

1. Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a distribuição do colágeno e a atividade das metaloproteinases 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) no músculo estriado esquelético do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), durante as fases de crescimento juvenil e adulto. Amostras do músculo de peixes (juvenil e adulto) (n=5) foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Cortes histológicos (7 à 10µm) obtidos em criostato foram submetidos às colorações hematoxilina-eosina (HE), para a análise da morfologia geral e Picrossirius e Reticulina para avaliar as fibras do sistema colágeno; foi calculado o menor diâmetro de 450-500 fibras musculares em cada fase analisada, utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens. As fibras musculares foram agrupadas em 3 classes de diâmetro: <20, 20-50 e >50µm. Para a análise das MMP-2 e MMP-9, alíquotas (25µg de proteína muscular) foram submetidas à eletroforese em gelatina contendo SDS para zimografia. O músculo estriado esquelético do pacu (juvenil e adulto) estava organizado em compartimentos vermelho, intermediário e branco. A análise morfométrica das fibras musculares dos peixes no estágio juvenil mostrou a maioria das fibras musculares com diâmetro < 20µm, indicando um crescimento hiperplásico predominante e nos peixes adultos a maioria das fibras musculares apresentou diâmetro > 50µm, indicando crescimento hipertrófico predominante. A coloração de Picrossirius revelou um aumento de colágeno I, principalmente na musculatura vermelha dos peixes adultos. A coloração de Reticulina mostrou a presença de colágeno III no músculo esquelético em ambas as fases de crescimento e nos tipos de musculatura. Entretanto, o colágeno III foi mais abundante no músculo branco. A técnica de zimografia revelou bandas claras de atividade gelatinolítica com PM aproximadamente 93, 81, 64 e 57 kDa, que correspondem às formas de pró-enzima da MMP-9, enzima ativa da MMP-9, forma intermediária da MMP-2 e forma ativa da MMP-2, respectivamente, na musculatura vermelha e branca em ambas as fases de crescimento analisadas. Nos peixes da fase juvenil, tanto na musculatura vermelha como na branca, a atividade da MMP-2 foi mais intensa do que a da MMP-9. Entretanto, a atividade das duas formas da MMP-2 foi relativamente maior no músculo vermelho, mas sem atingir diferença estatisticamente significativa. Já a atividade das formas da MMP-9 foi maior na musculatura vermelha. Nos peixes da fase adulta, nas musculaturas vermelha e branca, a atividade da forma

intermediária da MMP-2 foi predominante, sendo estatisticamente mais elevada na musculatura vermelha, junto com a atividade da forma ativa da MMP-2, que foi encontrada exclusivamente neste músculo. Já em relação a MMP-9 foi observada atividade relevante da forma ativa somente no músculo vermelho. Comparando-se os mesmos tipos de musculaturas nas duas fases de crescimento, pode-se observar que a atividade das diferentes formas das duas enzimas foi significativamente maior na fase juvenil. Diferenças no padrão de crescimento e atividade muscular no pacu, influenciam na organização e conteúdo de colágeno e na atividade das MMPs. Essas características diferenciais podem contribuir para as diferenças de firmeza e maciez encontradas entre as musculaturas vermelha e branca, respectivamente.

2. Abstract

The aim of this study was to evaluate collagen composition and the MMP-2 and MMP-9 activity in skeletal muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during juvenile and adult growth phases. Muscle samples from Juvenile (J) and adult (A) fish (n=5) were collected and frozen in liquid nitrogen. Serial transverse sections (7 to 10 μ m) were cut with a cryostat and stained with Haematoxylin-eosin (HE) to determine the smaller diameters from 450-500 muscle fibers in each group. Muscle fibers were grouped into three classes: <20, 20-50, and >50 μ m. Sections were submitted to Picrosirius and Reticulin to evaluate collagen system fibers. For analysis of MMP-2 and MMP-9, aliquots (25 μ g protein) from muscle extracts were subjected to electrophoresis in gelatin-containing SDS-PAGE for zymography. Juvenile and adult pacu skeletal muscle was organized in red, white, and intermediate compartments. We only analyzed white and red compartments. Morphometric analysis of juvenile stage muscle fiber showed that most muscle fibers were <20 μ m diameter indicating hyperplasic growth, and in adults most were >50 μ m diameter, indicating hypertrophy growth. Picrosirius staining revealed increased areas of collagen fibers in adult, mainly in red muscle. Reticulin staining showed collagen I and III in skeletal muscle in both growth phases and both muscle types. However, collagen III was more abundant in adult skeletal muscle. In both phases studied, zymography techniques showed gelatinolytic enzymes activities bands with molecular weights 93, 81, 64 and 57 kDa, corresponding to the forms pró-MMP-9, active-MMP-9, intermediate MMP-2 and active MMP-2, respectively, in red and white muscle. In juveniles, in red and white muscle, MMP-2 activity was higher than the MMP-9 activity. However, MMP-2 activity was higher in red muscle (without statistic diference). MMP-9 activity was higher in red muscle. Red and white muscle in adults showed the intermediate MMP-2 activity predominantly; active MMP-2 activity was observed in red muscle only. Related to the MMP-9 activity, we observed relevant activity of the active form in red muscle only. Considering red and white muscle, in both phases, the gelatinolytic enzymes activity of the MMPs forms was significantly higher in the juveniles. Difference in the activity and muscle growth pattern in pacu to act on the organization and content of collagen and in the

MMPs activities. This fact may contribute for the major firmness and softness in the red and the white muscle, respectively.

3. Introdução

3.1. Organização da Musculatura Estriada Esquelética em Peixes

Nos peixes, a maior parte da massa corporal é representada pelo tecido muscular estriado esquelético que constitui cerca de 40 a 75% do peso total do animal. Essa abundante massa muscular não representa somente um mecanismo específico para a adaptação desses animais no meio aquático, mas serve como importante fonte de proteínas utilizadas na alimentação (Weatherley and Gill, 1985).

Na maioria das espécies de peixes, a musculatura estriada está organizada em unidades morfofuncionais, os miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal separados por bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos, onde estão inseridas as fibras musculares (Alexander, 1969) (Figura 1). Na região onde se encontra o nervo da linha lateral, um septo de tecido conjuntivo, o septo transversal, separa a massa muscular em regiões epiaxial e hipoaixial (Alexander, 1969; Grizzle and Rogers, 1979).

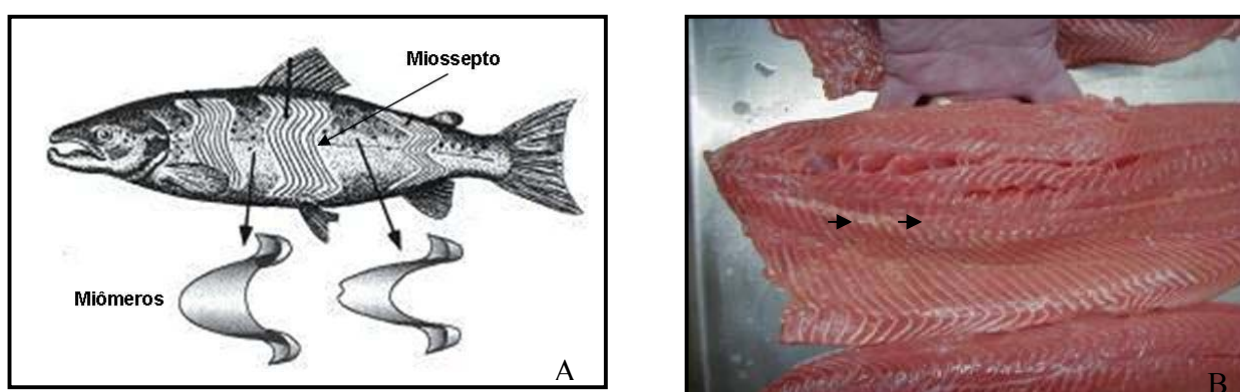


Figura 1: A e B - Organização anatômica da musculatura estriada esquelética (miotomal) em miômeros e miosseptos. Observar, em B, a distribuição dos miômeros e miosseptos na musculatura do salmão. A: esquema adaptado de Johnston, 2001.

As fibras da musculatura estriada estão distribuídas em áreas ou compartimentos distintos: vermelho, intermediário e branco. A maior parte da massa muscular é formada pelo compartimento branco (musculatura branca), com fibras musculares de contração rápida e metabolismo glicolítico. O compartimento vermelho (musculatura vermelha) está localizado na região superficial, abaixo da derme, sendo formado por fibras de contração

lenta e metabolismo oxidativo. Entre essas duas áreas distintas encontra-se o compartimento intermediário (musculatura intermediária) com fibras de contração rápida e de metabolismo oxidativo/glicolítico (Johnston, 1981; Weatherley and Gill, 1987) (Figura 2).

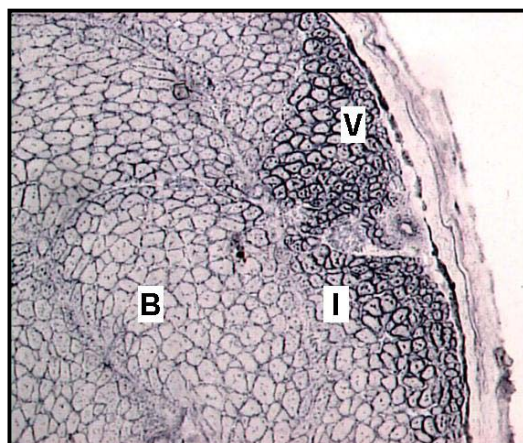


Figura 2 - Corte transversal da musculatura estriada esquelética da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Compartimento vermelho superficial (V), compartimento intermediário (I) e compartimento branco profundo (B). NADH-TR. (Adaptado de Aguiar et al., 2005).

As fibras musculares vermelhas normalmente são menores, apresentam alta concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídios e excelente suprimento sanguíneo, sendo utilizadas na realização de movimentos lentos e de sustentação, como a migração (Driedzic and Hochachka, 1976; Johnston, 1980). As fibras musculares brancas são maiores, apresentam baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias, lipídios, com as miofibrilas ocupando entre 75 a 95% do volume total da fibra (Sänger et al., 1990; Sängler, 1992). Essas fibras são utilizadas durante a realização de movimentos bruscos de natação, como a captura de alimento e fuga de predadores (Driedzic and Hochachka, 1976; Johnston, 1980). As características morfofisiológicas das fibras intermediárias estão entre as das fibras musculares brancas e vermelhas (Zhang et al., 1996; Sängler and Stoiber, 2001).

3.2. Crescimento Muscular em Peixes

A musculatura estriada esquelética é um tecido pós-mitótico e o crescimento é dependente da proliferação e da diferenciação das células mio-satélites, mioblastos que não se fundiram durante o processo da miogênese, responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans and Akster, 1995). Na hipertrofia, as células mio-satélites se fundem com fibras musculares existentes aumentando o número de núcleos para a síntese de miofibrilas, enquanto que, na hiperplasia, ocorre a formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes e posterior diferenciação em novas fibras (Koumans and Akster, 1995; Johnston et al., 2000a) (Figura 3). Quando a hiperplasia está ocorrendo, observa-se um mosaico de fibras com diferentes diâmetros, melhor observado na musculatura branca (Johnston, 1999). A presença de fibras com diâmetros pequenos (20 a 30 μ m) é indicativa de que a hiperplasia está ocorrendo (Akster, 1983; Veggetti et al., 1993; Fernandez et al., 2000).

A proliferação e a diferenciação das células mio-satélites, durante o crescimento muscular, ocorre sob o controle de fatores transcricionais, dentre eles, os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4. Esses fatores contêm um domínio altamente conservado evolutivamente de aproximadamente 60 aminoácidos, conhecido como “basic helix-loop-helix” (bHLH). Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico (“basic”), uma seqüência no DNA conhecida como E-box (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos. A região “helix-loop-helix” do MRF constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47. A ligação do heterodímero MRF-proteína E à seqüência E-box ativa a transcrição dos genes músculo-específicos, levando à sua expressão (Rudnick and Jaenisch, 1995; Molkenin and Olson, 1996; Watabe, S., 1999; Sabourin and Rudnick, 2000; Rescan, 2001).

Os primeiros MRFs expressos são a MyoD e Myf-5, importantes para a proliferação dos mioblastos, enquanto que a miogenina e o MRF4 são expressos posteriormente e regulam a diferenciação da fibra muscular (Megeny and Rudnick, 1995).

