*) Período a partir do qual o aumento é estatisticamente significativo. (#) Temperatura com diferença significativa.

Discussão

No nosso estudo, após a fertilização e incubação dos ovos nas diferentes temperaturas, o tempo de eclosão foi inversamente proporcional à temperatura de incubação. Segundo vários pesquisadores, a temperatura de incubação dos ovos pode influenciar o desenvolvimento e crescimento dos peixes (Calvo and Johnston, 1992; Vieira and Johnston, 1996; Johnston et al., 1998; Galloway et al., 1999) e a incubação dos ovos em temperaturas mais elevadas pode acelerar o tempo de eclosão. No entanto, os experimentos têm mostrado que existe uma variação do efeito da temperatura de incubação dos ovos no desenvolvimento e crescimento do tecido muscular (Vieira and Johnston, 1992; Johnston et al., 1998). Tal fato pode estar relacionado com a qualidade dos ovos, incluindo a quantidade de nutrientes do saco vitelínico bem como a concentração de fatores de crescimento locais (Johnston et al., 1998). Há evidências de que o córion pode formar uma barreira nas trocas gasosas entre o embrião e o meio e a temperatura poderia influenciar as trocas e difusão de oxigênio através do córion e fluido previtelínico (Matschack et al., 1995 e 1997). A eclosão antecipada nas temperaturas mais elevadas pode ser devido a necessidade da obtenção de oxigênio para suprir a demanda metabólica ocasionada pelo rápido crescimento, uma vez que altas temperaturas diminuem a concentração de oxigênio (Vieira and Johnston, 1996 e 1999).

No pacu, após 5 dias da eclosão, foi possível identificar dois compartimentos distintos, o superficial, distribuído como uma fina camada abaixo do tegumento, circundando todo o corpo do animal e o profundo formando a maior parte da musculatura. No decorrer do experimento ocorreu um espessamento da massa muscular nos dois compartimentos, nos peixes que eclodiram nas três temperaturas. Esse padrão de distribuição das fibras musculares é uma característica comum entre a maioria das espécies de peixes (Scapolo et al., 1988; Veggetti et al., 1990, 1993). O espessamento da massa muscular do pacu foi decorrente do crescimento do tecido muscular. Segundo a literatura, o crescimento pós-embriológico do tecido muscular nos peixes pode ocorrer por hipertrofia das fibras pré-existentes, onde ocorre um aumento do diâmetro das fibras ou pela formação de novas fibras musculares, processo conhecido como hiperplasia (Alami-Durante et al., 1997; Galloway et al., 1999; Rowleron and Veggetti, 2001). Em mamíferos, o crescimento do tecido muscular por hiperplasia das fibras é restrito aos períodos pré e peri-natal (Stickland, 1983). No pacu, no período estudado, o aumento do número de fibras na musculatura vermelha e

branca, caracterizou o processo de hiperplasia e a análise do diâmetro das fibras mostrou que também ocorreu a hipertrofia das fibras.

O aumento significativo do diâmetro das fibras caracterizou a hipertrofia como principal processo de crescimento até 25 dias, em todas as temperaturas, uma vez que o aumento do número de fibras não foi significativo, exceto nas fibras do compartimento superficial, para a temperatura de 27°C. No entanto, no período entre 25 e 60 dias o aumento significativo do número de fibras nos compartimentos e nas zonas germinais, caracteriza o crescimento hiperplásico. Porém, nessa fase, a análise do diâmetro das fibras demonstra que a hipertrofia também está ocorrendo. Na temperatura de 29°C, esse aumento não foi significativo, embora tenha sido maior do que nas temperaturas de 25°C e 27°C, caracterizando um crescimento hiperplásico mais intenso na temperatura de 29°C.

A maioria dos estudos preconiza que o crescimento pós-embriônico do tecido muscular em peixes ocorre principalmente pelo aumento da área das fibras musculares formadas antes da eclosão (Brooks et al., 1995). Posteriormente ocorre a formação de zonas de crescimento ou zonas germinais de proliferação celular localizadas nas regiões epiaxial e hipoaxial. Em seqüência, o crescimento muscular ocorre pela ativação de mioblastos adultos ou células mio-satélites até a fase adulta (Veggetti et al., 1990; Gibson et al., 1995; Johnston and McLay, 1997; Galloway et al., 1999). Esse padrão de desenvolvimento da musculatura foi observado no pacu, onde, na fase inicial (até 25 dias) predominou a hipertrofia de fibras; aos 25 dias, foram observadas as zonas embriogênicas e aos 60 dias, o grande número de fibras pequenas associado à hipertrofia das fibras demonstra a atividade dos mioblastos indiferenciados no processo de crescimento muscular.

Como o músculo é um tecido pós mitótico, a hiperplasia e a hipertrofia das fibras ocorrem através da atividade dos mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites (Johnston, 1999). Em mamíferos e em algumas espécies de peixes, nas fases juvenil e adulta, essas células estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática das fibras musculares (Mauro, 1961; Campion, 1984; Koumans and Akster, 1995). Contudo nas fases iniciais de desenvolvimento, precursores mio-gênicos são também observados no tecido conjuntivo do endomísio (Johnston, 1993; Stoiber and Sanger, 1996). Segundo Johnston et al. (1998), essas células representam mioblastos indiferenciados ou persistentes, envolvidos no crescimento muscular. Essas células proliferam e os núcleos serão adicionados às fibras pré-existentes ou formarão novas fibras.

Conforme os estudos de Assis et al. (2002), a análise ultraestrutural da musculatura estriada do pacu, mostrou núcleos de células indiferenciadas, com pouco citoplasma localizadas entre as fibras musculares. Provavelmente, essas células são mioblastos indiferenciados no endomísio. Segundo Ramirez-Zarzosa et al. (1995), a presença de fibras com núcleos centrais demonstra que essas ainda não estão completamente diferenciadas, fato observado no nosso estudo aos 5 dias, nas três temperaturas. A partir de 25 dias, essas fibras ainda eram freqüentes na temperatura de 25°C.

No decorrer do experimento, o aumento do número de núcleos em proliferação na musculatura indica a participação desses nos processos de crescimento hiperplásico e hipertrófico. Embora aos 25 dias, o número e o diâmetro das fibras musculares dos peixes que eclodiram na temperatura de 25°C tenham sido menores, aos 60 dias não houve diferença significativa entre as temperaturas de 25°C e 27°C, em relação aos mesmos parâmetros. Tal fato pode estar relacionado à maior freqüência de núcleos marcados na temperatura de 25°C, aos 25 dias, indicando uma maior atividade de proliferação celular nesse período, possivelmente envolvida nos processos de crescimento hipertrófico e hiperplásico. É possível que, a proliferação celular mais intensa nesse período, tenha compensado o maior desenvolvimento muscular que a temperatura de 27°C vinha apresentando, uma vez que aos 60 dias os resultados morfométricos foram semelhantes.

Por outro lado, com 60 dias, na temperatura de 27°C e 29°C não ocorreu um aumento na média do diâmetro das fibras, mas houve um aumento significativo do número de fibras. É provável que, nesse período, a maior freqüência de núcleos em proliferação esteja relacionada principalmente com o processo de hiperplasia.

O pacu é um peixe de crescimento rápido, que atinge um tamanho final grande, onde os mecanismos de crescimento muscular por hiperplasia e hipertrofia ocorrem por um longo período, sendo a hiperplasia predominante na fase juvenil (Dal Pai et al., 2000). Ao contrário, nas espécies que atingem um tamanho final pequeno, o recrutamento de fibras cessa em uma fase mais precoce (Weatherley and Gill, 1984). No nosso estudo, a associação desses mecanismos de crescimento foi melhor evidenciada no período de 25 a 60 dias, quando os peixes tinham em média 1cm de comprimento, conforme análise do diâmetro, do número das fibras e da morfologia em corte transversal, que mostrou um aspecto em mosaico, com fibras de diferentes diâmetros.

Nossos resultados mostram que a variação na temperatura de incubação dos ovos modulou as características do crescimento muscular do pacu. Vários autores têm demonstrado que a temperatura de incubação pode modificar as taxas de hiperplasia e hipertrofia nas diferentes fases do crescimento muscular. O mecanismo não é conhecido, mas alguns autores sugerem que a temperatura pode alterar a proliferação e a diferenciação de mioblastos ou “*stem cell*” miogênicas, eventos regulados por vários fatores de regulação miogênica, que desempenham uma importante função na proliferação celular e na diferenciação das fibras musculares (Olson, 1992; Rudnicki and Jaenisch, 1995). Conforme os estudos de Wilkes et al. (2001), a temperatura pode alterar o tempo de expressão dos fatores de regulação miogênica nas fases iniciais do desenvolvimento muscular, modulando os processos de proliferação e diferenciação das células musculares.

Como no final do nosso experimento, na temperatura de incubação de 29°C os peixes apresentaram maior diâmetro nas suas fibras, uma intensa hiperplasia e alta taxa de proliferação celular, isso resultou no maior comprimento dos peixes nessa temperatura em comparação com as demais. Embora os processos de crescimento muscular por hipertrofia e hiperplasia estejam ocorrendo nas três temperaturas estudadas, é possível que os peixes que eclodiram na temperatura de incubação de 29°C possam atingir um tamanho final maior, bem como, possa ocorrer um adiantamento da fase reprodutiva, o que deve ser observado em estudos futuros. Esse estudo demonstra a viabilidade da incubação de ovos de pacu à temperatura de 29°C para obtenção de larvas e alevinos maiores e com maior potencial de crescimento.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o importante apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 00/06177-0. Agradecemos aos funcionários, Denilson, Jarbas do Amaral, Sueli Cruz Michelim e Cristina Audi, pelos auxílios prestados.

Referência

- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A. M., Bergot, P. 1997. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth raye. *J. Fish. Biol.* 50, 1285-1302.
- Alexander, R. Mc, N. 1969. The orientation of muscle in the myomers of fishes. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 49, 263-290.
- Assis, J.M.F., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M. 2002. Histoquímica e ultraestrutura nas fases iniciais do crescimento do tecido muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido a diferentes temperaturas de incubação. Tese em preparação.
- Bancroft, J.D., Stevens, A. 1990. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd ed. *Churchill Livingstone*, New York, 704p
- Barnabé, G. 1990. Rearing bass and gilthead bream. In: *Aquaculture*, 2 (ed. G. Barnabé), 647-696. *Ellis Horwood*. New York.
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. *Edart*, São Paulo. 239 p.
- Brooks, S., Vieira, V.L.A., Johnston, I.A., Macheru, P. 1995. Muscle development in larvae of a fast growing tropical freshwater fish, the curimatã-pacu. *J. Fish Biol.* 47, 1026-1037.
- Calvo, J., Johnston, I.A. 1992. Influence of rearing temperature on the distribution of muscle fibre types in the turbot *Scophthalmus maximus* at metamorphosis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161, 45-55.
- Carpenè, E., Veggetti, A. 1981. Increase in muscle fibers in the lateralis muscle (white portion) of Mugilidae (Pisces, Teleostei). *Experientia* 37, 191-193.
- Champion, D.R. 1984. The muscle satellite cells: A review. *Int Rev. Cytol.*, 87, 225-251.
- Dal Pai, V., Dal Pai Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R. 2000. Morphological, Histochemical and Morphometric Study of the Myotomal Muscle Tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887): Serrasalminae, Characidae, Teleostei. *Anatomia Histologia Embriologia*, 29, 283-289.
- Foley, J., Ton, T., Maropot, R., Butterworth, B., Goldsworthy, T.L. 1993. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environmental Health Perspectives*, 101(suppl 5), 199-206.

- Galloway, T.F., Kjorsvik, E., Kryvi, H. 1999. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. *J. Exp Biol.*, 202, 2111-2120.
- Gibson, S., Johnston, I. A. 1995. Temperature and development in larvae of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.*, 124, 17-25.
- Grizzle, J.M., Rogers, W.A. 1979. Anatomy and histology of the channel cat fish. Opelika: *Albion University Agricultural Experiment Station*, 94.
- Hsu, S.M., Raine, I., Fanger, H. 1981. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase Technique. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577-580.
- Johnston, I.A. 1981. Structure and function of fish muscle. In: *Vertebrate Locomotion*. Day, M.H., ed. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 48, 71-113.
- Johnston, I. A. 1993. Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae. *Mar. Biol.*, 116, 369-379.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177, 99-115.
- Johnston, I.A., McLay, H.A. 1997. Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Can. Journal. Zool.*, 75, 64-74.
- Johnston, I.A., Cole, N.J., Abercromby, M., Vieira, V.L.A. 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring (*Clupea harengus*). *J. Exp. Biol.*, 201, 623-646.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110A, 3-20.
- Matschack, T.W., Stickland, N.C., Crook, A.R., Hopcroft, T. 1995. Is physiological hypoxia the driving force behind temperature effects on muscle development in embryonic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Differentiation* 59, 71-77.
- Matschack, T.W., Stickland, N.C., Mason, P.S., Crook, A.R. 1997. Oxygen availability and temperature affect embryonic muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Differentiation*, 61, 229-235.
- Mauro, A. 1961. Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493-495.

- Moksness, E., Rosenlund, G., Lie, O. 1995. Effect of fish meal quality on growth of juvenile wolfish. *Anahichas lupus* L. *Aquaculture Research* 26, 109-115.
- Olson, E.N. 1992. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.*, 154, 261-272.
- Ramírez-Zarzosa, G., Gill, F., Ortega, A., Garcia-Alcaráz, A., Abellán, E., Vázquez, J.M., López-Albors, O., Arencibia, A., Moreno, F. 1995. The larval development of lateral musculature in gilthead sea bream *Sparatus aurata* and sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell tissue Research*, 280, 217-224.
- Rowlerson, A., Veggetti, A. 2001. Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. In: Muscle Development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, 18, 103-140.
- Rowlerson, A., Scapolo, P. A., Mascarello, F., Carpenè, E., Veggetti, A. 1985. Comparative study of myosin present in the lateral muscle of some fish species variations in myosin isoforms and their distribution in the pink and white muscle. *J. Muscle Res. and Cell Motil*, 6, 601-640.
- Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. 1995. The Myo D family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays*, 17, 203-209.
- Scapolo, P.A., Veggetti, A., Mascarello, F., Romanello, M.G. 1988. Developmental transitions of myosin isoforms and organization of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embriol.*, 178, 287-295.
- Stickland, N.C. 1983. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Anat.*, 137, 323-333.
- Stickland, N. C., White, R. N., Mescall, P. E., Crook, A. R., Thorpe, J. E. 1988. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Anat. Embryol.*, 178, 253-258.
- Stoiber, W., Sangër, A.M. 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. *Anat. Embryol.*, 194, 569-579.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A. 1990. Hyperplasic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.). An ultrastructural and morfometric study. *Anat. Embryol.*, 182, 1-10.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A., 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. *Anat. Embryol.*, 187, 353-361.

- Veggetti, A., Rowleron, A., Radaelli, G., Arrighi, S., Domeneghini, C. 1999. Post-hatching development of the gut and lateral muscle in the sole. *J. Fish Biology*, 55 (Suppl. A), 44-65.
- Vieira, V.L.A., Johnston, I.A. 1992. Influence of the temperature on muscle fiber development in larvae of the herring *Clupea harengus*. *Mar. Biol.*, 112, 333-341.
- Vieira, V.L.A., Johnston, I.A. 1996. Muscle development in the tambaqui, an important Amazonian food fish. *J. Fish Biol.*, 49, 842-852.
- Vieira, V.L.A., Johnston, I.A. 1999. Temperature and neuromuscular development in the tambaqui, *Colossoma macropomum*. *J. Fish Biol.*, 55 (suplement A), 66-83.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. 1984. Growth dynamics of white myotomal muscle fibers in the bluntnose minor, *Pimaphales notatus* Rafinesque and comparison with rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 25, 13-24.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. 1987. The Biology of Fish Growth. *Academic Press*, London.
- Wilkes, D., Xie, S.Q., Stickland, N.C., Alami-Durante, H., Kentouri, M., Sterioti, A., Koumoundouros, G., Fauconneau, B., Goldspink, G. 2001. Temperature and myogenic factor transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Bicentrarchus labrax*). *The J. of experimental Biol.*, 204, 2763-2771.

Histoquímica e ultraestrutura do tecido muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases iniciais do desenvolvimento, após diferentes temperaturas de incubação.

Jeane Marlene Fogaça de Assis¹, Cláudio Ângelo Agostinho² e Maeli Dal Pai-Silva³

¹Departamento de Biologia Celular – IB – UNICAMP – Campinas - SP

² Departamento de Produção e Exploração Animal – FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

² Departamento de Morfologia – IBB – UNESP – Botucatu - SP

Endereço para correspondência:

Departamento de Morfologia
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP
Distrito de Rubião Júnior, s/n
CEP: 18 618 000
Email: dpsilva@ibb.unesp.br
Tel: (14) 6802 6264

Resumo

Esse estudo teve como objetivo avaliar as características histoquímicas e ultraestruturais do tecido muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) durante as fases iniciais do desenvolvimento, após a variação da temperatura de incubação. Os ovos do pacu foram incubados em três temperaturas: 25°C, 27°C e 29°C. Após cinco dias da eclosão as larvas foram transferidas para caixas individuais abastecidas com água corrente em temperatura ambiente (25 a 28°C). Na eclosão e com 5, 25 e 60 dias, amostras de músculo estriado esquelético do pacu foram congelados em nitrogênio líquido ou foram fixadas em paraformaldeído a 4% ou glutaraldeído a 2,5% para análises: morfológica (HE), histoquímica (NADH-TR e m-ATPase, pH ácido e alcalino) e ultraestrutural.

Na eclosão observou-se uma monocamada de células colunares superficiais envolvendo várias camadas de células com aspecto arredondado. A partir de 5 dias foram observadas duas populações distintas de fibras musculares distribuídas em compartimentos. O vermelho, localizado na região superficial, com fibras de metabolismo oxidativo e contração lenta e o branco, constituindo a maior parte da musculatura, formado por fibras com metabolismo glicolítico e contração rápida. O compartimento intermediário foi evidenciado 25 dias após a eclosão juntamente com as zonas de proliferação celular no ápice da região dorsal. Fibras do compartimento superficial localizadas mais internamente apresentaram uma intensidade de reação moderada para mATPase ácida e alcalina. As células que formam a musculatura vermelha e branca apresentaram características ultraestruturais distintas desde a eclosão. Foram observadas células com pouco citoplasma e núcleo grande entre as fibras musculares diferenciadas. Possivelmente, essas células representam mioblastos, responsáveis pelos processos de hipertrofia e hiperplasia durante o crescimento do tecido muscular. As características metabólicas, contráteis e ultraestruturais da musculatura dos peixes que eclodiram nas diferentes temperaturas foram semelhantes. No entanto o aparecimento de novas fibras formando o compartimento intermediário e as zonas de proliferação foram melhor evidenciada nos peixes que eclodiram a 29°C.

Palavras chaves: Músculo, histoquímica, ultraestrutura, temperatura e *Piaractus mesopotamicus*.

Introdução

A musculatura estriada esquelética da maioria dos peixes teleósteos compreende cerca 60% do total da massa corpórea. Suas fibras estão distribuídas formando os compartimentos vermelho, na região superficial, e o branco, na região mais profunda. Entre esses dois compartimentos, observa-se o compartimento intermediário (Johnston, 1981; Weatherley and Gill, 1987). A distribuição das fibras musculares nos compartimentos é variável entre as espécies, como também nos diferentes estágios de crescimento, estando relacionada com as propriedades fisiológicas desempenhadas durante as atividades de locomoção. Apresentam variações quanto às características morfológicas, bioquímicas, histoquímicas e imunohistoquímicas.

A maior parte da massa muscular dos peixes é constituída por musculatura branca. As fibras brancas são maiores apresentam poucas mitocôndrias, metabolismo glicolítico, contração rápida e as miofibrilas ocupam entre 75 a 95% do volume total da fibra (Sänger et al., 1990; Sängner, 1992). Esse tipo de fibra é utilizado durante a realização de movimentos bruscos como na captura de alimento (Driedze and Hochachka, 1976; Johnston, 1980). A musculatura vermelha aparece formando uma fina camada na região subdermal, mais desenvolvida na região do nervo da linha lateral, porém não ultrapassa 30% da área da musculatura total (Greer-Walker and Pull, 1975; Hoyle et al., 1986; Luther et al., 1995). As fibras desta musculatura normalmente são menores, apresentam muitas mitocôndrias, metabolismo aeróbico e contração lenta. São responsáveis pela realização de movimentos de sustentação e velocidade lenta de natação, como durante a migração (Driedze and Hochachka, 1976; Johnston, 1980). As características morfofisiológicas das fibras intermediárias estão entre as das fibras musculares brancas e vermelhas (Zhang et al., 1996; Sängner and Stoiber, 2001).

Nas primeiras fases do desenvolvimento, na maioria dos teleósteos, a musculatura branca está envolvida por uma monocamada de fibras vermelhas, pequenas, com características embrionárias, podendo ser mais diferenciada em algumas espécies (Talessara and Urfi, 1987). Posteriormente, ocorre o desenvolvimento da musculatura intermediária (Nag and Nursall, 1972). As pesquisas realizadas têm mostrado que as fibras musculares vermelhas e brancas originam-se de diferentes populações de mioblastos (Devoto et al., 1996; Blagden et al., 1997).

Como o músculo estriado esquelético é um tecido extremamente plástico, diferenças na temperatura de incubação dos ovos podem afetar a celularidade muscular, a composição das proteínas miofibrilares e as características morfofisiológicas das fibras musculares (Vieira and Johnston, 1992; Veggetti et al., 1993; Nathanailides et al., 1996). Conforme os estudos de Calvo and Johnston, (1992), alterações na temperatura de incubação podem modular as fibras musculares durante as várias fases do desenvolvimento, podendo influenciar a capacidade de movimentação, o crescimento somático e o tamanho final de determinada espécie.

Nesse estudo foram analisados os aspectos histoquímicos e ultraestruturais das fibras musculares estriadas esqueléticas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases iniciais do desenvolvimento após diferentes temperaturas de incubação dos ovos.

Material e Métodos

Obtenção dos peixes

Os peixes utilizados neste estudo foram obtidos após a fertilização dos gametas de 02 machos e de 03 fêmeas. A reprodução foi realizada no Setor de Piscicultura da FMVZ, Unesp–Campus de Botucatu. Após a fertilização, os ovos foram divididos em volumes iguais e colocados em incubadoras previamente preparadas e mantidas nas temperaturas de 25 °C, 27°C e 29°C. Os tratamentos foram realizados em triplicata. A temperatura foi controlada com variação de $\pm 0,5^\circ\text{C}$. O pH ($6,65 \pm 0,2$) e o oxigênio ($6,7 \text{ mmHg} \pm 0,9$) da água foram monitorados periodicamente. Os peixes foram mantidos neste ambiente até cinco dias após a eclosão, quando ocorre a abertura da boca e o enchimento da bexiga natatória.

Os peixes provenientes de cada tratamento foram transferidos para caixas individuais de cimento amianto com capacidade de 500L abastecidas com água corrente proveniente de uma mina, em temperatura ambiente (25 °C a 28°C). A partir da abertura da boca os peixes foram alimentados com artemia (Cistos de *Artemia sp*, INVE) até o décimo quinto dia de vida e a partir desse período receberam ração farelada com 40% de proteína bruta. Exemplos de pacu foram coletados na eclosão e aos 5, 25 e 60 dias após a eclosão.

Microscopia de luz

Os exemplares de pacu provenientes de todas as coletas foram sacrificados mediante anestesia por MS-222 (Sigma), fixados em paraformaldeído a 4% (Bancroft and Stevens, 1990), processados e embebidos em Historresina (Kit Historesin, Leica). Cortes histológicos com 3 μm de espessura, obtidos transversalmente ao corpo do animal, na região da nadadeira dorsal, foram submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina (Behmer et al., 1976).