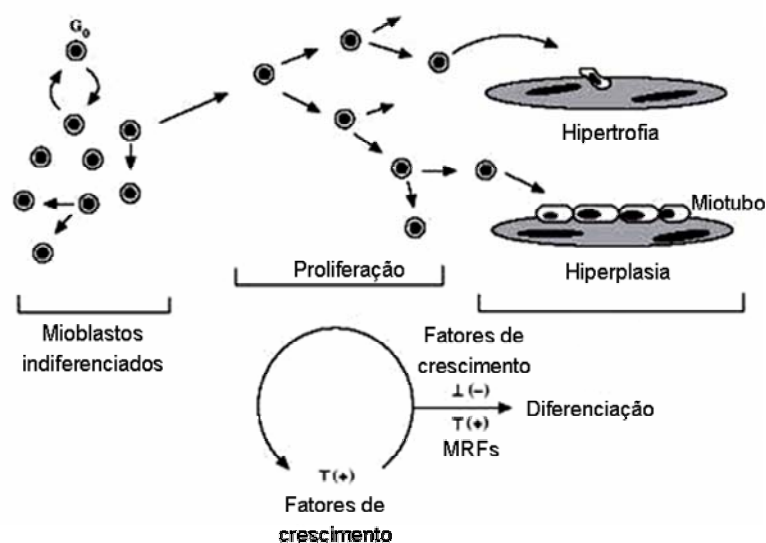


Figura 3 - População de mioblastos indiferenciados (stem cells ou células mio-satélites). Na hipertrofia, núcleos de alguns desses mioblastos são incorporados em uma fibra muscular existente. Na hiperplasia, outros mioblastos podem se fundir na superfície da fibra muscular, formando uma nova fibra. (Adaptado de Johnston, 1999).

O balanço entre os mecanismos hipertrófico e hiperplásico determina a taxa de crescimento e o tamanho final da espécie, sendo dependente de vários fatores como, temperatura, fotoperíodo, regime alimentar e composição da dieta (Johnston et al., 2000a; Brodeur et al., 2002; Assis et al., 2004). Nos mamíferos, a hiperplasia cessa em um curto período após o desenvolvimento embrionário (Goldspink, 1972). Nos peixes, a hiperplasia e a hipertrofia contribuem por todo o período de crescimento da musculatura estriada. No entanto, nas espécies que atingem tamanho final de poucos centímetros, o crescimento muscular envolve principalmente a hipertrofia de fibras formadas nas fases iniciais da embriogênese e o período de crescimento hiperplásico é mais curto (Weatherley et al., 1988). Nas espécies que atingem um tamanho maior, novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento (Alami-Durante et al., 1997).

A parte comestível principal dos peixes é constituída pela musculatura branca e várias pesquisas têm demonstrado que a celularidade muscular envolvendo os padrões de crescimento hiperplásico e hipertrófico associado às propriedades da matriz extracelular contribui para o melhor processamento dos produtos derivados dos peixes, sendo

determinantes da textura e da qualidade do filé (Montero and Bordeiras, 1990; Fauconneau et al., 1993).

3.3. Matriz Extracelular

A matriz extracelular é constituída por vários tipos de colágeno, proteoglicanas e enzimas. É importante para manter a integridade fisiológica das fibras musculares (Reznick et al., 2003; Carmeli et al., 2004) e possui os capilares sanguíneos responsáveis pelo suprimento vascular das fibras (Reznick et al., 2003). Nos mamíferos, as fibras musculares estão envoltas por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, que constituem o tecido conjuntivo do músculo, organizado em três bainhas: epimísio, que circunda todo o músculo; perimísio, que divide o músculo em fascículo e endomísio, que circunda cada fibra muscular (Kjaer, 2004).

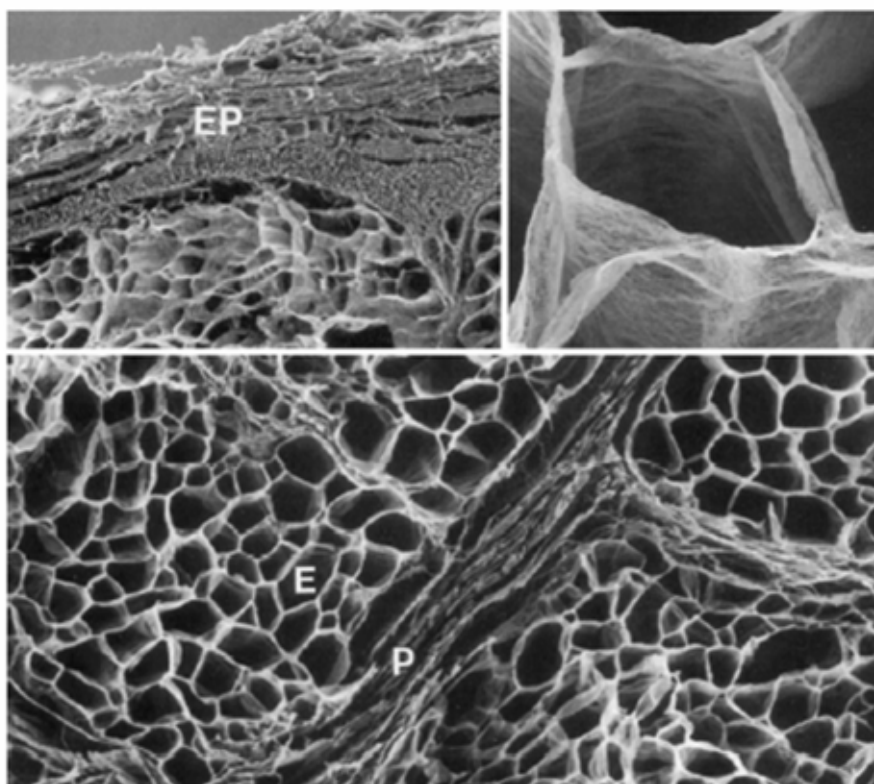


Figura 4. Estrutura da matriz extracelular do músculo esquelético. Músculo semitendinoso bovino após remoção das proteínas das fibras musculares (microscopia eletrônica de varredura). Epimísio (EP), Perimísio (P) e Endomísio (E). Detalhe do endomísio circundando uma fibra muscular esquelética (adaptado de Kjaer, 2004).

Estudos de microscopia óptica revelaram inicialmente que cada fibra muscular está envolvida por um delicado tubo, denominado sarcolema, formado por 3 componentes: fibrilas reticulares, que seguem um curso em espiral ao redor da fibra (Borg and Caulfield, 1980), membrana basal (Zacks et al., 1973; Borg and Caulfield, 1980) e membrana plasmática da fibra muscular. A membrana basal é formada por duas camadas finas: a lâmina reticular e a lâmina basal (Mauro and Adams, 1961).

Posteriormente, estudos de microscopia eletrônica demonstraram que a lâmina basal é ainda subdividida em lâmina densa e lâmina rara, adjacente à membrana plasmática (Inoue, 1989). Os principais componentes da membrana basal são: laminina, fibronectina, entactina, heparan sulfato e os colágenos dos tipos I, III, IV, V (Duance et al., 1977; Duance et al., 1980; Walsh et al., 1981; Foidart et al., 1981; Sanes, 1982; Stephens et al., 1982; Bayne et al., 1984; Linsenmayer et al., 1986; Eldridge et al., 1986; Lehto et al., 1988).

Poucas moléculas tem sido localizadas no epimísio e no perimísio (Bailey and Sims, 1977; Duance et al., 1977; Duance et al., 1980; Foidart et al., 1981; Sanes, 1982; Stephens et al., 1982; Light and Champion, 1984; Linsenmayer et al., 1986; Lehto et al., 1988). A fibronectina está presente em ambas camadas, bem como os colágenos dos tipos IV e VI. O colágeno do tipo I está concentrado no epimísio e o colágeno do tipo III no perimísio; ambos presentes em concentrações maiores no epi e perimísio que no endomísio. A laminina e colágeno IV estão presentes no local de contato da lâmina basal com o perimísio, mas ausente no perimísio e endomísio propriamente ditos.

A distribuição dos subtipos de colágeno nos músculos está relacionada com o fenótipo muscular e alterações na abundância, e nas ligações cruzadas do colágeno podem alterar as propriedades mecânicas dos diferentes músculos (Miller et al., 2001). O colágeno do tipo I e III são isoformas primárias no músculo esquelético, e possuem propriedades mecânicas diferentes. O colágeno do tipo I está tipicamente associado com a rigidez do tecido sendo encontrado em maior quantidade no músculo vermelho, enquanto que, a abundância do colágeno III está correlacionada com a maior capacidade de distensão e maleabilidade do músculo (Kovanen et al., 1984; Miller et al., 2001).

O tecido conjuntivo intracelular tem uma função importante na determinação da textura e na qualidade da carne e a sua estabilidade mecânica aumenta com o crescimento

do animal (Bailey and Light, 1989; McCormick, 1994) onde o colágeno torna-se progressivamente mais rígido e mais resistente pelo aumento das ligações cruzadas do colágeno (Shimokomaki et al., 1972; Tanzer, 1973). Esse fato poderia levar ao endurecimento da carne durante o crescimento. No entanto, foi demonstrado que o conteúdo total de colágeno e as ligações intermoleculares do colágeno não são os únicos componentes responsáveis pela maciez e textura da carne (Avery et al., 1996).

A distribuição da matriz extracelular entre as fibras da musculatura estriada dos peixes é específica para cada espécie, na dependência dos movimentos realizados durante a locomoção, porém, é menos desenvolvida que nos mamíferos, não ultrapassando 3% (Sato et al., 1986a e b; Sato et al., 1989). Estudos histológicos tem mostrado que a maciez na carne em peixes é causada pela desintegração das fibrilas de colágeno (Ando et al., 1992; Hallett and Bremner, 1988). Entre os subtipos de colágenos encontrados no tecido conjuntivo intramuscular destacam-se o colágeno do tipo I e V (Sato et al., 1989; 1991, 1994a,b, Aido et al., 1999) e foi demonstrado que as alterações bioquímicas do colágeno do tipo V, no período post-mortem constituem um dos principais fatores envolvidos na maciez do filé (Sato et al., 1991). Já, Kimiya et al., 2005, descreveram um aumento da solubilidade no colágeno I e V no período post-mortem, sugerindo que ambos podem contribuir com a maciez do músculo do peixe.

A variação no diâmetro das fibras musculares pode influenciar a quantidade de colágeno na matriz extracelular e várias comparações interespecíficas tem mostrado uma correlação negativa entre o diâmetro das fibras e a firmeza do filé. Por outro lado, a celularidade muscular pode ser utilizada como um indicador do balanço entre a hipertrofia e a hiperplasia, sendo também considerado um importante fator determinante da qualidade do filé (Johnston, 1999). Peixes com fibras musculares pequenas apresentam um filé mais firme em relação à aquelas espécies onde as fibras musculares são maiores (Hatae et al., 1990; Hurling et al., 1996). No pacu, os mecanismos de crescimento por hiperplasia e hipertrofia das fibras ocorrem por um longo período (Dal Pai et al., 2000). Considerando-se as musculaturas vermelha e branca, o diâmetro maior das fibras brancas em relação às vermelhas, na fase adulta, associado à organização do colágeno pode contribuir para a maior maleabilidade desta musculatura.

O músculo esquelético consiste predominantemente de elementos contráteis, mas a íntima associação entre as fibras musculares e o tecido conjuntivo é importante para manter a integridade e a função do músculo inteiro (Cohn and Campbell, 2000; Takala and Virtanen, 2000). As pesquisas têm destacado a importância do modelo de crescimento muscular para determinar a qualidade da carne e a densidade das fibras pode ser positivamente ou negativamente relacionada com a firmeza da carne (Jonhston et al., 2000b, 2002)

3.4 Metaloproteinases

Os componentes da matriz extracelular são constantemente renovados pelas células por um importante grupo de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases de matriz (MMP). São enzimas cálcio e zinco dependentes (Birkedal-Hansen et al., 1993; Stetler-Stevenson et al., 1993; Ray and Stetler, 1994; Vu and Werb, 2000; Carmeli *et al.*, 2004) que atuam na degradação de vários componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário, a migração celular, a morfogênese e a remodelação tecidual (Chin and Werb, 1997; Sato et al., 1998; Werb and Chin, 1998; Murphy and Gavrilovic, 1999; Vu and Werb, 2000). As MMPs são sintetizadas na forma de um precursor latente, sendo clivadas e ativadas no espaço extracelular (Nagase, 1997). As MMPs também podem sofrer os processos de auto-ativação ou autoclivagem (Matrisian, 1990; Stamenkovic, 2000).

As células também secretam proteínas inibitórias da atividade das MMPs. Esses inibidores são conhecidos como inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (Woessner et al., 1991). Assim, a atividade dessas enzimas é regulada por meio de um complexo mecanismo de síntese, ativação e inibição. De acordo com o substrato que degradam, as MMPs são divididas em 5 grupos principais: 1) colagenase; 2) gelatinases; 3) estromelisinases; 4) metaloproteinases de membrana (Tabela 1).

Tabela 1. Principais metaloproteinases de matriz e suas características

Grupo de MMPs	Número da MMP	Nome comum	Peso molecular relativo da pro-enzima/	Peso molecular relativo da enzima ativa
colagenases intersticiais	MMP-1	colagenase 1 ou colagenase de fibroblasto	57 kDa	42/46 kDa
	MMP-8	colagenase 2 ou colagenase de neutrófilo	85 kDa	67 kDa
	MMP-13	colagenase 3 ou colagenase de osteoblasto	60 kDa	48 kDa
gelatinases	MMP-2	Gelatinase A	72 kDa	66 kDa
	MMP-9	Gelatinase B	92 kDa	78 kDa
Estromelisinases	MMP-3	Estromelisinase 1	57 kDa	48 kDa
	MMP-10	Estromelisinase 2	57 kDa	47 kDa
	MMP-11	Estromelisinase 3	-	-
Metaloproteinases de membrana (MT-MMP)	MMP-14	MT1-MMP	65 kDa	63 kDa
	MMP-15	MT2-MMP	72 kDa	55/48 kDa
	MMP-16	MT3-MMP	65 kDa	63 kDa
	MMP-17	MT4-MMP	-	-
	MMP-24	MT5-MMP	-	-
	MMP-25	MT6-MMP ou leucolisina	65 kDa	-
Matrilisina	MMP-7	matrilisina	28 kDa	19 kDa
Outras MMPs	MMP-12	elastase de macrófago	48 kDa	22 kDa
	MMP-18	Colagenase 4	-	-
	MMP-19	-	-	-
	MMP-20	Esmaltelinase	54 kDa	25 kDa
	MMP-21	-	70 kDa	66 kDa
	MMP-22	-	58 kDa	53 kDa
	MMP-23	-	58 kDa	45 kDa
	MMP-26	endometase humana / endométrio	30 kDa	18 kDa
	MMP-27	-	60/58 kDa	50/48 kDa
	MMP-28	Epilisina / testículo e queratinócitos	62/58 kDa	50/48 kDa

As metaloproteinases MMP2 (Metaloproteinase collagenase V ou gelatinase A) e a MMP-9 (colagenase tipo IV ou gelatinase B) exercem importante papel na manutenção da estrutura e atividade da lâmina basal. No músculo esquelético, há um aumento da expressão da MMP-2 e MMP-9 em condições patológicas que induzem a degradação e remodelação da matriz extracelular (Kherif et al., 1999; Reznick et al., 2003; Bar-Shai et al., 2005; Giannelli et al., 2005; Carvalho et al., 2006). A MMP-2 possui a capacidade de degradar vários componentes do tecido conjuntivo incluindo colágenos fibrilares dos tipos II e III (Aimes and Quigley, 1995), e colágenos não fibrilares dos tipos IV e V (Okada et al., 1990), entretanto, possui baixa atividade para degradar proteoglicanos e fibronectina. A MMP-9 degrada os mesmos substratos e é produzida principalmente por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos (Stahle-Backdahi et al., 1994) e linfócitos (Montgomery et al., 1993).

Em peixes, a atividade e a função das metaloproteinases é ainda pouco estudada, porém, foi proposto que as MMPs -2 e -9 participam do processo de degradação *post mortem* do músculo, durante a estocagem (Sato et al., 1997; Kubota et al., 2003a); na desintegração do tecido conjuntivo pericelular, durante a migração (Kubota et al., 2000) e na degradação de colágeno do tipo I (Saito et al., 2000). Na matriz extracelular os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPS) contribuem na regulação das atividades enzimáticas (reviewed by Gomez et al., 1997; Brew et al., 2000). O mecanismo de inibição parece ser devido às ligações de domínio N-terminal de TIMP para o local catalítico da MMP (Murphy et al., 1991). Atualmente, quatro, isoformas de TIMPs tem sido caracterizadas em mamíferos (TIMP-1,-2,-3 E -4) (Bauer et al., 1975; Herron et al., 1986; Goldberg et al., 1989; Staskus et al., 1991; Greene et al., 1996), enquanto que em peixes somente duas isoformas tem sido descritas (Kim et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Kubota et al., 2003b).

A análise da distribuição e das características morfológicas da matriz extracelular em peixes, associada à celularidade muscular pode contribuir para o melhor entendimento da relação entre a estrutura muscular e as características relacionadas à qualidade do filé. Pesquisas que visam caracterizar os processos de crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico e a sua interação com a MEC podem contribuir para a discussão dos fatores

que podem potencialmente influenciar a qualidade do filé produzido, em espécies cultivadas.

No Brasil, entre as espécies de grande interesse econômico destaca-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). É um dos principais peixes dos rios do Pantanal, da Bacia do rio Paraguai e da Bacia do Prata. A pesca e o mercado de consumo 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 seu 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. Em seu ambiente natural se alimenta de frutos, sementes, plantas, pequenos peixes e caramujos, entre outros (Bernardino and Colares de Melo, 1989).

A reprodução do pacu ocorre entre os meses de outubro e novembro. Essa espécie possui crescimento rápido e atinge um tamanho final grande que varia de 1,0 a 1,5 kg no primeiro ano de cultivo e os mecanismos de crescimento por hiperplasia e hipertrofia das fibras ocorrem por um período prolongado (Dal Pai et al., 2000).

4.Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição do colágeno e a atividade das metaloproteinases (MMPs) -2 e -9 na musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), nas fases de crescimento juvenil e adulta.

5. Capítulo

Atividade diferencial das metaloproteinases -2 e -9 e distribuição do colágeno no músculo esquelético do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), nas fases de crescimento juvenil e adulta.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a distribuição do colágeno e a atividade das metaloproteinases 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9) no músculo estriado esquelético do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), durante as fases de crescimento juvenil e adulto. Amostras do músculo de peixes (juvenil e adulta) (n=5) foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Cortes histológicos (7 à 10µm) obtidos em criostato foram submetidos às colorações hematoxilina-eosina (HE), para a análise da morfologia geral e Picrossirius e Reticulina para avaliar as fibras do sistema colágeno; foi calculado o menor diâmetro de 450-500 fibras musculares em cada fase analisada, utilizando-se um Sistema de Análise de Imagens. As fibras musculares foram agrupadas em 3 classes de diâmetro: <20, 20-50 e >50µm. Para a análise das MMP-2 e MMP-9, alíquotas (25µg de proteína muscular) foram submetidas à eletroforese em gelatina contendo SDS para zimografia. O músculo estriado esquelético do pacu (juvenil e adulto) estava organizado em compartimentos vermelho, intermediário e branco. A análise morfométrica das fibras musculares dos peixes no estágio juvenil mostrou a maioria das fibras musculares com diâmetro < 20µm, indicando um crescimento hiperplásico predominante e nos peixes adultos a maioria das fibras musculares apresentou diâmetro > 50µm, indicando crescimento hipertrófico predominante. A coloração de Picrossirius revelou um aumento de colágeno I, principalmente na musculatura vermelha dos peixes adultos. A coloração de Reticulina mostrou a presença de colágeno III no músculo esquelético em ambas as fases de crescimento e nos tipos de musculatura. Entretanto, o colágeno III foi mais abundante no músculo branco. A técnica de zimografia revelou bandas claras de atividade gelatinolítica com PM aproximadamente 93, 81, 64 e 57 kDa, que correspondem às formas de pró-enzima da MMP-9, enzima ativa da MMP-9, forma intermediária da MMP-2 e forma ativa da MMP-2, respectivamente, na musculatura vermelha e branca em ambas as fases de crescimento analisadas. Nos peixes da

fase juvenil, tanto na musculatura vermelha como na branca, a atividade da MMP-2 foi mais intensa do que a da MMP-9. Entretanto, a atividade das duas formas da MMP-2 foi relativamente maior no músculo vermelho, mas sem atingir diferença estatisticamente significativa. Já a atividade das formas da MMP-9 foi maior na musculatura vermelha. Nos peixes da fase adulta, nas musculaturas vermelha e branca, a atividade da forma intermediária da MMP-2 foi predominante, sendo estatisticamente mais elevada na musculatura vermelha, junto com a atividade da forma ativa da MMP-2, que foi encontrada exclusivamente neste músculo. Já em relação a MMP-9 foi observada atividade relevante da forma ativa somente no músculo vermelho. Comparando-se os mesmos tipos de musculaturas nas duas fases de crescimento, pode-se observar que a atividade das diferentes formas das duas enzimas foi significativamente maior na fase juvenil. Diferenças no padrão de crescimento e atividade muscular no pacu, influenciam na organização e conteúdo de colágeno e na atividade das MMPs. Essas características diferenciais podem contribuir para as diferenças de firmeza e maciez encontradas entre as musculaturas vermelha e branca, respectivamente.

Palavras chave: Peixe; Crescimento muscular; Matriz extracelular; Metaloproteinases; colágeno; *Piaractus mesopotamicus*.

Differential MMP-2 and MMP-9 activity and collagen composition in skeletal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during juvenil and adult growth phase.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate collagen composition and the MMP-2 and MMP-9 activity in skeletal muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during juvenile and adult growth phases. Muscle samples from Juvenile (J) and adult (A) fish (n=5) were collected and frozen in liquid nitrogen. Serial transverse sections (7 to 10 μ m) were cut with a cryostat and stained with Haematoxylin-eosin (HE) to determine the smaller diameters from 450-500 muscle fibers in each group. Muscle fibers were grouped into three classes: <20, 20-50, and >50 μ m. Sections were submitted to Picrosirius and Reticulin to evaluate collagen system fibers. For analysis of MMP-2 and MMP-9, aliquots (25 μ g protein) from muscle extracts were subjected to electrophoresis in gelatin-containing SDS-PAGE for zymography. Juvenile and adult pacu skeletal muscle was organized in red, white, and intermediate compartments. We only analyzed white and red compartments. Morphometric analysis of juvenile stage muscle fiber showed that most muscle fibers were <20 μ m diameter indicating hyperplasic growth, and in adults most were >50 μ m diameter, indicating hypertrophy growth. Picrosirius staining revealed increased areas of collagen fibers in adult, mainly in red muscle. Reticulin staining showed collagen I and III in skeletal muscle in both growth phases and both muscle types. However, collagen III was more abundant in adult skeletal muscle. In both phases studied, zymography techniques showed gelatinolytic enzymes activities bands with molecular weights 93, 81, 64 and 57 kDa, corresponding to the forms pró-MMP-9, active-MMP-9, intermediate MMP-2 and active MMP-2, respectively, in red and white muscle. In juveniles, in red and white muscle, MMP-2 activity was higher than the MMP-9 activity. However, MMP-2 activity was higher in red muscle (without statistic diference). MMP-9 activity was higher in red muscle. Red and white muscle in adults showed the intermediate MMP-2 activity predominantly; active MMP-2 activity was observed in red muscle only. Related to the MMP-9 activity, we observed relevant activity of the active form in red muscle only. Considering red and white muscle, in both phases, the gelatinolytic enzymes activity of the

MMPs forms was significantly higher in the juveniles. Difference in the activity and muscle growth pattern in pacu play a major role on the act on the organization and content of collagen and in the MMPs activities. This fact may contribute for the major firmness and softness in the red and the white muscle, respectively.

Keywords: Fish; Muscle Growth; Extracellular matrix; Metalloproteinases; Collagen; *Piaractus mesopotamicus*.

INTRODUÇÃO

Nos peixes, a maior parte da massa corporal é representada pelo tecido muscular estriado esquelético que constitui cerca de 40 a 75% do peso total do animal. Essa abundante massa muscular não representa somente um mecanismo específico para a adaptação desses animais no meio aquático, mas serve como importante fonte de proteínas utilizadas na alimentação (Weatherley and Gill, 1985).

O crescimento da musculatura estriada esquelética em peixes é dependente da proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas ou células miossatélites, responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans and Akster, 1995; Johnston et al., 2000a).

Nos mamíferos, a hiperplasia cessa em um curto período após o desenvolvimento embrionário (Goldspink, 1972). Já nos peixes, a hiperplasia e a hipertrofia contribuem por todo o período de crescimento da musculatura estriada. Nas espécies que atingem tamanho pequeno, o crescimento muscular envolve principalmente a hipertrofia de fibras formadas nas fases iniciais da embriogênese e o período de crescimento hiperplásico é mais curto (Weatherley et al., 1988). No entanto, nas espécies que atingem um tamanho maior, novas fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento (Alami-Durante et al., 1997).

A parte comestível principal dos peixes é constituída pela musculatura branca e a celularidade muscular envolvendo os padrões de crescimento hiperplásico e hipertrófico contribuem para o melhor processamento dos produtos derivados dos peixes, sendo determinantes da textura e da qualidade do filé (Montero and Bordeiras, 1990; Fauconneau et al., 1993; Johnston, 1999, Johnston et al., 2000d). A variação no diâmetro das fibras musculares pode influenciar a quantidade de colágeno na matriz extracelular (Periago et al., 2005) e várias comparações interespecíficas tem mostrado que peixes com fibras musculares pequenas apresentam um filé mais firme em relação à aquelas espécies onde as fibras musculares são maiores (Hatae et al., 1990; Hurling et al., 1996).