Amostras de músculo dos peixes aos 5, 25, 60 dias foram congeladas em n-hexana (Dinâmica) a -70°C , resfriada em nitrogênio líquido a -190°C . Quando a amostra era muito pequena, foi envolvida em outro tecido (fígado ou músculo de rato) antes da congelação para facilitar a microtomia. Cortes histológicos com 9 μm , obtidos em criostato (-20°C) foram

submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina (Behmer et al., 1976) para a avaliação do padrão morfológico das fibras musculares, às reações NADH-TR, para a avaliação do metabolismo oxidativo ou glicolítico e mATPase com pré-incubação ácida (pH 4,4-4,6) e alcalina (pH 10,4-10,6) para a avaliação das características contráteis, lenta ou rápida, das fibras musculares (Dubowitz and Brooke, 1973).

Microscopia eletrônica

Também foram coletadas amostras de músculos dos peixes na eclosão, 5, 25 e 60 dias, foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato, pH 7,4. Posteriormente, o material foi pós fixado em tetróxido de ósmio a 1% seguindo-se a desidratação em acetona e inclusão em Araldite. Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados ao microscópio eletrônico de transmissão.

Resultados

Análise morfológica e histoquímica

A análise morfológica da musculatura estriada do pacu mostrou duas populações distintas de células na eclosão. Uma fina camada de células com aspecto colunar na região mais periférica, adjacente ao tegumento, recobrando várias camadas de células com formato arredondado na região interna. Esse padrão foi observado nos peixes que eclodiram nas três temperaturas (Fig. 1A).

Aos 5 dias, nas três temperaturas, foram observados dois compartimentos bem diferenciados. Superficialmente, adjacente ao tegumento, foram identificadas fibras pequenas, formando uma camada ao redor do corpo. As fibras internas, maiores e em maior número, formavam o compartimento profundo. A reação histoquímica NADH-TR mostrou as fibras pequenas localizadas na região superficial com reação variando de intensa a moderada, com o produto final da reação, a formazana, localizada em forma de grumos nas regiões subsarcolemal e central. No restante da musculatura, a reação variou de fraca a negativa, sendo mais intensa na periferia da fibra (Fig. 1B). A reação histoquímica mATPase, após pré incubação ácida e alcalina mostrou diferentes intensidades de reação na musculatura. Nas fibras pequenas, localizadas logo abaixo da derme, a reação foi intensa após pré-incubação ácida enquanto a maioria das fibras reagiu intensamente após a realização da reação em pH alcalino (Fig. 1C e 1D).

Aos 25 dias, nas três temperaturas, observou-se um espessamento da massa muscular epiaxial. Nesse período foi identificado o compartimento intermediário formado por fibras pequenas localizadas entre o superficial e o profundo, melhor evidenciado nos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C. Também foram identificadas áreas dorsais na região epiaxial, de tecido conjuntivo frouxo com grupos de fibras pequenas, mais desenvolvidas nos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C (Fig.2 A,C e E). O padrão das reações NADH-TR e mATPase nas fibras dos compartimentos superficial e profundo foi semelhante ao observado aos 5 dias. No entanto algumas fibras localizadas mais internamente no compartimento superficial, próximo ao septo transversal, reagiram de forma moderada para a mATPase, após pré-incubação ácida e alcalina (Fig. 3A e C). Nas fibras do compartimento intermediário a reação NADH-TR foi fraca, sendo mais intensa na região subsarcolemal (Fig.3E). Essas fibras reagiram intensamente após

pré-incubação alcalina e fracamente após pré-incubação ácida (Fig.3A e C). Nos grupos de fibras da região dorsal, as localizadas mais internamente em relação ao plano mediano do animal reagiram de maneira intensa para o NADH-TR e moderadamente para-ATPase em pH ácido e alcalino. As fibras localizadas mais periféricamente mostraram reação moderada à fraca para o NADH-TR, fraca para m-ATPase em pH ácido e forte para mATPase em pH alcalino (Fig. 2B,D e F).

Aos 60 dias, nas três temperaturas, o espessamento da massa muscular foi caracterizado pela presença de um maior número de fibras nos compartimentos superficial, intermediário e profundo e pelo aumento de fibras pequenas entre as fibras maiores do compartimento profundo. O padrão da reação NADH-TR nas fibras nos três compartimentos foi semelhante ao observado aos 25 dias. No compartimento superficial a maioria das fibras reagiu intensamente para a reação mATPase após pré-incubação ácida e não reagiu após pré-incubação alcalina. No entanto algumas fibras localizadas mais internamente, próximo ao septo transversal reagiram de forma moderada em pH alcalino. No compartimento profundo as fibras não reagiram após pré-incubação ácida. Após pré-incubação alcalina as fibras maiores reagiram intensamente e as menores moderadamente (Fig.3B, D e F). O padrão de distribuição e a atividade enzimática dos grupos de fibras da região dorsal foram semelhantes ao observado aos 25 dias. As fibras do compartimento intermediário reagiram moderadamente para reação NADH-TR e mATPase após pré-incubação ácida e alcalina (Fig.3B, D e F).

Análise ultraestrutural

A observação ultraestrutural da musculatura estriada do pacu foi similar nas temperaturas de incubação utilizadas. Na eclosão foram observadas fibras musculares indiferenciadas de aspecto colunar na região superficial e mais arredondadas na região profunda. As fibras apresentaram raras miofibrilas, mitocôndrias e muitos ribossomos. Entre as miofibrilas foram evidenciadas cisternas de retículo sarcoplasmático. O núcleo com cromatina frouxa e nucléolo evidente estava localizado na região mais interna da fibra. Entre as fibras musculares indiferenciadas foram observadas células com citoplasma apresentando muitos ribossomos, mitocôndrias e com núcleo frouxo.(Fig. 4A e B).

Aos 5 dias as fibras musculares mostraram muito mais miofibrilas no sarcoplasma. As fibras da camada superficial apresentaram-se menores, com aspecto cúbico ou achatado. Foram evidenciadas miofibrilas arranjadas de forma radial ocupando parte do sarcoplasma. Na maioria das fibras foram observadas áreas de sarcoplasma sem miofibrilas, com muitas mitocôndrias, ribossomas e retículo sarcoplasmático. Na musculatura profunda as fibras apresentaram-se maiores em relação às da camada superficial, com aspecto poligonal. Foram evidenciados vários grupos de miofibrilas preenchendo o sarcoplasma. Em cada grupo as miofibrilas estavam arranjadas de forma radial na periferia e poligonal no centro. Entre as miofibrilas, foram observadas algumas mitocôndrias e muitas cisternas de retículo sarcoplasmático (Fig. 3C e D).

Aos 25 dias, nas fibras da camada superficial foram observadas miofibrilas bem organizadas e mitocôndrias mais concentradas na região subsarcolemal e central. Na musculatura profunda observou-se fibras com miofibrilas bem organizadas ocupando quase todo sarcotoplasma, núcleos com cromatina descompactada na região periférica, poucas mitocôndrias e retículo sarcoplasmático bem desenvolvido e algumas fibras menores com áreas de sarcoplasma sem miofibrilas. Entre as fibras musculares, no endomísio, foram observadas células com pouco citoplasma e núcleo com cromatina relativamente denso (Fig. 3E).

Aos 60 dias, o padrão de organização das fibras musculares foi semelhante ao observado nos exemplares com 25 dias. No entanto, fibras menores com áreas de sarcoplasma sem miofilamentos foram freqüentes, principalmente na musculatura profunda (Fig. 3F).

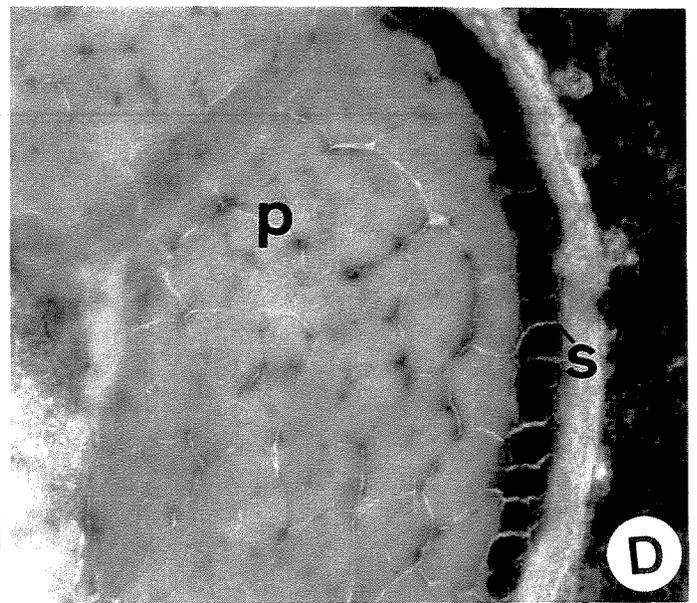
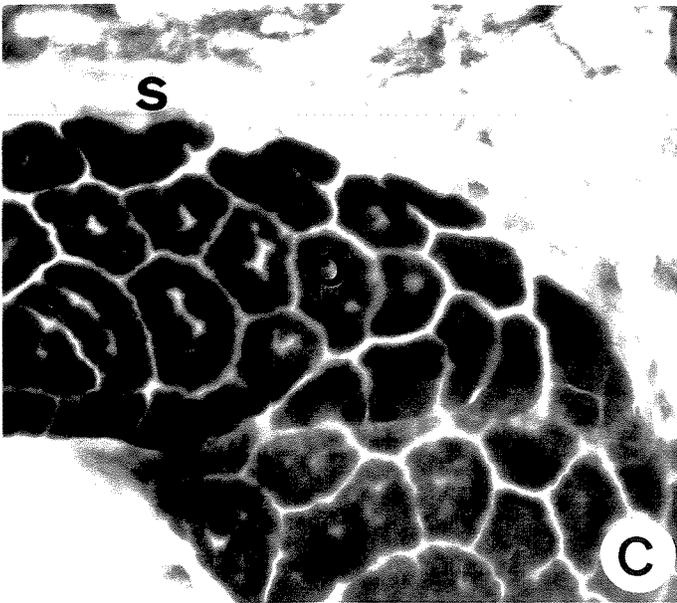
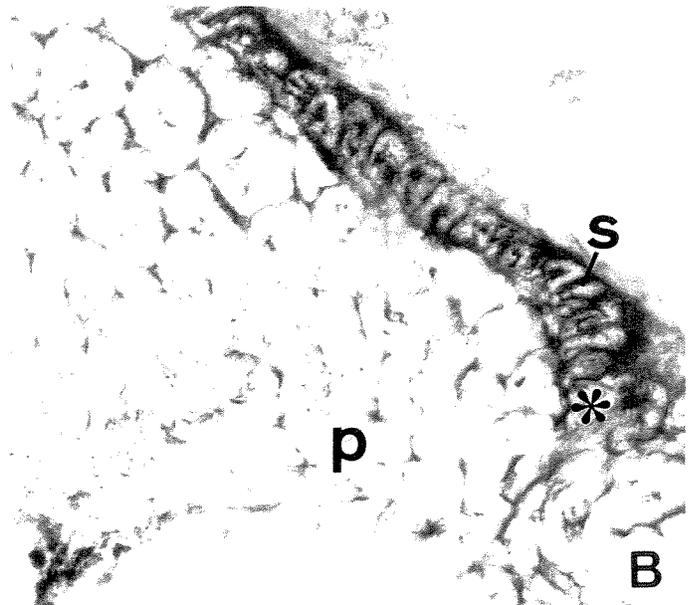
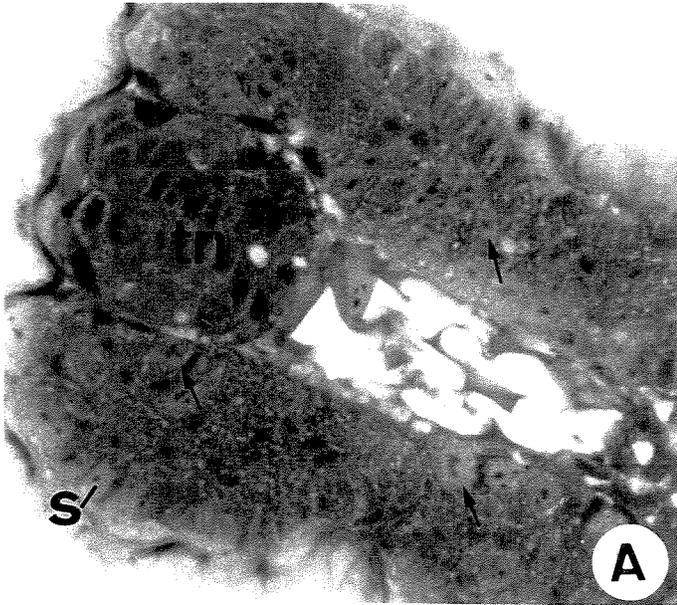
**Figura 1 – Fotomicrografias da musculatura estriada do pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) em corte transversal.**

A - Período da eclosão, temperatura de 29°C. Células com aspecto colunar na região superficial (s). Células de aspecto arredondado na região profunda (setas). Tecido nervoso (tn). HE, 125X.