A distribuição da matriz extracelular entre as fibras da musculatura estriada dos peixes é específica para cada espécie, na dependência dos movimentos realizados durante a

locomoção, porém, é menos desenvolvida que nos mamíferos, não ultrapassando 3% (Sato et al., 1986a e b; Sato et al., 1989).

Os componentes da matriz extracelular são constantemente renovados pelas células por meio de um grupo de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases de matriz (MMP). São enzimas cálcio e zinco dependentes (Birkedal-Hansen et al., 1993; Stetler-Stevenson et al., 1993; Ray and Stetler, 1994; Vu and Werb, 2000; Carmeli *et al.*, 2004) que atuam na degradação de vários componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento embrionário, a migração celular, a morfogênese e a remodelação tecidual (Chin and Werb, 1997; Sato *et al.*, 1998; Werb and Chin, 1998; Murphy and Gavrilovic, 1999; Vu and Werb, 2000). De acordo com o substrato que degradam, as MMPs são divididas em 4 grupos principais: 1) colagenase; 2) gelatinases; 3) estromelinas; 4) metaloproteinases de membrana. As células também secretam proteínas inibitórias da atividade das MMPs, conhecidos como inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) (Woessner et al., 1991).

No músculo esquelético, a MMP-2 possui a capacidade de degradar vários componentes do tecido conjuntivo incluindo colágenos fibrilares dos tipos II e III (Aimes and Quigley, 1995) e colágenos não fibrilares dos tipos IV e V (Okada et al., 1990), entretanto, possui baixa atividade para degradar proteoglicanos e fibronectina. A MMP-9 degrada os mesmos substratos e é produzida principalmente por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos (Stahle-Backdahi et al., 1994) e linfócitos (Montgomery et al., 1993). Em peixes, a função destas enzimas é ainda pouco estudada, porém, foi proposto que as MMPs -2 e -9 participam do processo de degradação *post mortem* do músculo, durante a estocagem (Sato et al., 1997; Kubota et al., 2003a), na desintegração dos colágenos fibrilares da matriz intramuscular, durante a migração (Ito et al., 1992; Kubota et al., 2000) e na degradação do colágeno I (Saito et al., 2000).

A análise da distribuição e das características morfológicas da matriz extracelular, associada à celularidade muscular pode contribuir para o melhor entendimento da relação entre a estrutura muscular e as características relacionadas à qualidade do filé. Pesquisas que visam caracterizar os processos de crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico e a sua interação com a MEC podem contribuir para a discussão dos fatores que podem potencialmente influenciar a qualidade do filé produzido, em espécies cultivadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição do colágeno e a atividade das metaloproteinases (MMPs) -2 e -9 na musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*), nas fases de crescimento juvenil e adulta.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo, foram utilizados exemplares juvenis (n=5) e adultos (n=5) de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) provenientes do Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais (CEPTA – IBAMA), Pirassununga, SP.

Os peixes foram trazidos para o Laboratório de Histoquímica e Imunohistoquímica do Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu. Os peixes foram sacrificados após anestesia com MS-222 (Tricaine Methanensulfonate) – SIGMA, e foi determinado o peso corporal (g). A média do peso dos peixes juvenis foi de $17,30 \pm 5,64$ e dos peixes adultos foi de $712,33 \pm 140,06$.

Análise Morfológica

Fragmentos da musculatura estriada de cinco exemplares de cada fase estudada foram retirados e congelados em n-hexana previamente resfriada em nitrogênio líquido. Cortes histológicos (10 μm) obtidos em criostato a -20°C , foram submetidos à coloração HE, para a avaliação do padrão morfológico das fibras musculares (Bancroft and Stevens, 1991), Picrossirius-polarização (Junqueira et al., 1979) e reticulina (Taboga and De Campos Vidal, 2003), para a análise da composição e organização das fibras do sistema colágeno.

Análise morfométrica

Utilizando um sistema de análise de imagens, Leica Qwin, foi calculado o menor diâmetro de uma população de fibras musculares (100 fibras de cada tipo/animal). Posteriormente, as fibras musculares foram distribuídas em classes, na dependência do seu diâmetro ($<20\mu\text{m}$; $20-50\mu\text{m}$; $>50\mu\text{m}$), conforme a metodologia utilizada por (Valente et al., 1999).

Zimografia

Foi avaliada a atividade gelatinolítica das metaloproteinases -2 e -9 na musculatura estriada branca e vermelha do pacu por zimografia em gel de poliacrilamida contendo gelatina.

A extração destas enzimas foi feita seguindo o protocolo proposto por Jung et al (1998). Fragmentos da musculatura extraída de cinco exemplares de cada fase foram homogeneizado em homogeneizador tipo Turrax em tampão tris- HCL 0,05m pH 7,5 contendo 100mM NACL e coquetel de inibidor de protease (Sigma). O material foi centrifugado e o sobrenadante recolhido. O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Bradford.

Alíquotas (25µg) do extrato foram submetidas à eletroforese, sob condições não-redutoras, em gel de poliacrilamida a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina. Depois da eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS.

Alíquotas (25µg de proteínas) do extrato do músculo foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina na presença de SDS sob condições não redutoras como previamente descrito (Wilson et al. 1992). A eletroforese ocorreu por 2h à 110v, 4°C em um Bio-Rad Miniprotean II system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond,CA, USA) e após esta etapa, os géis (0.75 mm de espessura) foram lavados duas vezes por 15 minutos em uma solução de 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS, seguindo-se por duas lavagens de 5 minutos em solução tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 5 mM CaCl₂ e 1 mM ZnCl₂. Posteriormente, os géis foram incubados 12 horas na mesma solução a 37°C. Ao final, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250, para a análise.

Após a coloração do gel por Coomassie Brilliant Blue R-250, os géis foram descorados. As áreas de proteólises aparecem como bandas claras contra um fundo azul escuro. As determinações das massas moleculares foram feitas com referência ao padrão de proteína pré estabelecido (Bio-Rad Laboratories, Inc.), coeletroforizado nos géis. A atividade gelatinolítica das bandas da MMP-2 e -9 foi analisada obtendo-se a densidade óptica integrada (IOD) das bandas utilizando-se Image Máster VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Máster VDS (Pharmacia Biotech).

Análise estatística

Para a análise estatística do peso dos exemplares juvenis e adultos de pacu, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para a análise estatística dos resultados referentes ao diâmetro dos tipos de fibras dos exemplares estudados, foi realizada a técnica de Análise de Variância para o modelo de medidas repetidas em dois grupos independentes (Norman and Streiner, 1993). Para os resultados referentes à distribuição dos tipos de fibras em classes de diâmetros, foi utilizado o Teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais (Goodman, 1964; Goodman, 1965).

Para a análise dos resultados referentes à Zimografia, foi utilizada a técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo com dois fatores (Zar, 1999).

RESULTADOS

A musculatura estriada do pacu, nos períodos estudados, apresentou-se distribuída em compartimentos: superficial ou vermelho, restrito à região do nervo da linha lateral, branco ou profundo, formando a maior parte da massa muscular e intermediário, entre os compartimentos vermelho e branco. As fibras musculares estavam envolvidas pelo endomísio de tecido conjuntivo frouxo e septos mais espessos de tecido conjuntivo, semelhante ao perimísio separam a musculatura em fascículos, sendo estes mais evidentes na musculatura dos peixes adultos (Fig. 1).

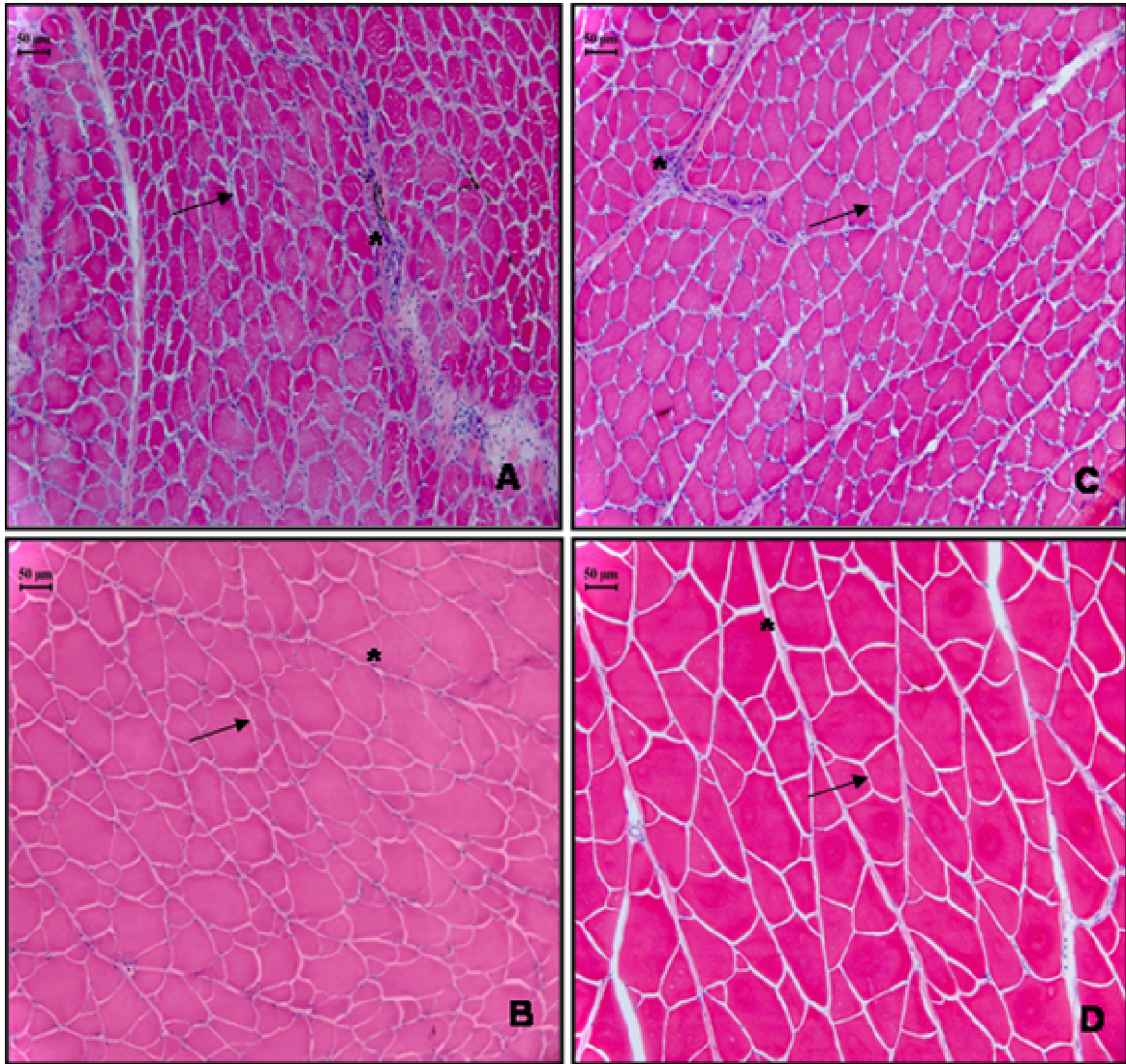


Figura 1: Corte transversal da musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A:** fase juvenil, musculatura vermelha. **B:** fase juvenil, musculatura branca. **C:** fase adulta, musculatura vermelha. **D:** fase adulta, musculatura branca. Fibras musculares envoltas pelo endomísio (Setas). Perimísio (*) envolvendo fascículos de fibras musculares. Hematoxilina-eosina (HE). Barra: 50µm.

Após a coloração com Picrossirius, à observação sob luz convencional e em luz polarizada, foi evidenciada a presença de fibras colágenas nos septos, principalmente, separando o compartimento vermelho dos compartimentos intermediário e branco, do pacu, nos dois períodos estudados, além de separar a massa muscular branca em compartimentos menores. Envolvendo cada fibra muscular, foram observados fibras colágenas no endomísio, mais espesso nas fibras da musculatura vermelha nos peixes adultos. Nesses, em todos os compartimentos, as fibras musculares estavam organizadas em fascículos, envolvidos por septos espessos e irregulares de fibras colágenas, semelhante ao perimísio (Fig. 2).