B - Cinco dias após a eclosão, temperatura de 29°C. Fibras do compartimento superficial (s) com intensa reação NADH-TR. Fibras do compartimento profundo com fraca reação enzimática (p). Notar o aspecto triangular da distribuição das fibras no compartimento superficial (*). NADH-TR, 160X.

C - Cinco dias após a eclosão, temperatura de 25°C. Fibras do compartimento superficial com reação enzimática negativa (s). Fibras do compartimento profundo com intensa reação enzimática (p). mATPase, pH 10,6, 125X.

D - Cinco dias após a eclosão, temperatura de 27°C. Fibras do compartimento superficial com intensa reação enzimática (s). Fibras do compartimento profundo com reação enzimática negativa (p). mATPase, pH 4,4, 125X.

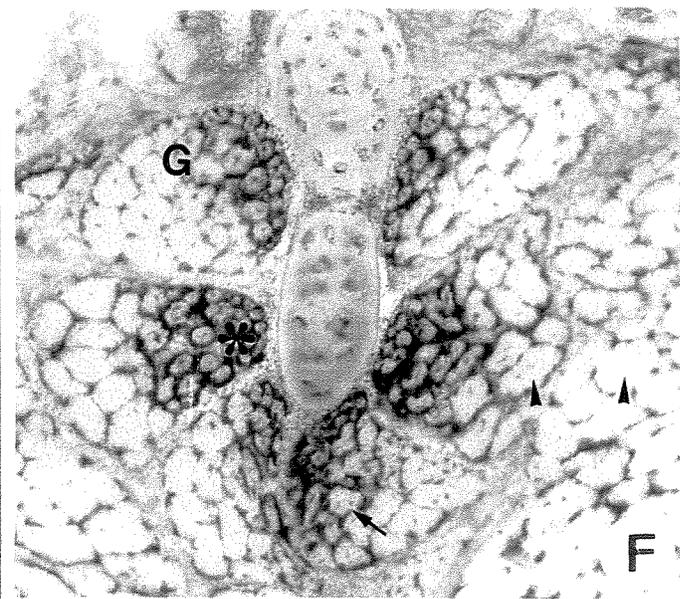
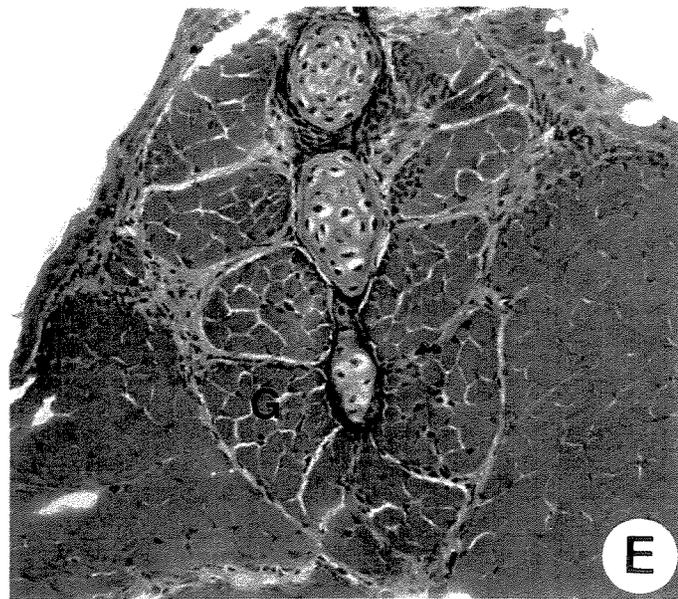
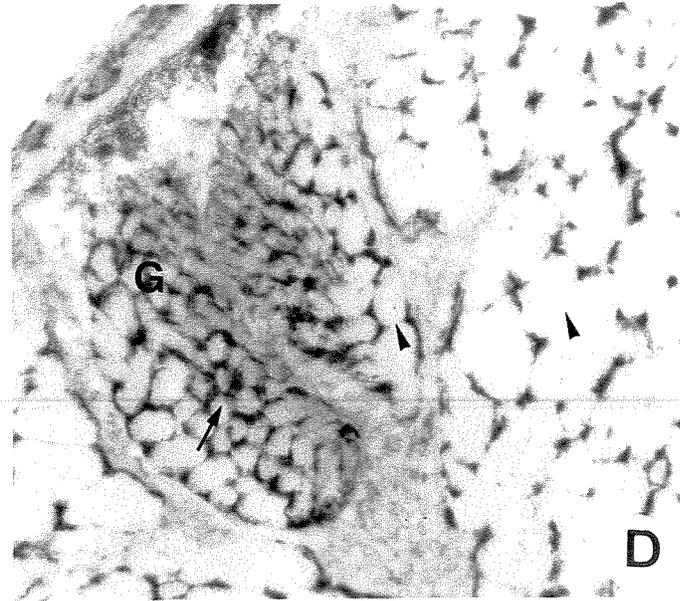
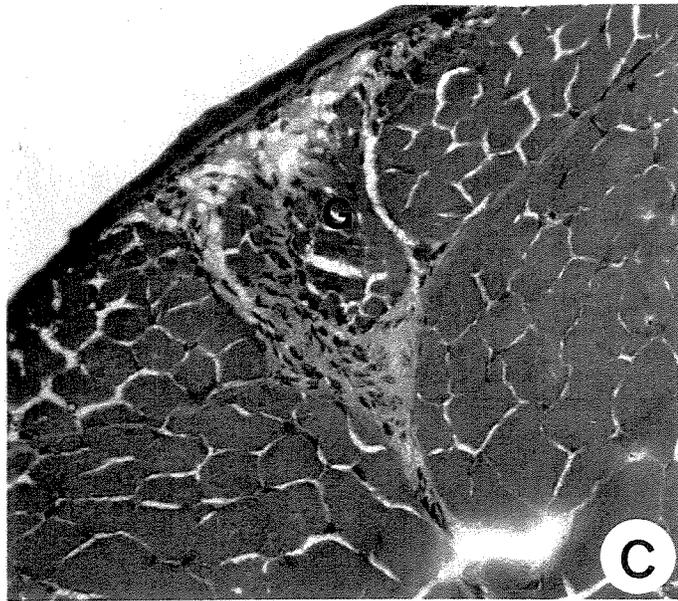
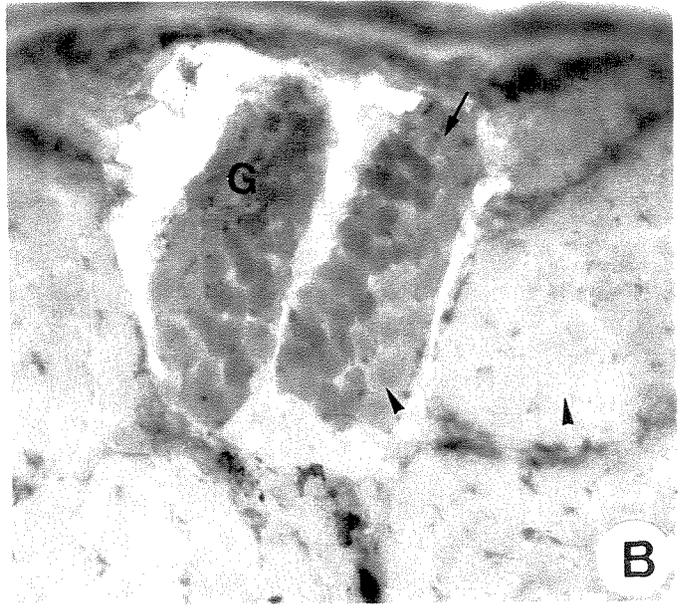
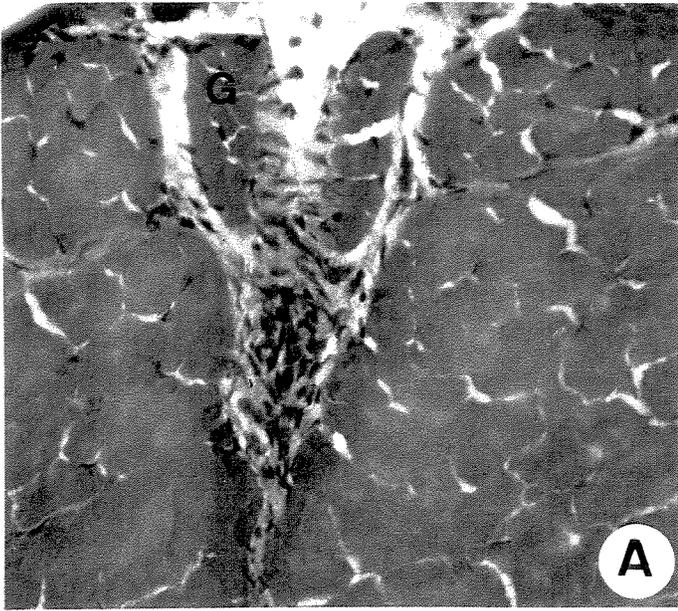


**Figura 2 – Fotomicrografias da musculatura estriada do pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) em corte transversal.**

A e B: Vinte e cinco dias após a eclosão, temperatura de 25°C. Fibras do compartimento profundo. Grupos de fibras no ápice da região dorsal (G). Fibras com reação enzimática moderada (seta) e fraca (cabeça de seta). A: HE, 125X. B: mATPase, pH 4,6, 160X.

C e D: Vinte e cinco dias após a eclosão, temperatura de 27°C. Fibras do compartimento profundo. Grupos de fibras no ápice da região dorsal (G). Fibras com reação enzimática moderada (seta) e fraca (cabeça de seta). C: HE, 80X. D: NADH-TR, 125X.

E e F: Vinte e cinco dias após a eclosão, temperatura de 29°C. Fibras do compartimento profundo. Grupos de fibras no ápice da região dorsal (G). Fibras com reação enzimática forte (*), moderada (seta) e fraca (cabeça de seta). C: HE, 80X. D: NADH-TR, 125X



**Figura 3 – Fotomicrografias da musculatura estriada do pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) em corte transversal.**

A: Vinte e cinco dias após a eclosão, temperatura de 25°C. Fibras do compartimento superficial com intensa reação enzimática (s). Fibras localizadas mais internamente no compartimento superficial (*). Fibras do compartimento profundo com reação enzimática negativa (p). Septo transversal (cabeça de seta). mATPase, pH 4,6, 80X.

B: Sessenta dias após a eclosão, temperatura de 25°C. Fibras localizadas mais internamente no compartimento superficial (*) e fibras do compartimento intermediário (seta) com moderada reação enzimática. Fibras maiores do compartimento profundo (p) com intensa reação enzimática e fibras pequenas com reação moderada (cabeça de seta). mATPase, pH 10,4, 80X.

C: Vinte e cinco dias após a eclosão, temperatura de 27°C. Fibras do compartimento superficial (s). Fibras localizadas mais internamente no compartimento superficial (*). Fibras do compartimento profundo (p). Tecido nervoso (Tn). mATPase, pH 10,4, 80X.

D: Sessenta dias após a eclosão, temperatura de 27°C. Fibras do compartimento superficial (s). Fibras do compartimento intermediário (seta). Fibras do compartimento profundo (p). mATPase, pH 4,6, 80X.

E: Vinte e cinco dias após a eclosão, temperatura de 29°C. Fibras do compartimento superficial com intensa reação enzimática (s). Fibras do compartimento profundo com reação enzimática fraca (p). Fibras pequenas do compartimento intermediário com reação enzimática moderada (cabeça de seta). NADH-TR, 100X.

F: Sessenta dias após a eclosão, temperatura de 29°C. Fibras localizadas mais internamente no compartimento superficial (*) e fibras do compartimento intermediário (i) com moderada reação enzimática. Fibras maiores do compartimento profundo (p) com intensa reação enzimática e fibras pequenas com reação moderada (cabeça de seta). mATPase, pH 10,4, 80X.