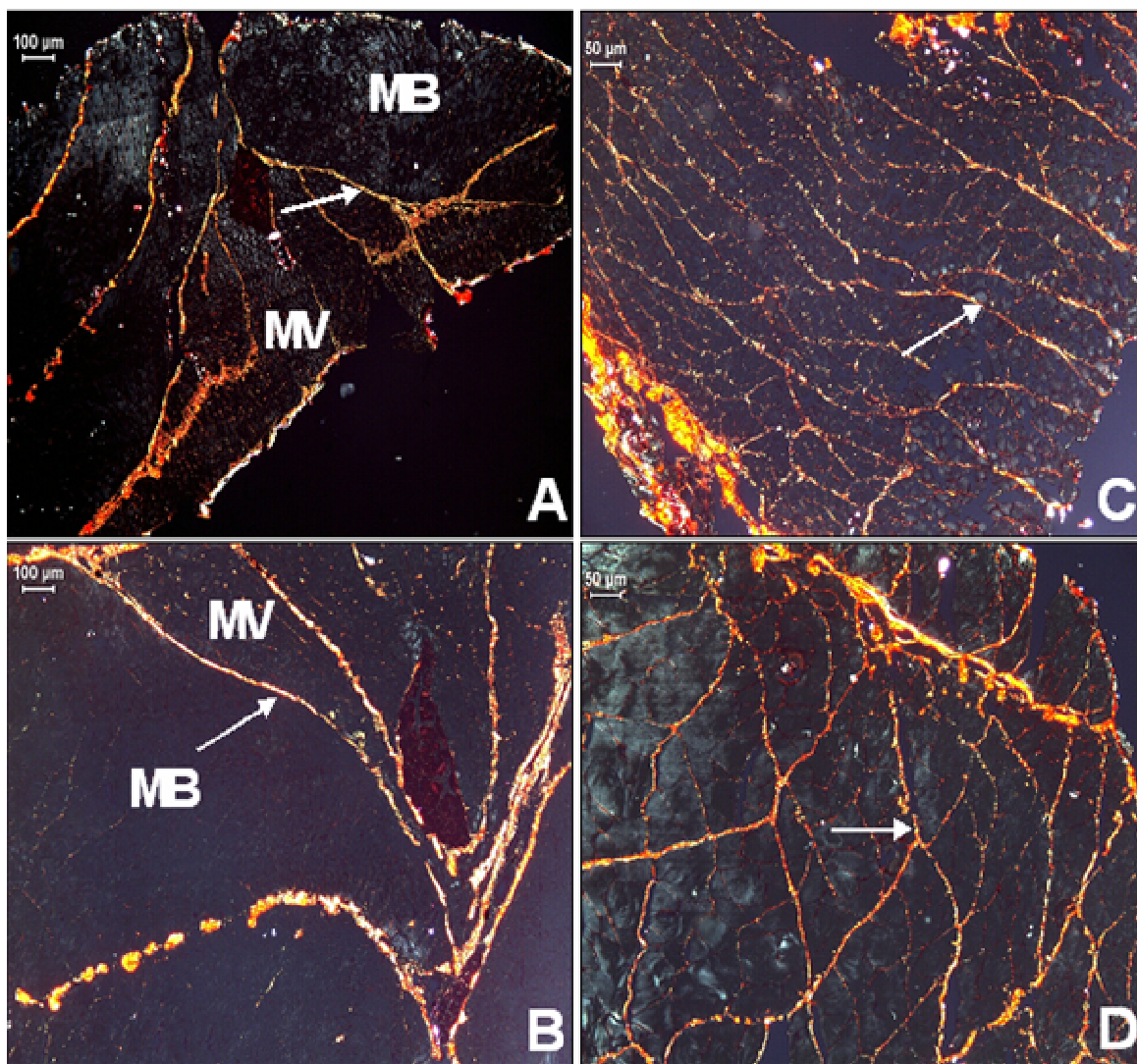


Figura 2: Corte transversal da musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **A e B:** fase juvenil. **C:** fase adulta, musculatura vermelha. **D:** fase adulta, musculatura branca. MV: musculatura vermelha; MB: musculatura branca. Distribuição dos colágenos no endomísio e no perimísio (setas). Picrosirius mais polarização. A e B: barra = 100μ. C e D: barra = 50μ.

A técnica da reticulina revelou a presença de fibras reticulares (principalmente colágeno do tipo III), delgadas, no endomísio das fibras da musculatura branca dos peixes juvenis e uma rede de fibras reticulares mais espessa nas fibras da musculatura branca dos peixes adultos. Nos septos que dividem a musculatura em fascículos e no septo que separa os compartimentos, foram observadas fibras colágenas (principalmente colágeno do tipo I) em associação com fibras reticulares. Nos dois períodos estudados, no endomísio das fibras da musculatura vermelha, as fibras reticulares apresentaram-se mais delgadas e com aspecto descontínuo, quando comparadas com as fibras dos demais compartimentos (Fig. 3).

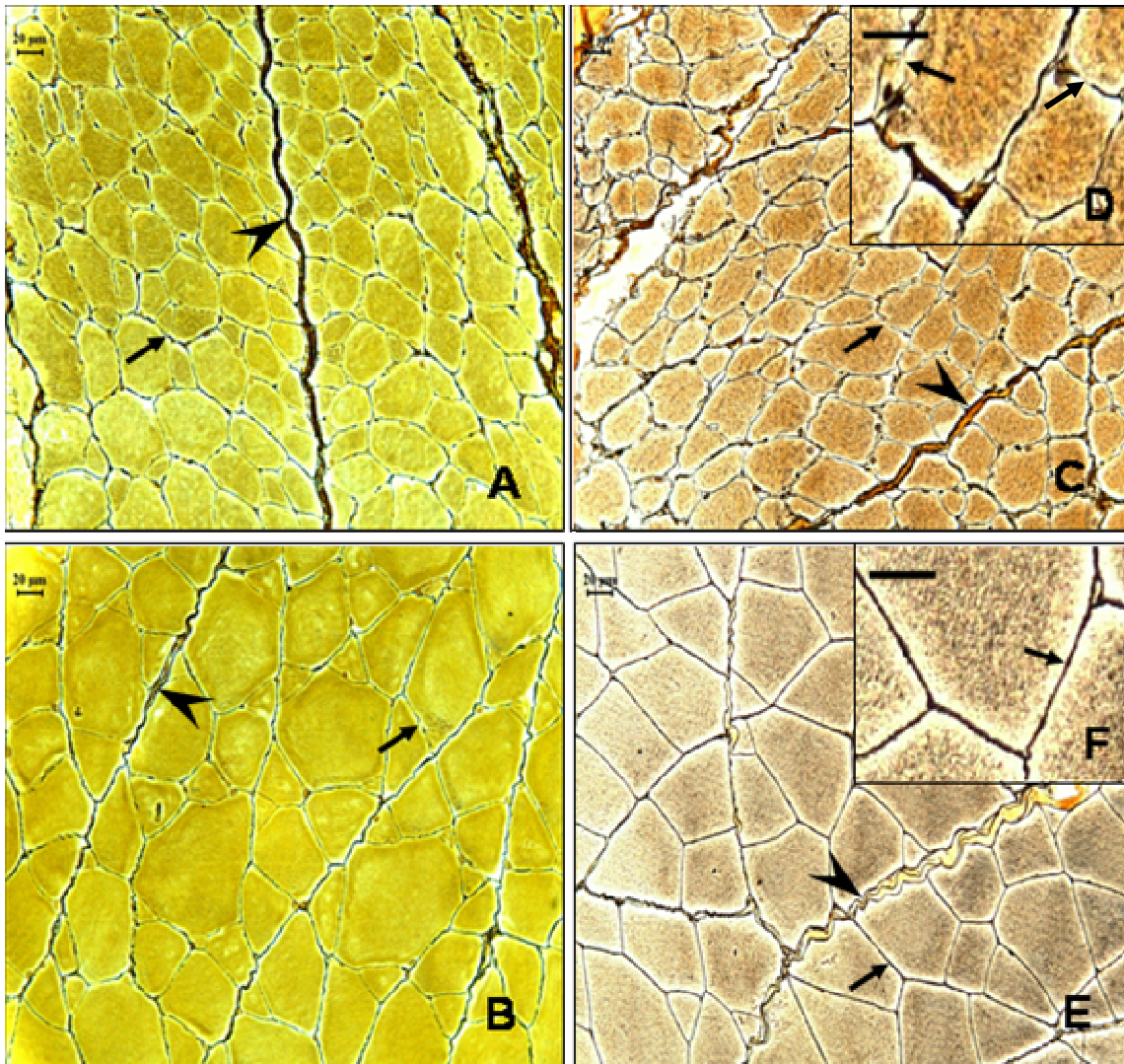


Figura 3: Corte transversal da musculatura estriada do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido à coloração pela reticulina de Gomori, mostrando fibras reticulares em preto (principalmente colágeno do tipo III) e fibras colágenas em dourado (principalmente colágeno do tipo I). **A:** fase juvenil, musculatura vermelha. **B:** fase juvenil, musculatura branca. **C e D:** fase adulta, musculatura vermelha. **E e F:** fase adulta, musculatura branca. Distribuição de fibras reticulares no endomísio (setas) e de fibras colágenas no perimísio (cabeça de seta). Observar as interrupções na marcação para a reticulina no endomísio das fibras na musculatura vermelha em **D** e a marcação contínua para a reticulina no endomísio das fibras na musculatura branca em **F**. Reticulina de Gomori. Barra: 20µm.

Nos dois períodos estudados, o diâmetro das fibras vermelhas foi menor que o das fibras intermediárias que foi menor do que o diâmetro das fibras brancas (Tabela I). Também observou-se uma maior proporção de fibras com diâmetro entre 20-50 μ m, nos 3 tipos de fibras, sendo que nas fibras intermediárias e brancas dos peixes adultos, a proporção de fibras com diâmetro acima de 50 μ m foi maior e a proporção de fibras com diâmetro inferior a 20 μ m foi menor (Tabela II).

Tabela I: Peso (P) e diâmetro das fibras vermelhas (V), intermediárias (I) e brancas (B), no Pacu (*P. mesopotamicus*), nas fases juvenil (J) e adulta (A).

	V	I	B
J	24,72 \pm 10,89	25,89 \pm 8,76	37,10 \pm 15,29
A	24,70 \pm 14,19	38,01 \pm 16,42	41,36 \pm 21,74

Tabela II: Distribuição das fibras Vermelhas (V), Intermediárias (I) e brancas (B) nas classes de diâmetro, no Pacu (*P. mesopotamicus*) nas fases juvenil (J) e adulta (A).

	Tipo de fibra	<20	%	20-50	%	>50	%
J	V	110 b A	23,01	357 a A	74,69	11 a A	2,3
	I	103 b B	21,54	446 a A	93,3	25 a A	5,2
	B	50 a A	10,46	341 a A	71,34	78 b A	16,32
A	V	136 b A	28,45	342 b A	71,55	34 a B	7,11
	I	31 a A	6,48	363 b A	75,94	108 b B	22,59
	B	31 a A	6,48	286 a B	59,83	184 c B	38,49

Letras minúsculas = Comparação de tipos de fibras fixados a fase e as classes de diâmetro

Letras maiúsculas = Comparação entre as fases de crescimento fixados os tipos de fibras e as classes de diâmetro

A técnica de zimografia revelou bandas claras de atividade gelatinolítica com aproximadamente 93, 81, 64 e 57 kDa, que correspondem respectivamente às formas de pró-enzima da MMP-9, enzima ativa da MMP-9, forma intermediária da MMP-2 e forma ativa da MMP-2, na musculatura vermelha e branca em ambas as fases de crescimento analisadas (Figs. 4 e 5).

Nos peixes da fase juvenil, tanto na musculatura vermelha como na branca, a atividade da MMP-2 foi mais intensa do que a da MMP-9 (Figs. 4 a e b e 6). Entretanto, a atividade das duas formas da MMP-2 foi relativamente maior no músculo vermelho, mas sem atingir diferença estatisticamente significante. Já a atividade das formas da MMP-9 foi maior na musculatura vermelha ($P < 0,05$).

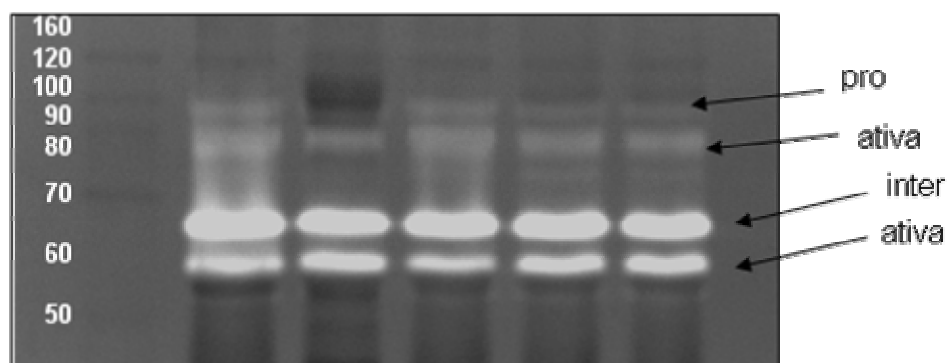


Figura 4a. Zimografia em gelatina mostrando o padrão de atividade gelatinolítica presente no músculo vermelho, fase juvenil. Notar bandas claras de atividade das formas da pro MMP-9 (93KDa), ativa MMP-9 (81KDa); inter MMP-2 (64KDa) e ativa MMP-2 (57KDa).