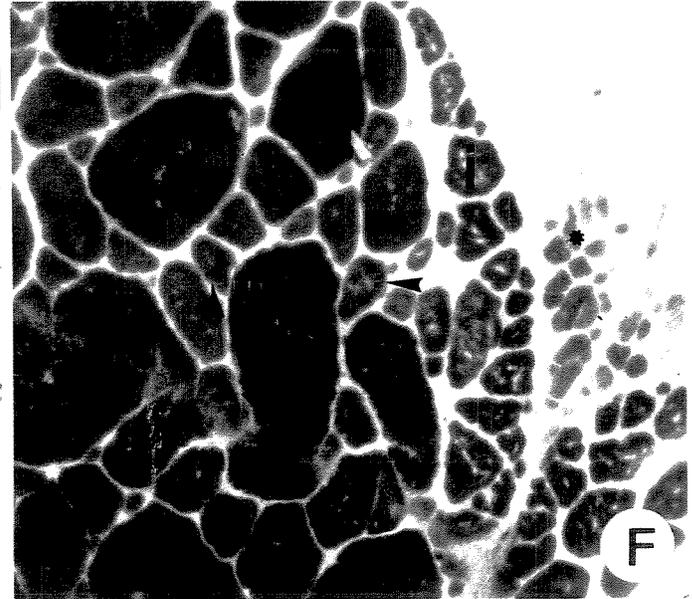
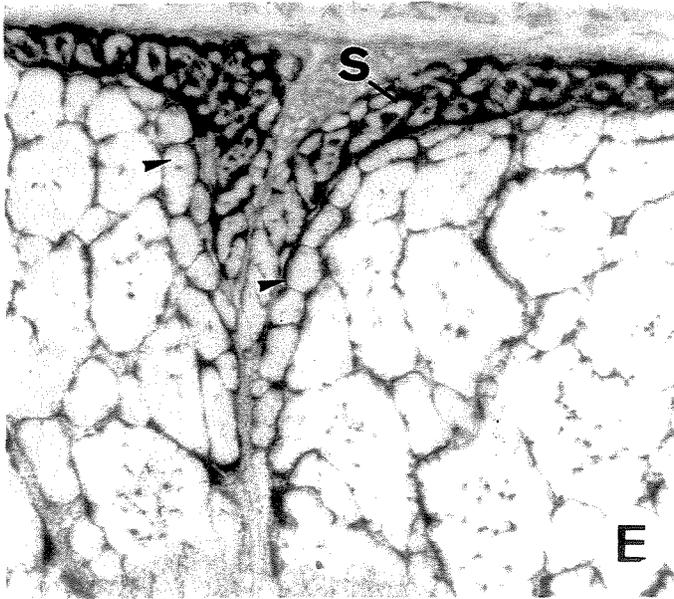
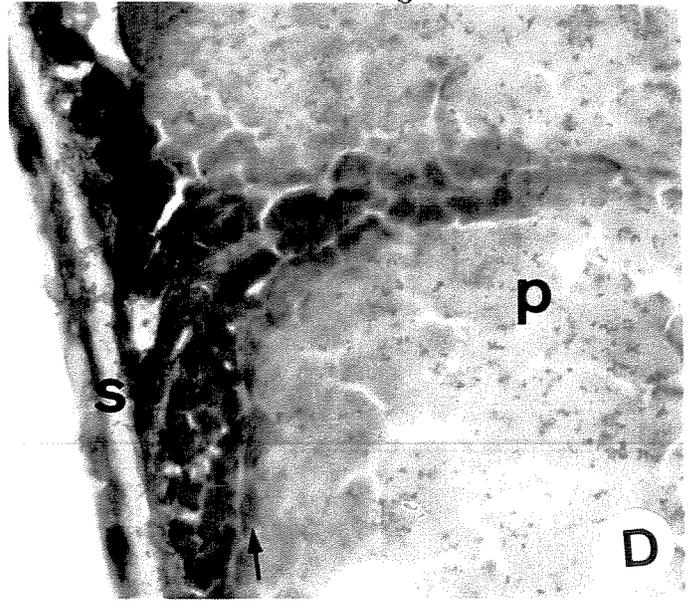
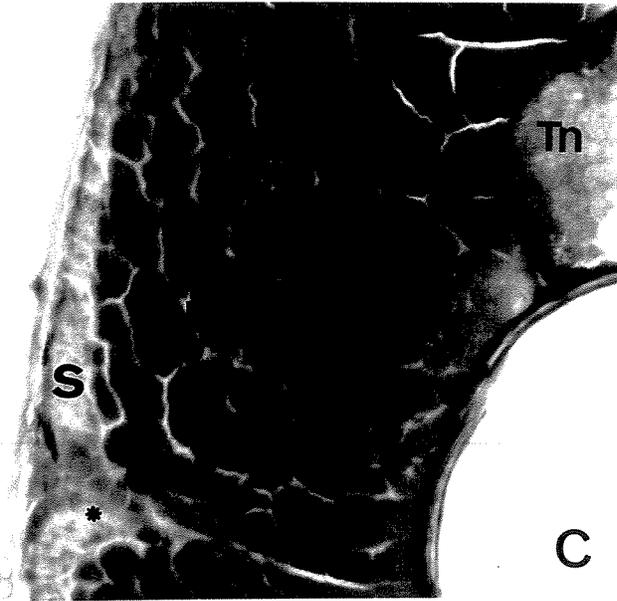
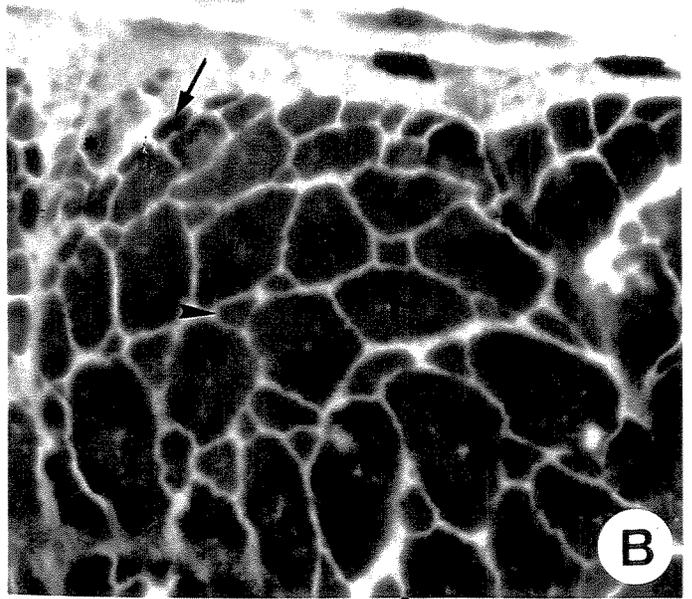
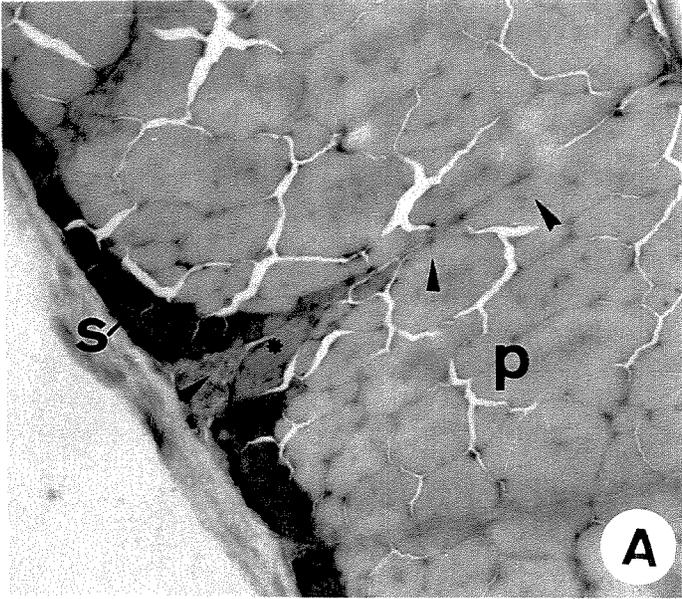


Figura 4 – Eletromicrografias da musculatura estriada do pacu

(*Piaractus mesopotamicus*) em corte transversal.

A – Período da eclosão: Presença de fibras musculares com aspecto colunar (*) na região superficial. Miofibrilas (mi) agrupadas na porção basal da célula. Mitocôndrias (M). Ribossomas (cabeça de seta). Reticulo sarcoplasmático (seta). Célula indiferenciada com núcleo frouxo (N) e ribossomos no citoplasma. 13 250X.

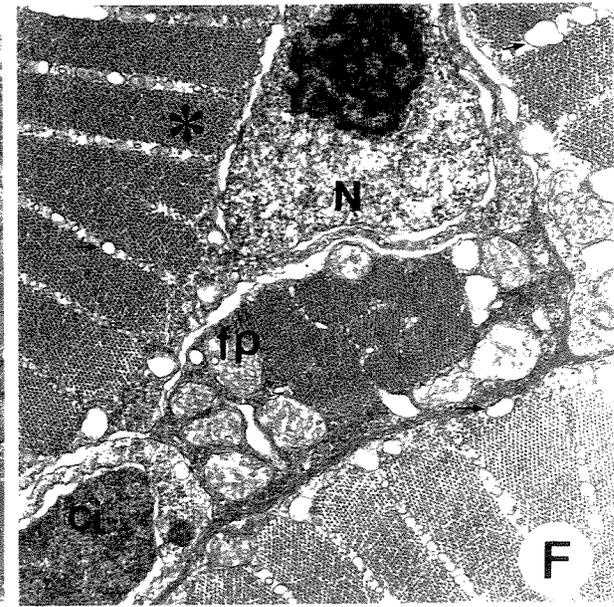
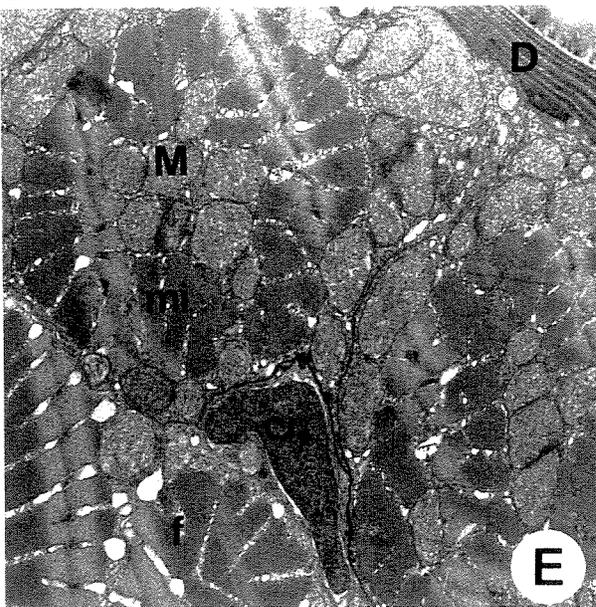
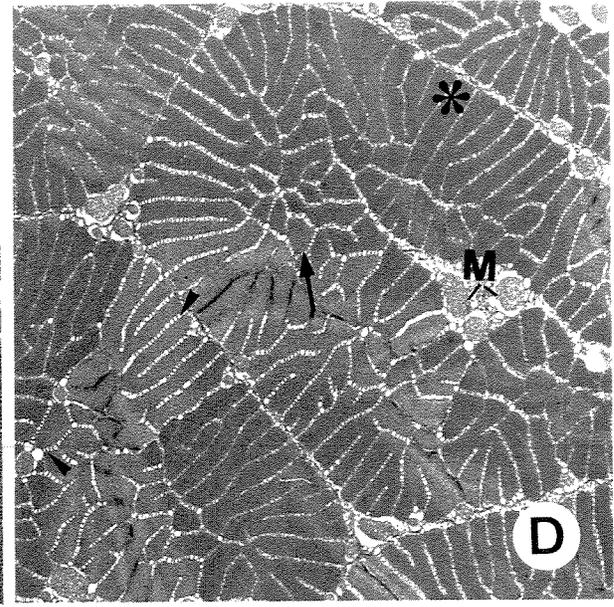
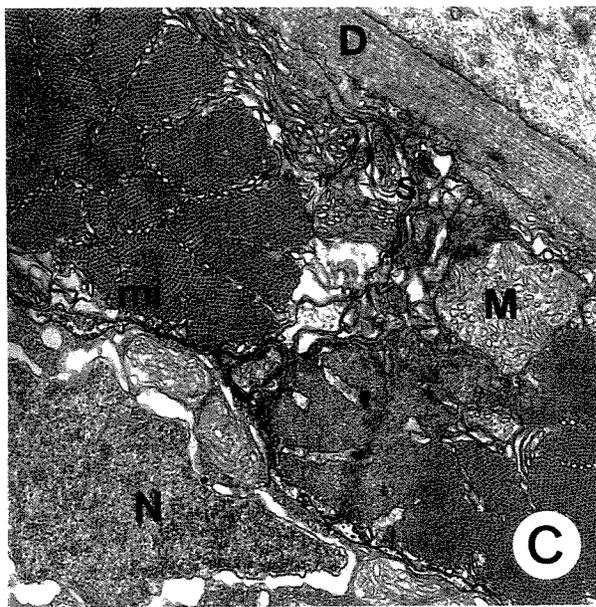
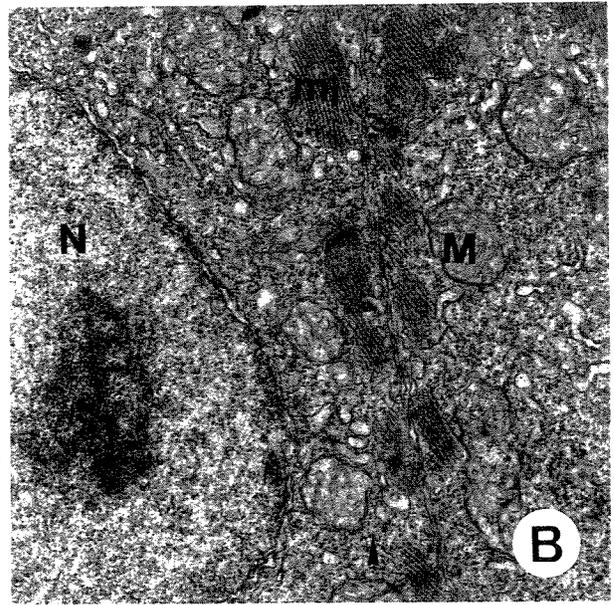
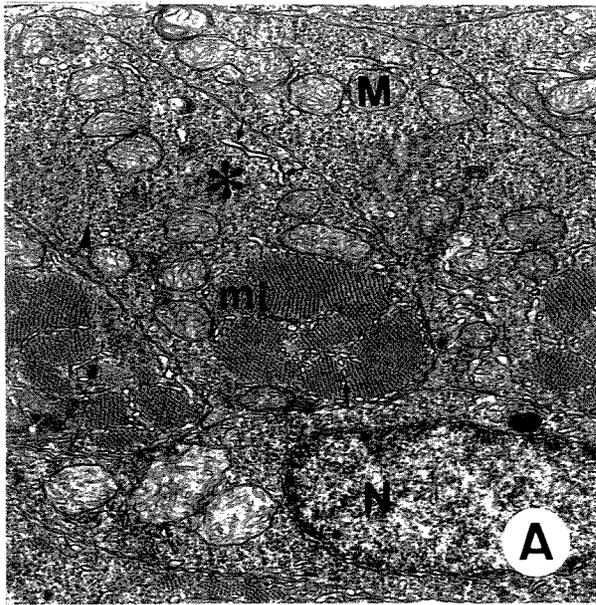
B – Exemplar do pacu na eclosão: Fibras musculares da região mais profunda. Pequenos grupos de miofibrilas na região periférica da fibra (mi). Mitocôndrias (M). Ribossomas (cabeça de seta). Núcleo frouxo com nucléolo evidente (N). 17 000X.

C – Exemplar do pacu com 5 dias. Fibras musculares do compartimento superficial (s) com miofibrilas (mi), mitocôndrias (M) e reticulo sarcoplasmático (seta). Célula indiferenciada com núcleo frouxo (N). Derme (D). 13 650X.

D - Exemplar do pacu com 5 dias. Fibras musculares do compartimento profundo. Sarcoplasma com grande quantidade de miofibrilas com aspecto radial na periferia (*) e poligonal no centro (seta). Mitocôndrias (M). Reticulo sarcoplasmático (cabeça de seta). 4225X.

E – Exemplar do pacu com 25 dias. Fibras do compartimento superficial com miofibrilas (mi) e mitocôndrias (M) mais concentradas na região subsarcolemal e central. Fibra pequena do compartimento intermediário (f). Célula indiferenciada com núcleo relativamente denso (ci). Derme (D). 5 750X.

F - Exemplar do pacu com 60 dias. Fibras do compartimento profundo com miofibrilas organizadas em forma de raios (*). Reticulo sarcoplasmático (seta). Núcleo da fibra com nucléolo evidente, em posição periférica (N). Fibra pequena (fp) entre as fibras maiores. Célula indiferenciada, com núcleo relativamente denso (ci). 13 250X.



Discussão

O padrão de distribuição das fibras da musculatura estriada do pacu, nas três temperaturas de incubação, foi semelhante ao observado na maioria das espécies de peixes (Scapolo et al., 1988; Veggetti et al., 1993; Galloway et al., 1999). Desde a eclosão, foram observadas duas camadas distintas de fibras indiferenciadas e 5 dias após a eclosão, a musculatura estriada já estava distribuída em dois compartimentos distintos: o superficial formado por uma monocamada de fibras pequenas, de aspecto colunar, e uma massa predominante, com várias camadas de fibras maiores, formando o compartimento profundo.

Com base nas reações histoquímicas utilizadas, com 5 dias após a eclosão, as fibras da monocamada na região subdermal, reagiram intensamente após a reação para a enzima NADH-TR e mATPase após pré incubação em pH ácido, revelando assim um metabolismo oxidativo e contração lenta. Essas fibras constituem a musculatura vermelha. As demais fibras reagiram fracamente para a enzima NADH-TR e fortemente para a mATPase, após pré incubação em pH alcalino, revelando um metabolismo glicolítico e contração rápida, constituindo a musculatura branca. Resultados semelhantes também foram obtidos por Scapolo et al. (1988) e Veggetti et al. (1990, 1993). Por outro lado, Ramirez-Zarzosa et al. (1995), analisando a musculatura estriada na espécie *Dicentrarchus labrax*, na eclosão, diferenciaram duas populações de fibras, sendo as vermelhas, álcali e ácido estável e as brancas, álcali estável e ácido lábil. As células precursoras das fibras vermelhas e brancas também foram evidenciadas desde a eclosão pela análise à microscopia de luz e eletrônica (Galloway et al., 1995, 1999).

O padrão de distribuição das fibras nos compartimentos pode apresentar variações durante o crescimento dependendo da espécie considerada e está relacionado com o tipo de atividade desenvolvida durante os movimentos para a locomoção (Johnston, 1999; Veggetti et al., 1999). Assim, na espécie *Gasterosteus aculeatus* L., não foram observadas fibras musculares vermelhas (Kilarsky and Kozłowska, 1983; te Kronnie et al., 1983) e no *Synbranchus marmoratus*, grupos de fibras vermelhas foram encontradas na região profunda da musculatura branca (Dal Pai-Silva et al., 1995). No entanto, a proporção da musculatura vermelha nos peixes nunca ultrapassa 30% do total da musculatura (Greer-Walker, 1975; Luther et al., 1996). As fibras da musculatura branca são responsáveis pelas atividades bruscas de locomoção, como na fuga de predadores e captura de presa, utilizando o metabolismo glicolítico enquanto as fibras da musculatura

vermelha estão envolvidas nos movimentos lentos, utilizando o metabolismo oxidativo (Akster et al., 1995; Johnston, 1999).

No pacu, embora não realizamos as reações histoquímicas NADH e ATPase na eclosão, a análise ultraestrutural mostrou um maior número de mitocôndrias nas células colunares da monocamada superficial, indicando um metabolismo oxidativo característico das fibras vermelhas. As células localizadas mais internamente apresentaram menor número de mitocôndrias, indicando um metabolismo glicolítico, característico das fibras brancas, padrão observado nas fases subseqüentes.

A atividade enzimática das fibras musculares, considerando-se as primeiras fases de desenvolvimento é muito variável dependendo da espécie analisada. Conforme os estudos realizados por Brooks et al. (1995), foi observada no curimatã-pacú uma diminuição na atividade oxidativa nas fibras da musculatura estriada, considerando-se os primeiros 15 dias de desenvolvimento. No entanto, nas fibras da musculatura vermelha a densidade mitocondrial foi maior quando comparada com a das fibras da musculatura branca. No nosso estudo, a intensidade da reação NADH-TR, que revela o metabolismo, foi mais acentuada nas fibras vermelhas, considerando-se os períodos estudados e a temperatura de incubação.

As fibras da musculatura intermediária apresentam características intermediárias entre as fibras vermelhas e brancas, e com base nas suas características histoquímicas e fisiológicas são caracterizadas como de contração rápida e com metabolismo glicolítico e oxidativo, podendo ser recrutadas para atividades de sustentação e em movimentos rápidos (Akster et al., 1995; Johnston, 1997; Johnston, 1999). Essas fibras foram caracterizadas no nosso estudo, aos 25 dias, nos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C.

A realização da reação mATPase após pré-incubação ácida e alcalina permite avaliar as características contráteis lenta e rápida das fibras musculares. As fibras de contração lenta “slow” reagem positivamente após pré-incubação ácida e as fibras de contração rápida “fast” reagem positivamente após pré-incubação alcalina. No entanto, os estudos têm mostrado diferenças quanto à intensidade da reação, utilizando-se pequenas variações no pH do meio de pré-incubação, em músculos de diferentes espécies animais. Por outro lado, embora esse método seja extremamente sensível, as diferenças quanto à intensidade da reação podem ser decorrentes da variação das isoformas de miosina presentes nas fibras musculares, mais especificamente, da variação da miosina de cadeia pesada. São conhecidas várias isoformas de miosina de cadeia

pesada, entre as quais, a embrionária, neonatal, fast, slow, que podem ser avaliadas e utilizadas como um marcador para a determinação fenotípica das fibras durante o crescimento, regeneração e adaptação muscular (Goldspink et al., 2001). Por outro lado, as fibras podem co-expressar mais de uma isoforma da miosina e assim, para melhor identificação podem ser utilizadas reações imunohistoquímicas utilizando-se anticorpos específicos para as miosinas (Veggetti et al., 1993) ou a análise bioquímica por eletroforese (Staron, 1991).

No nosso estudo, na realização da reação mATPase, o pH do meio de pré-incubação ácida variou de 4,4 a 4,6, e a alcalina de 10,4 a 10,6. É possível que essa variação esteja relacionada à mudança na expressão das isoformas de miosina que ocorreu durante o período de crescimento analisado (Scapolo et al., 1988; Brooks and Johnston, 1993; Veggetti et al., 1993; Mascarello et al., 1995).

Com 25 e 60 dias, a variação na intensidade da reação mATPase foi mais evidente. Na musculatura vermelha, embora as fibras tenham reagido intensamente após a realização da reação em pH ácido, caracterizando a contração lenta, foi observado um grupo de fibras que reagiram também após pré-incubação alcalina, demonstrando que essas fibras podem estar co-expressando mais de uma isoforma de miosina de cadeia pesada, conforme demonstrado também por Scapolo et al. (1988) e Veggetti et al. (1993). Na musculatura branca, foram observadas duas populações de fibras após a realização da reação em pH alcalino; as fibras maiores, com intensa reação e as menores, com reação moderada. A diferença na intensidade da reação deve estar relacionada à diferença na isoforma da miosina que essas fibras estão expressando. Segundo Rowleson et al. (1985), a variação quanto ao tamanho das fibras e quanto à intensidade da reação caracteriza o padrão em mosaico, indicativo de crescimento hiperplásico, onde as fibras maiores estão expressando a miosina "fast" e as menores, que têm um diâmetro inferior a 25µm, provavelmente estão expressando a isoforma embrionária ou neonatal (Goldspink et al., 2001).