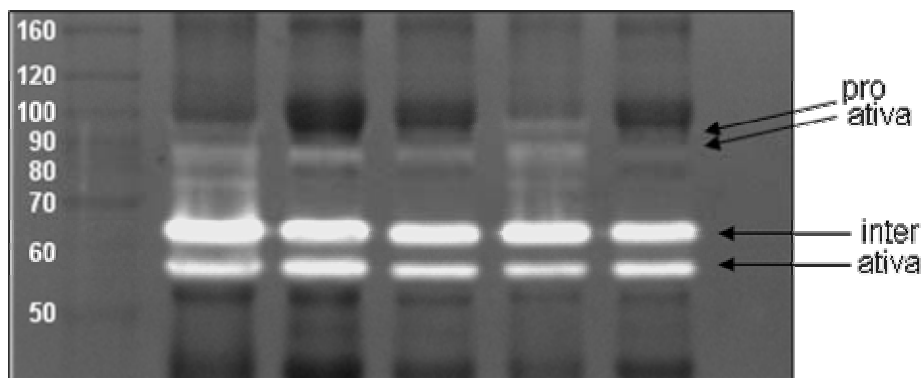


Figura 4b. Zimografia em gelatina mostrando o padrão de atividade gelatinolítica presente no músculo branco, fase juvenil. Notar bandas claras de atividade das formas da pro MMP-9 (93KDa), ativa MMP-9 (81KDa); inter MMP-2(64KDa) e ativa MMP-2 (57KDa).

Nos peixes da fase adulta, nas musculaturas vermelha e branca, a atividade da forma intermediária da MMP-2 foi predominante, sendo estatisticamente mais elevada na musculatura vermelha, junto com a atividade da forma ativa da MMP-2, que foi encontrada exclusivamente neste músculo (Figs. 5 a e b e 7). Em relação à atividade gelatinolítica da MMP9, nos peixes adultos, foram observadas duas bandas com PM 93KDa e 81KDa, que correspondem às formas pró e ativa da MMP-9, respectivamente, somente na musculatura vermelha.

Comparando-se os mesmos tipos de musculaturas nas duas fases de crescimento, pode-se observar que a atividade das diferentes formas das duas enzimas foi significativamente maior na fase juvenil.

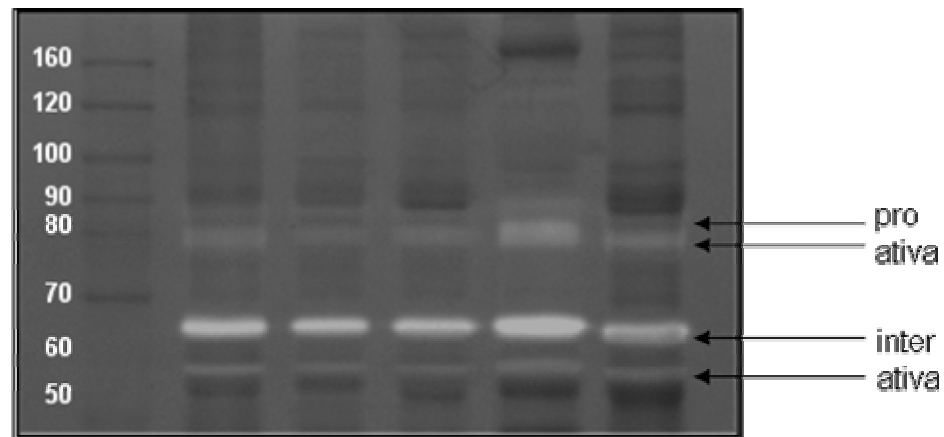


Figura 5a. Zimografia em gelatina mostrando o padrão de atividade gelatinolítica presente no músculo vermelho, fase adulta. Notar bandas claras de atividade das formas da pro MMP-9 (93KDa), ativa MMP-9(81KDa); inter MMP-2(64KDa) e ativa MMP-2 (57KDa).

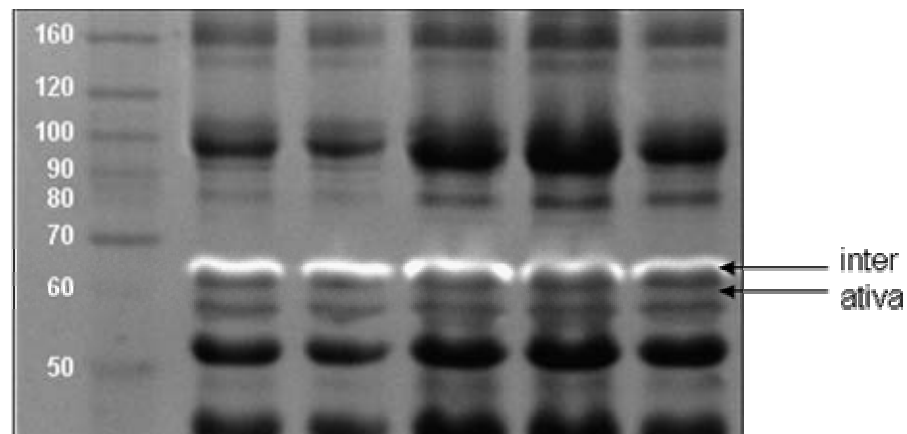


Figura 5b. Zimografia em gelatina mostrando o padrão de atividade gelatinolítica presente no músculo branco, fase adulta. Notar bandas claras de atividade das formas da inter MMP-2 (64KDa) e ativa MMP-2 (57KDa).

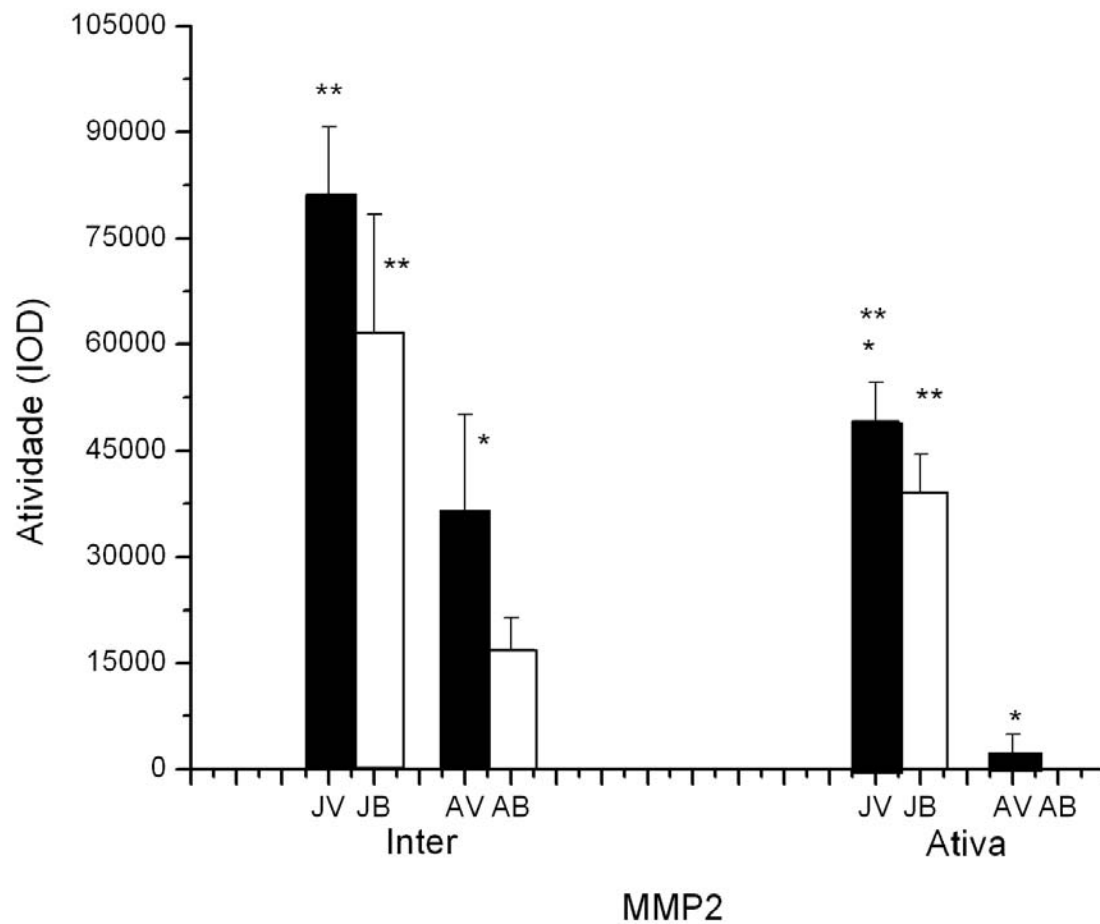


Figura 6: Análise densitométrica das bandas de atividade gelatinolítica da MMP-2 na musculatura do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Inter: forma intermediária da MMP-2 (64kDa); ativa: forma ativa da MMP-2 (57kDa); JV: juvenil vermelho; JB: juvenil branco; AV: adulto vermelho; AB: adulto branco. Os dados estão expressos como média \pm SE. $p < 0.05$.

** Comparação entre Juvenil e Adulto, fixado o tipo de musculatura.

* Comparação entre os tipos de músculo em Juvenil e Adulto.

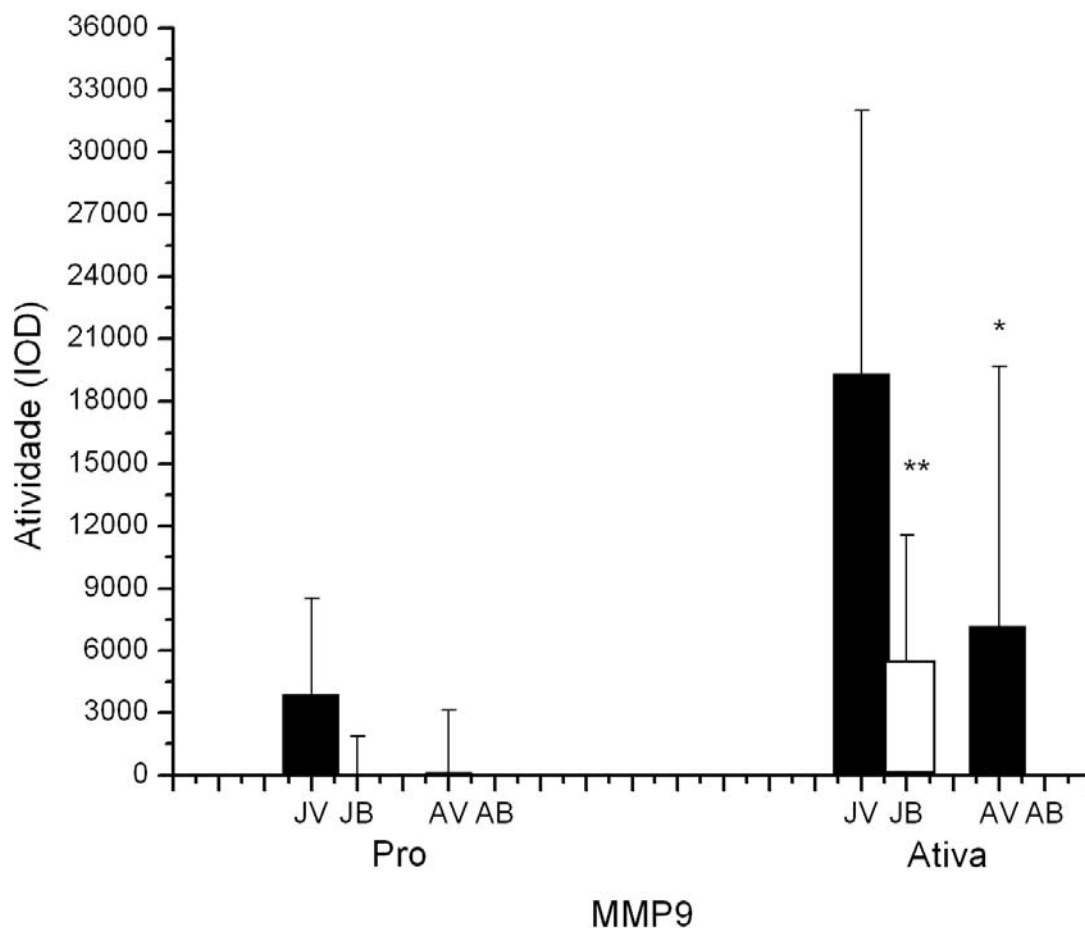


Figura 7: Análise densitométrica das bandas de atividade gelatinolítica da MMP-2 na musculatura do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Pro: forma pro da MMP-9 (93kDa); ativa: forma ativa da MMP-9 (81kDa). JV: juvenil vermelho; JB: juvenil branco; AV: adulto vermelho; AB: adulto branco. Os dados estão expressos como média±SE. $p < 0.05$.

** Comparação entre Juvenil e Adulto, fixado o tipo de musculatura.

* Comparação entre os tipos de músculo em Juvenil e Adulto.