Os grupos de fibras localizados na região dorsal, evidenciados a partir de 25 dias da eclosão, representam as zonas germinais de proliferação celular, melhor evidenciadas na musculatura dos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C. A intensidade variável das reações enzimáticas NADH e mATPase demonstra a presença de fibras em vários estágios de diferenciação, caracterizando o crescimento hiperplásico da musculatura.

No pacu, a análise ultraestrutural das fibras menores que mostrou poucas miofibrilas, organizadas de forma radial, no sarcoplasma, que caracteriza uma fibra indiferenciada

(Rowlerson et al., 1985). As fibras maiores apresentaram miofibrilas bem organizadas, exibindo um aspecto radial na região periférica da fibra e assumindo aspecto poligonal na região central, características mais freqüentes em fibras musculares diferenciadas (Sanger and Stoiber, 2001).

Em todas as fases analisadas foram observadas células com pouco citoplasma e núcleo grande, no interstício, entre as fibras musculares. Possivelmente, essas células representam mioblastos indiferenciados ou células mio-satélites (Veggetti et al., 1990; Johnston, 1999), responsáveis pelos processos de hipertrofia e hiperplasia das fibras durante o crescimento do tecido muscular. Durante a embriogênese das fibras musculares, alguns mioblastos não se fundem, permanecendo como células indiferenciadas no tecido muscular. Esse tipo celular é referido pelos pesquisadores, como mioblasto indiferenciado, mioblasto persistente, precursor miogênico ou célula mio-satélite (Johnston et al., 1998). As células mio-satélites dos mamíferos estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática (Campion, 1984; Koumans and Akster, 1995). No entanto em peixes esses precursores miogênicos podem ser encontrados também no tecido conjuntivo do endomísio, nas fases iniciais do desenvolvimento (Johnston, 1993; Koumans and Akster, 1995; Stoiber and Sanger, 1996).

Esse estudo demonstra que desde a eclosão as células musculares possuem características morfológicas bem definidas e a temperatura de incubação não alterou as características histoquímicas e ultraestruturais das fibras musculares durante as fases iniciais do desenvolvimento do pacu, porém a incubação dos ovos na temperatura de 29°C promoveu o aparecimento da musculatura intermediária e das zonas de proliferação celular mais proeminentes.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o importante apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 00/06177-0. Agradecemos aos funcionários, Denílson, Jarbas do Amaral, Sueli Cruz Michelim e Cristina Audi, pelos auxílios prestados.

Referência

- Akster, H.A., Verreth, J.A.J., Spierts, I.L.Y., Berbner, T., Schmidbauer, M., Osse, J.M.W. 1995. Muscle growth and swimming in larvae of *Clarias gariepinus* (Burchell). *ICES Marine Science Symposia*, 201, 45-50.
- Bancroft, J.D., Stevens, A. 1990. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd ed. *Churchill Livingstone*, New York, 704p
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. *Edart*, São Paulo. 239p.
- Blagden, C.S., Currie, P.D., Inghan, P.W., Hughes, S.M. 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes and Development* 11, 2163-2175.
- Brooks, S., Johnston, I. A. 1993. Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of myotomal muscle fiber types in the *Pleuronectes planessa*. *Mar. Biol.*, 117, 501-513.
- Brooks, S., Vieira, V.L.A., Johnston, I.A., Macheru, P. 1995. Muscle development in larvae of a fast growing tropical freshwater fish, the curimatã-pacu. *J. Fish Biol.*, 47, 1026-1037.
- Calvo, J., Johnston, I.A. 1992. Influence of rearing temperature on the distribution of muscle fibre types in the turbot *Scophthalmus maximus* at metamorphosis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161, 45-55.
- Champion, D.R. 1984. The muscle satellite cells: A review. *Int Rev. Cytol.*, 87, 225-251.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.L., Rodrigues, A.C. 1995. Histoquímica study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795. *Ann. Anat.*, 177,65-70.
- Devoto, S.H., Melançon, E.J.S., Westerfield, M. 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*, 122, 3371-3380.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W. 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am. J. Physiol.*, 230, 579-582.
- Dubowitz, V., Brooke, M. 1973. Muscle biopsy: A Modern Approach. London: *Saunders*, 475p.
- Galloway, T.F., Lein, I., Akster, H.A., Kjorsvik, E. 1995. Growth of swimming musculature during the yolk sac stage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) In larvi 95 Fish

and Shefish Larviculture (Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. Eds). *European Aquaculture Society Special Publication*, 24, 94-97.

- Galloway, T.F., Kjorsvik, E., Kryvi, H. 1999. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. *J. Exp Biol.*, 202, 2111-2120.
- Goldspink, G., Wilkes, D., Steven, E. 2001. Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth, and adaptation. In: Muscle Development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, London, 318p.
- Greer-Walker, M., Pull, G.A. 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.*, 7, 295-300.
- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H. 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muske kellunge, *E. masquinongy* (Mitchill). *J. Fish Biol.*, 28, 393-401.
- Johnston, I.A. 1980. Specialization of fish muscle. In: "Development and specializations of muscle. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. Symp. 7" Goldspink, D.F., ed., 123-148. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Johnston, I.A. 1981. Structure and function of fish muscle. In: Vertebrate Locomotion. Day, M.H., ed. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 48, 71-113.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177, 99-115.
- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177, 99-115.
- Johnston, I.A., McLay, H.A. 1997. Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Can. Journal. Zool.*, 75, 64-74.
- Johnston, I.A, Cole, N.J., Abercromby, M., Vieira, V.L.A. 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring (*Clupea harengus*). *J.Exp. Biol.*, 201, 623-646.
- Kilarski, W., Kozłowska, M. 1983. Ultrastructural characteristic of the teleostean muscle fibres and their nerve endings. The Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 97, 1022-1036.

- Koumans, J.T.M., Akster, H.A. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110A, 3-20.
- Luther, P.K., Munro, P.M.G., Squire, J.M. 1995. Muscle ultrastructure in the teleost fish. *Micron*, 26, 431-459.
- Mascarello, F., Rowleron, A., Radaelli, G., Scapolo, P.A., Veggetti, A. 1995. Differentiation and growth of muscle fibers in the fish *Sparus aurata* (L). I. Miosin expression and organisation of fibers types in lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 16, 213-222.
- Nag, A. C., Nursall, J. R. 1972. Histogenesis of white and red muscle fibres of trunk muscles of a fish *Salmo gairdneri*. *Cytobios*, 6, 227-46.
- Nathanailides, C., Lopes-Albors, O., Abellan, E., Vazquer, J.M., Tyler, D.D., Rowleron, A., Stickland, N.C. 1996. Muscle cellularity in relation to somatic growth in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). *Aquacult. Res.*, 27, 885-889.
- Ramíres-Zarzosa, G., Gill, F., Ortega, A., Garcia-Alcaráz, A., Abellán, E., Vázquez, J.M., López-Albors, O., Arencibia, A., Moreno, F. 1995. The larval development of lateral musculature in gilthead sea bream *Sparatus aurata* and sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell tissue Research*, 280, 217-224.
- Rowleron, A., Scapolo, P. A., Mascarello, F., Carpenè, E., Veggetti, A. 1985. Comparative study of myosin present in the lateral muscle of some fish species variations in myosin isoforms and their distribution in the pink and white muscle. *J. Muscle Res. and Cell Motil.* 6, 601-640.
- Sānger, A.M. 1992. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. *Environ. Biol. Fishes*, 33, 97-104
- Sānger, A.M., Stoiber, W. 2001. Muscle fiber diversity and plasticity. In: Muscle Development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, London, 318p.
- Sānger, A.M., Kim, Z.S., Adam, H. 1990. The fine structure of muscle fibres of roach, rutilus and effects of habitat and season. *J. Fish Biol.*, 36, 205-213.
- Scapolo, P.A., Veggetti, A., Mascarello, F., Romanello, M.G. 1988. Developmental transitions of myosin isoforms and organization of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embriol.*, 178, 287-295.
- Staron, R.S. 1991. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry*, 96, 21-24.

- Stoiber, W., Sangër, A.M. 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. *Anat. Embryol.*, 194, 569-579.
- Talessara, C. L., Urfi, A.J. 1987. Histophysiological study of muscle differentiation and growth in the common carp, *Cyprinus carpio var. communis*. *J. Fish Biol.*, 31, 45-54.
- te Kronnie, G., Tatarczuch, L., Van Raamsdonk, W., Kilarski, W. 1983. Muscle fibre types in the myotome of stickleback *Gasterosteus aculeatus* L.: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *J. Fish Biol.*, 22, 303-316.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A. 1990. Hyperplasic and hipertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.). An ultrastructural and morfometric study. *Anat. Embryol.*, 182, 1-10.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A., 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. *Anat. Embryol.*, 187, 353-361.
- Veggetti, A., Rowlerson, A., Radaelli, G., Arrighi, S., Domeneghini, C. 1999. Post-hatching development of the gut and lateral muscle in the sole. *J. Fish Biology*, 55 (Suppl. A), 44-65.
- Vieira, V.L.A., Johnston, I.A. 1992. Influence of the temperature on muscle fiber development in larvae of the herring *Clupea harengus*. *Mar. Biol.*, 112, 333-341.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. The Biology of Fish Growth. *Academic Press*, London, 1987.
- Zhang, G., Swank, D. M., Rome, L.C. 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *J. Morphol.*, 229, 71-81.

Conclusões

A musculatura estriada do pacu está distribuída em compartimentos. O vermelho e o branco estão bem definidos desde eclosão. O compartimento intermediário foi observado após 25 dias da eclosão. A temperatura de incubação não alterou a distribuição, as características metabólicas, contráteis e ultraestruturais das fibras musculares.

A hipertrofia é o principal processo de crescimento na fase inicial. A partir de 25 dias da eclosão, foram observadas as zonas de crescimento que contribuem para o crescimento hiperplásico, melhor evidenciadas nos peixes que eclodiram a 29°C.

A interação dos processos hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares dos peixes que eclodiram na temperatura de 29°C resultou no maior tamanho desses ao final do experimento.

Referências Gerais

- Akster, H.A., Verreth, J.A.J., Spierts, I.L.Y., Berbner, T., Schmidbauer, M., Osse, J.M.W. 1995. Muscle growth and swimming in larvae of *Clarias gariepinus* (Burchell). *ICES Marine Science Symposia*, 201, 45-50.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A. M., Bergot, P. 1997. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth raye. *J. Fish. Biol.*, 50, 1285-1302.
- Alexander, R. Mc, N. 1969. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 49, 263-290.
- Ashby, P.R., Princon-Raymond, M., Harris, A.J. 1993. Regulation of myogenesis in paralysed muscles in the mouse mutants peroneal muscular atrophy and muscular dysgenesis. *Dev. Biol.*, 156: 529-536.
- Assis, J.M.F., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M. 2002. Histoquímica e ultraestrutura do tecido muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) nas fases iniciais do desenvolvimento, após diferentes temperaturas de incubação. Tese em preparação.
- Bancroft, J.D., Stevens, A. 1990. Theory and Practice of Histological Techniques. 3rd ed. *Churchill Livingstone*, New York, 704p
- Barnabé, G. 1990. Rearing bass and gilthead bream. In: *Aquaculture*, 2 (ed. G. Barnabé), 647-696. *Ellis Horwood*. New York.
- Behmer, O.A., Tolosa, E.M.C., Freitas Neto, A.G. 1976. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. *Edart*, São Paulo. 239p.
- Blagden, C.S., Currie, P.D., Inghan, P.W., Hughes, S.M. 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes and Development*, 11, 2163-2175.
- Brooks, S., Johnston, I. A. 1993. Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of myotomal muscle fiber types in the *Pleuronectes planessa*. *Mar. Biol.*, 117, 501-513.
- Brooks, S., Vieira, V.L.A., Johnston, I.A., Macheru, P. 1995. Muscle development in larvae of a fast growing tropical freshwater fish, the curimatã-pacu. *J. Fish Biol.*, 47, 1026-1037.