DISCUSSÃO

O músculo esquelético consiste predominantemente de elementos contráteis, mas a íntima associação entre as fibras musculares e o tecido conjuntivo é importante para manutenção da integridade e função do músculo (Cohn and Campbell, 2000; Takala and Virtanen, 2000). Neste estudo, foi avaliada a organização dos compartimentos musculares, o diâmetro das fibras musculares e a associação com o conteúdo de colágeno e a atividade das metaloproteinases no pacu, nas fases de crescimento juvenil e adulta.

A distribuição da musculatura estriada do pacu formando compartimentos é similar ao padrão observado na maioria das espécies de peixes (Johnston, 1999) e reflete as propriedades morfofisiológicas dos tipos de fibras constituintes da musculatura. As fibras da musculatura vermelha possuem um metabolismo aeróbico sendo recrutadas durante as atividades sustentadas, como na migração e captura de alimentos. Já, as fibras da musculatura branca, apresentam metabolismo anaeróbico, atividade de contração rápida, e são utilizadas para realização de movimentos de aceleração, como na fuga de predadores (Johnston, 1999). A musculatura intermediária, apresenta características intermediárias entre a vermelha e a branca (Johnston, 1981; Weatherley and Gill, 1987).

Nos pacus juvenis e adultos do nosso estudo, o diâmetro das fibras vermelhas foi menor que o das fibras intermediárias que foi menor do que o diâmetro das fibras brancas. Para as fibras intermediárias e brancas, nos peixes adultos, a proporção de fibras com diâmetro acima de 50 μ m foi maior, caracterizando um predomínio do crescimento muscular por hipertrofia de fibras. Já nos peixes juvenis, a proporção de fibras com diâmetro inferior a 20 μ m foi maior, indicando o predomínio do crescimento muscular por hiperplasia de fibras (Dal Pai et al., 2000; 2003 a e b). Durante o crescimento muscular por hipertrofia, células progenitoras miogênicas (células satélites) se fundem com fibras musculares existentes aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas; na hiperplasia, ocorre a formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes e posterior diferenciação em novas fibras musculares (Rowlerson and Veggetti, 2001).

O balanço entre os mecanismos de crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico reflete-se na celularidade muscular e esses processos podem afetar o número e o diâmetro ou área das fibras musculares (Johnston 1999; 2002; 2003a e b). No nosso estudo, o maior número de fibras pequenas nas musculaturas intermediária e branca nos peixes juvenis,

demonstra que há uma densidade maior de fibras por área, nessa fase do crescimento, se compararmos com as fibras das musculaturas intermediária e branca, nos peixes adultos, que apresentaram diâmetros maiores.

Nos peixes, a distribuição do tecido conjuntivo no músculo é específica para cada espécie (Ando et al., 1992) e a concentração de colágeno também varia na dependência do comportamento e da atividade realizada nos movimentos natatórios (Sato et al., 1986; Ofstad et al., 1996); porém, é menor do que o conteúdo de colágeno existente nos mamíferos (Sato et al., 1989).

No nosso estudo, a musculatura nos peixes adultos mostrou maior quantidade de fibras colágenas do que os peixes juvenis, nos três tipos de musculatura. Segundo Sato et al., 1989, durante a ontogênese ocorre um aumento do conteúdo de colágeno, associado à alterações qualitativas. Segundo o autor, é possível que o conteúdo de colágeno na matriz extracelular do músculo aumente com o envelhecimento. No pacu, durante o crescimento houve um aumento do colágeno na musculatura e esse fato pode refletir também as propriedades biomecânicas da musculatura nessas fases de crescimento (Kovanen et al., 1984; 1989).

Considerando-se os peixes na fase adulta, a presença de colágeno mais desenvolvido na musculatura vermelha pode estar relacionado com o menor diâmetro das fibras musculares o que acarreta a maior densidade de fibras e maior conteúdo de colágeno (Sikorski et al., 1984); isso pode contribuir também para a maior consistência e rigidez da musculatura vermelha (Kovanen et al., 1984; Grosselin et al., 1998). Conforme Periago et al., 2005, na musculatura de peixes que apresentam maior densidade de fibras musculares, o tecido conjuntivo é mais abundante e isso pode refletir na textura mais firme da musculatura.

A musculatura branca dos peixes adultos revelou a presença de colágeno III mais espesso e distribuído de forma contínua. Já, na musculatura vermelha, as fibras reticulares apresentaram-se mais delgadas e com aspecto descontínuo.

A expressão do colágeno intramuscular é influenciada pelo fenótipo e pelo padrão de atividade da fibra (Kovanen et al., 1980; 1984). Os colágenos fibrilares do tipo I e III são isoformas primárias encontradas no músculo sendo que o colágeno do tipo I, formado por fibras mais grossas, está associado com a rigidez, sendo encontrado em maior quantidade

no músculo vermelho e o colágeno do tipo III, constituído por fibras mais finas, ramificadas e delicadas, está associado com a distensão e maleabilidade do músculo branco (Miller et.al, 2001). Assim, a distribuição do colágeno III na musculatura branca dos peixes adultos no nosso estudo, pode contribuir para a maior maciez da musculatura branca.

O metabolismo do colágeno é controlado por várias enzimas proteolíticas, entre as quais, as pertencentes à superfamília das metaloproteinases (MMPs) (Woessner and Nagase, 2000). No músculo estriado esquelético, são importantes para a remodelação da matriz extracelular que ocorre nas várias condições adaptativas dos músculos (Bernocchi et al., 2003). São secretadas por vários tipos celulares como, células de schwann (Yamada et al., 1995), células satélites musculares (Guerin et al., 1995) e fibroblastos (Scott et al., 1998).

As metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 possuem a capacidade de degradar vários componentes da matriz extracelular incluindo colágenos fibrilares dos tipos I (Aimes and Quigley, 1995), II e III, e colágenos não fibrilares dos tipos IV e V (Okada et al., 1990). A MMP9 degrada os mesmos substratos e é produzida principalmente por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos (Stahle-Backdahi et al., 1994) e linfócitos (Montgomery et al., 1993).

No músculo estriado de mamíferos, as MMPs participam de alterações degenerativas e com a perda de massa muscular na desnervação (Nihei and Monckton, 1980; Kobayashi et al., 1997; Demestre et al., 2005); são ativadas em várias miopatias e em condições inflamatórias (Kieseier et al., 1999) e após a estimulação elétrica crônica (Haas et al., 2000). Carmeli et al., 2005 observaram uma expressão diferencial das MMPs -2 e -9 em músculos rápidos e lentos, submetidos a exercício físico de alta intensidade; a atividade da MMP-2 foi mais intensa nos músculos rápidos e a atividade da MMP-9 não foi alterada.

Em peixes, embora a função das MMPs no músculo estriado esquelético não esteja bem definida, tem sido descrito que essas proteinases estão envolvidas com a desintegração do tecido conjuntivo do músculo que ocorre durante a época da desova (Ito et al., 1992; Kubota et al., 2000) e participam da degradação muscular *post mortem* que ocorre durante a estocagem (Sato et al., 1997; Saito et al., 2000a e b).

Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, uma expressão diferencial das MMPs -2 e -9, considerando-se o tipo de musculatura e a fase de crescimento muscular em peixes. Ambas MMP-2 e -9 apresentaram maior atividade nos peixes da fase juvenil, sendo a MMP-2 com maior atividade, em grau maior na musculatura vermelha. Nos peixes adultos, a MMP2 foi mais ativa no músculo vermelho e a MMP-9 foi exclusiva do músculo vermelho.

A maior atividade das MMPs no pacu na fase juvenil pode estar relacionada com a dinâmica do crescimento muscular predominantemente hiperplásico, característico deste período, associado à hipertrofia das fibras pré existentes. Esses mecanismos de crescimento requerem o remodelamento constante da matriz extracelular ao redor das fibras.

Nos peixes adultos, a matriz extracelular muscular é mais estável e o crescimento muscular ocorre predominantemente por hipertrofia. Isso pode explicar a baixa atividade das MMPs. No entanto, é provável que a expressão aumentada da MMP-2 na musculatura vermelha dos peixes adultos esteja envolvida com o turnover mais acentuado da matriz extracelular, que pode estar relacionado com a atividade fisiológica sustentada da musculatura, fato que também está associado à maior concentração de colágeno tipo I. Por outro lado, tem sido demonstrado também que, essa MMP não está envolvida somente com a remodelação da matriz extracelular, mas também atua degradando proteínas intracelulares, como a troponina I (Cheung et al., 2000) e miosina de cadeia leve (Sawicki et al., 2005). Como a musculatura vermelha é utilizada para a realização de movimentos lentos e sustentados (Johnston et al., 1972; Mosse and Hudson, 1977; Johnston, 1980), a MMP2 pode estar envolvida com o maior turnover e renovação das proteínas musculares.

A expressão da MMP-9 normalmente está associada à processos patológicos do músculo esquelético (Montgomery et al., 1993; Stahle-Backdahi et al., 1994; Allen et al., 1999; Carmeli et al., 2005). Porém, foi demonstrado que a MMP-9 também pode ser secretada por células satélites ativadas (Huges and Blau, 1990; Guerin et al., 1995; Kherif et al., 1999), presentes em maior proporção nos músculos vermelhos (Kadi et al., 2005). Assim, a maior atividade da MMP-9 no músculo vermelho juvenil e adulto pode estar relacionada com um maior recrutamento de células satélites para a formação de novas

fibras musculares na fase juvenil e com a constante renovação das proteínas musculares na fase adulta.

Em conclusão, nossos resultados mostram que, no pacu, o padrão de crescimento e de atividade muscular, estão diretamente relacionados com a organização, o conteúdo de colágeno e a atividade das metaloproteinases. Esse estudo pode contribuir para a avaliação e o entendimento dos fatores que podem influenciar a relação entre a celularidade muscular e a matriz extracelular influenciando na qualidade da carne.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995; 270: 5872-76.

Alami-durante H, Fauconneau B, Rouel M, Escaffre AM, Bergot P. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth raye. *J Fish Biol* 1997; 50: 1285-1302.

Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* 1999; 22: 1350-60.

Ando M, Toyohara H, Sakaguchi M. Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by desintegration of collagen fibers in the pericellular connective tissue. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1992; 58: 567-70.

Bancroft J, Steven A. *Theory and Practice of Histological Tequiniques*. 3rd ed. Churchill Livingstone 1991; New York, 704p.

Bernocchi P, Cargnoni A, Vescovo G, Dalla LL, Parrinello G, Boraso A, et al. Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy. *Basic Res Cardiol* 2003; 98(2): 114-23.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review *Crit Ver Oral Biol Med* 1993; 4: 197-250.

Bradford MM, Arapid and sensitive method for the quantification of micogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye biding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

Carmeli E, Moas M, Lennon S, Power SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol* 2005; 90(4): 613-19.

Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle Nerve* 2004; 29: 191-97.

Cohn RD, Campbel KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1456-71.

Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000; 101: 1833-39

Chin JR, Werb Z. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration, and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development* 1997; 124: 1519-30.

Dal Pai V, Dal Pai Silva M, Carvalho ED, Fujihara CY, Gregório EA, Curi PR, et al. Morphological, Histochemical and Morphometric Study of the Myotomal Muscle Tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*: Holmberg, 1887): Serrasalminae, Characidae, Teleostei . *Anatomia Histologia Embriologia* 2000; 29: 283-89.

Dal Pai Silva M, Carvalho RF, Pellizzon CH, Dal Pai V. Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell* 2003a; 35(3): 179-87.

Dal Pai Silva M, Freitas EMS, Dal Pai V, Rodrigues AC. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Archive of Fishery And Marine Research* 2003b; 50 (2): 149-60.

Demestre M, Orth M, Wells M, Gearing AJ, Hughes RAC, Gregson NA. Characterization

of matrix metalloproteinases in denervated muscle. *Neurobiology and Applied Neurobiology* 2005; 31: 545-55.

Fauconneau B, Chamaitilly J, Andre S, Cardinal M, Cornet J, Vallet JL, et al. Characteristics of rainbow trout flesh: I Chemical composition and cellularity of muscle and adipose tissues. *Sciences des Aliments* 1993; 13: 173-87.

Goldspink G, Wilkes D, Steven E. Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth and adaptation. In: Johnston IA, editor. *Muscle Development and growth*. London: Academic Press 1972; 318p.

Goodman, LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics* 1964; 35(2): 716-25.

Goodman, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics* 1965; 7(2): 247-54.

Grosselin IE, Adams C, Cotter TA, McCormick RJ, Thomas DP. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix. *J Appl Physiol* 1998; 87: 1011-16.

Guerin, CW, Holland PC. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteinases by human skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* 1995; 202(1):91-99.

Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H1540-H47.

Hatae K, Yoshimatsu F, Matsumoto JJ. Role of muscle fibres in contributing firmness of cooked fish *J Food Sci* 1990; 55: 693-96.

Hughes, SM, Blau HM. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature* 1990; 345: 350-53.

Hurling R, Rodell JB, Hunt HD. Fibre diameter and fish texture. *J Texture Studies* 1996; 27: 679-85.