- Calvo, J., Johnston, I.A. 1992. Influence of rearing temperature on the distribution of muscle fibre types in the turbot *Scophthalmus maximus* at metamorphosis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161, 45-55.
- Champion, D.R. 1984. The muscle satellite cells: A review. *Int Rev. Cytol.*, 87, 225-251.
- Carpenè, E., Veggetti, A. 1981. Increase in muscle fibers in the lateralis muscle (white portion) of Mugilidae (Pisces, Teleostei). *Experientia*, 37, 191-193.
- Carpenè, E., Scapolo, P.A., Mascarello, F., Veggetti, A., Rowleron, A. 1983. Influenza della temperatura sul ciclo iperplastico annuale del muscolo bianco dei Mugilidi. *Atti Aoc. Ital., Vet.*, 37, 117-118.
- Currie, P.D. Inghan, P.W. 2001. Introduction and Pattern of Embryonic Skeletal Muscle Cells in the Zebrafish. In: Muscle Development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, London, 318p.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.L., Rodrigues, A.C. 1995. Histoquimical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795. *Ann. Anat.*, 177, 65-70.
- Dal Pai, V., Dal Pai Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R. 2000. Morphological, Histochemical and Morphometric Study of the Myotomal Muscle Tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887): Serrasalminae, Characidae, Teleostei. *Anatomia Histologia Embriologia*, 29, 283-289.
- Devoto, S.H., Melançon, E.J.S., Westerfield, M., 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development*, 122, 3371-3380.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W. 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am. J. Physiol.*, 230, 579-582.
- Dubowitz, V., Brooke, M. 1973. Muscle biopsy: A Modern Approach. *Saunders*, London, 475p
- Egginton, S., Johnston, I.A. 1982. Muscle fibre differentiation and vascularization in the juvenile European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Cell Tissue Res.* 222, 563-577.
- Foley, J., Ton, T., Maropot, R., Butterworth, B., Goldsworthy, T.L. 1993. Comparison of proliferating cell nuclear antigen to tritiated thymidine as a marker of proliferating hepatocytes in rats. *Environmental Health Perspectives*, 101(suppl 5), 199-206.
- Galloway, T.F., Lein, I., Akster, H.A., Kjorsvik, E. 1995. Growth of swimming musculature during the yolk sac stage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) In larvi 95 Fish

- and Shefish Larviculture (Lavens, P., Jaspers, E., Roelants, I. Eds). *European Aquaculture Society Special Publication*, 24, 94-97.
- Galloway, T.F., Kjorsvik, E., Kryvi, H. 1999. Muscle growth in yolk-sac larvae of the Atlantic halibut as influenced by temperature in the egg and yolk-sac stage. *J. Fish Biol.*, 55 (Suppl. A), 26-43.
 - Gibson, S., Johnston, I. A., 1995. Temperature and development in larvae of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.*, 124, 17-25.
 - Goldspink, G., Wilkes, D., Steven, E. 2001. Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth, and adaptation. In: Muscle Development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, London, 318p.
 - Greer-Walker, M., Pull, G.A. 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.*, 7, 295-300.
 - Grizzle, J.M., Rogers, W.A. 1979. Anatomy and histology of the channel cat fish. Auburn University Agricultural Experiment Station, Opelika , 94p.
 - Higgins, P.J., Thorpe, J.E. 1990. Hyperplasia and hypertrophy in the growth of skeletal muscle in juvenile Atlantic salmon. *Salmo salar* L. *J. Fish Biol.* 37, 505-519.
 - Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H. 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickerel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muske kellunge, *E. masquinongy* (Mitchill). *J. Fish Biol.*, 28, 393-401.
 - Hsu, S.M., Raine, I., Fanger, H. 1981. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase Technique. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577-580.
 - Johnston, I.A. 1980. Specialization of fish muscle. In: "Development and specializations of muscle. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. Symp. 7" Goldspink, D.F., ed., 123-148. *Cambridge University Press*, Cambridge.
 - Johnston, I.A. 1981. Structure and function of fish muscle. In: Vertebrate Locomotion. Day, M.H., ed. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 48, 71-113.
 - Johnston, I. A. 1993. Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae. *Mar. Biol.* 116, 369-379.
 - Johnston, I.A. 1994. Development and plasticity of fish muscle with growth. *Bas. Appl. Myol.*, 4, 353-368.

- Johnston, I.A. 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture*, 177, 99-115.
- Johnston, I. A. 2001. Muscle developmental and growth. *Aquaculture*, 177, 99-115.
- Johnston, I.A., McLay, H.A. 1997. Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Can. Journal. Zool.*, 75, 64-74.
- Johnston, I.A., Vieira, V.L.A., Abercromby, M. 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring, *Clupea harengus*. *J. Exp. Biol.*, 198, 1389-1403.
- Johnston, I.A., Cole, N.J., Abercromby, M., Vieira, V.L.A. 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring (*Clupea harengus*). *J. Exp. Biol.*, 201, 623-646.
- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T., Kiessling, K.H. 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture*, 93, 335-356.
- Kilariski, W., Kozłowska, M. 1983. Ultrastructural characteristic of the teleostean muscle fibres and their nerve endings. The Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 97, 1022-1036.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A, 3-20.
- Luther, P.K., Munro, P.M.G., Squire, J.M. 1995. Muscle ultrastructure in the teleost fish. *Micron*, 26, 431-459.
- Mascarello, F., Romanello, M.G., Scapolo, P.A. 1986. Histochemical and immunohistochemical profile of pink muscle fibres in some teleostes. *Histochemistry*, 84, 251-255.
- Mascarello, F., Rowlerson, A., Radaelli, G., Scapolo, P.A., Veggetti, A. 1995. Differentiation and growth of muscle fibers in the fish *Sparus aurata* (L). I. Miosin expression and organisation of fibers types in lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 16
- Matschack, T.W., Stickland, N.C., Crook, A.R., Hopcroft, T. 1995. Is physiological hypoxia the driving force behind temperature effects on muscle development in embryonic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Differentiation*, 59, 71-77.

- Matschack, T.W., Stickland, N.C., Mason, P.S., Crook, A.R. 1997. Oxygen availability and temperature affect embryonic muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Differentiation*, 61, 229-235.
- Mauro, A. 1961. Satellite cells of skeletal muscle fibres. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 493-495.
- Moksness, E., Rosenlund, G., Lie, O. 1995. Effect of fish meal quality on growth of juvenile wolfish. *Anahichas lupus* L. *Aquaculture Reseach*, 26, 109-115.
- Molkentin, J.D., Olson, E.N. 1996. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6, 445-453.
- Nag, A. C., Nursall, J. R. 1972. Histogenesis of white and red muscle fibres of trunk muscles of a fish *Salmo gairdneri*. *Cytobios*, 6, 227-46.
- Nathanailides, C., Lopes-Albros, O., Abellan, E., Vazquer, J.M., Tyler, D.D., Rowlerson, A., Stickland, N.C. 1996. Muscle cellularity in relation to somatic growth in the European sea bass *Dicentaurus labrax* (L). *Aquacult. Res.*, 27, 885-889.
- Olson, E.N. 1992. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.*, 154, 261-272.
- Ramíres-Zarzosa, G., Gill, F., Ortega, A., Garcia-Alcaráz, A., Abellán, E., Vázquez, J.M., López-Albors, O., Arencibia, A., Moreno, F. 1995. The larval development of lateral musculature in gilthead sea bream *Sparatus aurata* and sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell tissue Research*, 280, 217-224.
- Rescan, P.Y., Collet, B., Ralliere, C., Cauty, C., Delande, J.M., Goldspink, G., Fauconneau, B. 2001. Red and white muscle development in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) as show by in situ hybridisation of fast and slow myosin heavy chain transcripts. *The J. of Experimental Biol.*, 204, 2097-2101.
- Romanello, M.G., Scapolo, P.A., Luprano, S., Mascarello, F. 1987. Post larval growth in the lateral white muscle of the eel, *Anguilla anguilla*. *J fish Biol.*, 30, 161-172.
- Rowlerson, A., Veggetti, A. 2001. Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth in Aquaculture Species. In: Muscle Development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, London, 318p.

- Rowlerson, A., Scapolo, P. A., Mascarello, F., Carpenè, E., Veggetti, A. 1985. Comparative study of myosin present in the lateral muscle of some fish species variations in myosin isoforms and their distribution in the pink and white muscle. *J. Muscle Res. and Cell Motil.*, 6, 601-640.
- Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. 1995. The Myo D family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays* 17, 203-209.
- Sānger, A.M. 1992. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. *Environ. Biol. Fishes*, 33, 97-104
- Sānger, A.M., Stoiber, W. 2001. Muscle fiber diversity and plasticity. In: Muscle Development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, London, 318p.
- Sānger, A.M., Kim, Z.S., Adam, H. 1990. The fine structure of muscle fibres of roach, rutilus and effects of habitat and season. *J. Fish Biol.*, 36, 205-213.
- Scapolo, P.A., Veggetti, A., Mascarello, F., Romanello, M.G. 1988. Developmental transitions of myosin isoforms and organization of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anat. Embriol.*, 178, 287-295.
- Staron, R.S. 1991. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers. *Histochemistry*, 96, 21-24.
- Stickland, N.C. 1983. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Anat.*, 137, 323-333.
- Stickland, N. C., White, R. N., Mescall, P. E., Crook, A. R., Thorpe, J. E. 1988. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Anat. Embryol.*, 178, 253-258.
- Stoiber, W., Sangēr, A.M. 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. *Anat. Embryol.*, 194, 569-579.
- Talessara, C. L., Urfi, A.J. 1987. Histophysiological study of muscle differentiation and growth in the common carp, *Cyprinus carpio* var. *communis*. *J. Fish Biol.*, 31, 45-54.
- te Kronnie, G., Tatarczuch, L., Van Raamsdonk, W., Kilarski, W. 1983. Muscle fibre types in the myotome of stickleback *Gasterosteus aculeatus* L.: a histochemical, immunohistochemical and ultrastructural study. *J. Fish Biol.*, 22, 303-316.
- Van Raamsdonk, W., Pool, C.W. 1978. Tekronie, G. Differentiation of muscle fibre type in the teleost *Brachydanio rerio*. *Anat. Embryol.*, 153, 137-155.

- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A. 1990. Hyperplasic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.). An ultrastructural and morfometric study. *Anat. Embryol.*, 182, 1-10.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapolo, P.A., Rowlerson, A., 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. *Anat. Embryol.*, 187, 353-361.
- Veggetti, A., Rowlerson, A., Radaelli, G., Arrighi, S., Domeneghini, C. 1999. Post-hatching development of the gut and lateral muscle in the sole. *J. Fish Biology*, 55 (Suppl. A), 44-65.
- Vieira, V.L.A., Johnston, I.A. 1992. Influence of the temperature on muscle fiber development in larvae of the herring *Clupea harengus*. *Mar. Biol.*, 112, 333-341.
- Vieira, V.L.A., Johnston, I.A. 1996. Muscle development in the tambaqui, an important Amazonian food fish. *J. Fish Biol.*, 49, 842-852.
- Vieira, V.L.A., Johnston, I.A. 1999. Temperature and neuromuscular development in the tambaqui, *Colossoma macropomum*. *J. Fish Biol.*, 55 (suplement A), 66-83.
- Watabe, S. 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differetiation durinr ontogeny in fish. *J. Fish Biol.*, 55 (Suppl. A), 1-18.
- Watabe, S. 2001. Myogenic Regulatory Factors. In: Muscle development and Growth, Johnston I.A. Ed. *Academic Press*, London, 318p.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. 1984. Growth dynamics of white myotomal muscle fibers in the bluntnose minor, *Pimaphales notatus* Rafinesque and comparison with rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 25, 13-24.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S. 1987. *The Biology of Fish Growth*. Academic Press, London.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S., Rogers, S.C. 1979. Growth dynamics of muscle fibers, dry weight and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Zool.*, 57, 2385-2392.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S., 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.
- Wilkes, D., Xie, S.Q., Stickland, N.C., Alami-Durante, H., Kentouri, M., Sterioti, A. Koumoundouros, G. Fauconneau, B., Goldspink, G. 2001. Temperature and myogenic factor

transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Bicentrarchus labrax*). *The J. of experimental Biol.*, 204, 2763-2771.

- Willemse, J.J. 1976. Characteristics of myotomal muscle fibers and their possible relation to growth rate in eels *Anguilla anguilla* (L) (*Pisces, Teleostei*). *Aquaculture*, 8, 251-258.
- Zhang, G., Swank, D. M., Rome, L.C. 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *J. Morphol.* 229, 71-81.