Ito K, Toyohara H, Sakaguchi M. Desintegration of the pericellular connective tissue of ayu muscle in the spawning season relevant to softening. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; 58: 1553.

Johnston IA. Specializations of fish muscle. In: Goldspink, DF (Ed), *Development and Specializations Muscle*. Soc Exp Biol Sem Ser 1980; 7: 123-48.

Johnston IA. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Res* 1981; 214: 369-79.

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

Johnston IA, Alderson R, Sandham C, Dingwall A, Mitchell D, Selkirk C, et al. Muscle fibre density in relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture* 2000a; 189: 335-49.

Johnston IA, Frearson N, Goldspink G. Myofibrillar ATPases activities of red and white myotomal muscles of marine fish. *Experientia* 1972; 28(6): 713-4.

Johnston IA, Manthri S, Alderson R, Smart A, Campbell P, Mitchell D, et al. Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping. *Aquaculture* 2002; 210: 259-83.

Johnston IA, Manthri S, Alderson R, Smart A, Campbell P, Nickell D, et al. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *J Exp Biol* 2003a; 206: 1337-51.

Johnston IA, Manthri S, Smart A, Campbell P, Nickell D, Alderson R, et al. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J Exp Biol* 2003b; 206: 3425-35.

Johnston IA, McIay HA, Abercromby M, Robbins D. Early thermal experience has different effects on growth and muscle fibre in spring and autumn-running Atlantic salmon population. *J Exp Biol* 2000d; 203: 2553-64.

Jung K, Lein M, Ulbrich N, Rudolph B, Henke W, Schnorr D, et al. Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostatic tissue: Analytical aspects. *Prostate* 1998; 34: 130-36.

Junqueira LCV, Bignolas Bretani PR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue sections. *J Histochem* 1979; 11: 445-47.

Kadi F, Charifi N, Henriksson J. The number of satellite cells in slow and fast fibres from human vastus lateralis muscle. *Histochem Cell Biol* 2005; 126: 83-87.

Kieseier BC, Seifert T, Giovannoni G, Hartung HP. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology* 1999, 53: 20-25.

Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve* 1997; 20: 858-66.

Koumans JTM, Akster HA, Witkam A, Osse JWM. Numbers of muscle nuclei myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). J Fish Biol 1995; 44: 391-408.

Kovanen V, Suominen H. Age and training-related changes in the collagen metabolism of rat skeletal muscle. Eur J Appl Physiol 1989; 58: 765-771.

Kovanen V, Suominen H, Heikkinen E. Connective tissue of "fast" and "slow" skeletal muscle in rats effects of endurance training. Acta Physiol Scand 1980; 108: 173-80.

Kovanen V, Suominen H, Heikkinen E. Mechanical properties of fast and slow skeletal muscle with special reference to collagen and endurance training. J Biomech 1984; 17: 725-35.

Kubota S, Kinoshita M, Yokoyama Y, Toyohara H, Sakaguchi M. Introduction of gelatinolytic activities in ayu muscle at the spawning stage. Fish Sci 2000; 66: 574-78.

Kubota M, Kinoshita M, Takeuchi K, Kubota S, Toyohara H, Sakaguchi M, et al. Solubilization of type I collagen from fish muscle connective tissue by matrix metalloproteinase-9 at chilled temperature. Fish Sci 2003a; 69: 1053-59.

Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdier-Sahuque M, et al. Expression of metalloproteinase 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and *mdx* muscles. Dev Biol 1999; 205(1): 158-170.

Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, Major AK, Scalkise D, Delp MD et al. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 28(1): 1710-17.

Montgomery AM, Sabzevari H, Reisfeld RA. Production and regulation of gelatinase B by human T-cells. Biochim Biophys Acta 1993; 1176(3): 265-68.

Montero P, Borderas J. Influence of age on muscle connective tissue in trout (*Salmo irideus*) muscle. J Sci Food Agric 1990; 52: 141-46.

Mosse PRL, Hudson TCL. The functional roles of different muscle fibre types identified in the myotomes of marine teleost: a behavioural, anatomical and histochemical study. J Fish Biol 1977; 11: 417-30.

Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? Curr Opin Cell Biol 1999; 11: 614-21.

Nihei T, Monckton G. A study of protein metabolism in denervation and reinnervation following sciatic nerve crush. FEBS Lett 1980; 119: 275-78.

Norman GR, Streiner, DL. Biostatistics – The Bare Essentials, Mosby Year Book, Inc St Louis 1993; 260p.

Ofstad R, Egelanddal B, Kidman S, Myklebust R, Olsen RL, Hermansson AM. Liquid loss as affected by post mortem ultrastructural changes in fish: cod (*Gadus morhua*, L.) and salmon (*Salmo salar*). J Food Agric 1996; 71: 301- 12.

Okada Y, Mordomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, et al. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of precursor and enzymic properties. Eur J Biochem 1990; 194(3): 721-30.

Periago MJ, Ayala MD, López-Albors O, Abdel I, Martinez C, Garcia-Alcázar A, et al. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Aquaculture 2005; 249: 175-88.

Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. Eur Resp J 1994; 7: 2062-72.

Rowlerson A, Veggetti A. Cellular Mechanisms of Post- Embryonic Muscle Development and Growth. Academic Press 2001; 18: 103-40.

Rowlerson A, Veggetti A. Cellular Mechanisms of Post- Embryonic Muscle Development and Growth. Academic Press 2001; 18: 103-40.

Saito M, Kunisaki N, Urano N, Kimura S. Characterization of cDNA clone encoding the matrix metalloproteinase 2 from rainbow trout fibroblast. Fisheries Sci 2000a; 66: 334-42.

Saito M, Sato K, Kunusaki N, Kimura S. Characterization of a rainbow trout matrix metalloproteinase capable of degrading type I collagen. Eur J Biochem 2000b; 267: 6943-50.

Sato K, Ando M, Kubota S, Origasa K, Kawase H, Toyohara H, et al. Involvement of type v collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. Journal of Agriculture and Food Chemistry 1997; 45: 343-48.

Sato T, Foged NT, Delaissé JM. The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. J Bone Mineral Res 1998; 13: 59-66.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Shimizu Y. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. Bull Jpn Soc Sci Fish 1986; 52: 1595-1600.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Ikeda S. A simplified method for determining collagen in fish muscle. Bull Jpn Soc Sci Fish 1986a; 52: 889-93.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Itoh Y, Sato M. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. Comparative Biochemistry Physiology 1989; 92B: 87-91.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Shimizu Y. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bull Jpn Sci Fish* 1986b; 52: 1595-600.

Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG, et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 2005; 112(4): 544-52.

Sikorski ZE, Scott DN, Buisson DH. The role of collagen in the quality and processing of fish. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1984; 20: 301-43.

Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FBS Lett* 1998; 441(1): 137-40.

Stahle-Backdahi M, Inoue M, Guidice GJ, Parks WC. 92-KD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the extracellular domain of recombinant 180-KD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994; 93(5): 2022-30.

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541-73.

Taboga SR, De Campos Vidal B. Collagen fibres in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. *J Submicrosc Cytol* 2003; 35 (1): 11-16.

Takata TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10: 321-25.

Valente LMP, Rocha E, Gomes EFS, Silva MW, Oliveira MH, Monteiro RAF, et al. Growth dynamics of White and red muscles in fast and slow growing strains of rainbow trout. *J Fish Biol* 1999; 55: 675-91.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development* 2000; 17: 2123-33.

Yamada T, Yoshiyama Y, Sato H, Seiki M, Shinagawa A, Takahashi M, et al. White matter microglia produce membrane-type matrix metalloproteinase, an activator of gelatinase A, in human brain tissues. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995; 90(5): 421-24.

Zar JH, *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall 1999; 4th ed: New Jersey, 663p.

Weatherley AH, Gill HS. Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth. *Experientia* 1985; 41: 353-54.

Weatherley AH, Gill HS. *The biology of fish growth*. Academic Press, London, 1987.

Weatherley AH, Gill HS, Lobo AF. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J Fish Biol* 1988; 33: 851-59.

Werb Z, Chin JR. Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 857: 110-18.

Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA. Metalloproteinase activities expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicles. *Biol Reprod* 1992; 47: 683-91.

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinase and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-54.

Woessner JF, Nagase H. *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. Oxford University Press 2000, New York.

6. Conclusões Gerais

- Diferenças no padrão de crescimento e atividade muscular no pacu, influenciam na organização, no conteúdo de colágeno e na atividade das MMPs.
- O maior conteúdo de colágeno e a maior atividade das MMPs no músculo vermelho dos peixes adultos está relacionado com as características fisiológicas desta musculatura.
- A maior atividade das MMPs na musculatura dos peixes juvenis está relacionada com a maior remodelação da matriz durante essa fase do crescimento.
- As características diferenciais quanto a organização do colágeno e a atividade das MMPs podem contribuir para as diferenças de firmeza e maciez encontradas entre as musculaturas vermelha e branca, respectivamente.

7. Referências Bibliográficas Gerais

Aidos I, Lie O, Espe M. Collagen Content in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). J Agric Food Chem 1999; 47: 1440-44.

Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. J Biol Chem 1995; 270: 5872-76.

Akster HA. A comparative study of fibre type characteristics and terminal innervation in head and axial muscle of carp (*Cyprinus carpio L.*): a histochemical and electronmicroscopical study. Neth J Zool 1983; 33: 164-88.

Alami-durante H, Fauconneau B, Rouel M, Escaffre AM, Bergot P. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to growth raye. J Fish Biol 1997; 50: 1285-1302.

Alexander R. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. J Mar Biol Assoc UK 1969; 49: 263-90.

Allen DL, Roy RR, Edgerton VR. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. Muscle Nerve 1999; 22: 1350-60.

Ando M, Toyohara H, Sakaguchi M. Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by desintegration of collagen fibers in the pericellular connective tissue. Bull Jpn Soc Sci Fish 1992; 58: 567-70.

Assis JMF, Carvalho RF, Barbosa L, Agostinho CA, Dal Pai Silva, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 2004; 237: 251-67.

Avery NC, Sims TJ, Warkup C, Bailey AJ. Collagen cross-linking in porcine M. longissimus lumborum: Absence of a relationship with variation in texture at pork weight. *Meat Sci* 1996; 42: 355-69.

Bailey AJ, Sims TJ. Meat tenderness: distribution of molecular species of collagen in bovine muscle. *J Sci Food Agric* 1977; 28(6): 565-70.

Bailey, AJ, Light ND. Structure and localization of connective tissue components in muscle. In: *Connective Tissue in Meat and Meat Products*. Elsevier Science Publishing Co 1989; New York.

Bancroft J, Steven A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd ed. Churchill Livingstone 1990; New York, 704p.

Bar-shai M, Carmeli E, Coleman R, Rozen N, Perk S, Fuchs D, et al. The effect of hindlimb immobilization on acid phosphatase metalloproteinases and nuclear factor-kappaB in muscles of young and old rats. *Mech Ageing Dev* 2005; 126(2): 289-97.

Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 64: 232-40.

Bayne EK, Anderson MJ, Fambrough DM. Extracellular matrix organization in developing muscle: correlation with acetylcholine receptor aggregates. *J Cell Biol* 1984; 99 (4Pt): 1486-1501.

Bernardino G, Colares De Melo JS. Estimativa do tamanho mínimo da amostra de pacu (*Piaractus mesopotamicus*. Holmberg. Holmberg. 1887). em monocultura em viveiros experimentais. Boletim Técnico do CEPTA. 2. 75-89. 1989.

Bernocchi P, Cargnoni A, Vescovo G, Dalla LL, Parrinello G, Boraso A, et al. Skeletal muscle abnormalities in rats with experimentally induced heart hypertrophy. Basic Res Cardiol 2003; 98(2): 114-23.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review Crit Ver Oral Biol Med 1993; 4: 197-250.

Borg TC, Caulfield JB. Morphology of connective tissue in skeletal muscle. Tissue cell 1980; 12(1): 197-207.

Bradford MM, Arapid and sensitive method for the quantification of micogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye biding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

Brew K, Dinakarbandia ND, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta 2000; 1477: 267-83.

Brodeur JC, Calvo J, Johnston IA. Proliferation of myogenic progenitor cells following feeding in the sub-antartic notothenoid fish *Harpagifer bispinis*. J Exp Biol 2002; 206: 163-69.

Carmeli E, Moas M, Lennon S, Power SK. High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. Exp Physiol 2005; 90(4): 613-19.

Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. Muscle Nerve 2004; 29: 191-97.

Carvalho RF, Dariolli R, Justulin LA, Sugizaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC, et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int Exp Path* 2006; aceito para publicação.

Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000; 101: 1833-39.

Chin JR, Werb Z. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration, and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development* 1997; 124: 1519-30.

Cohn RD, Campbel KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1456-71.

Dal Pai Silva M, Carvalho RF, Pellizzon CH, Dal Pai V. Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell* 2003a; 35(3): 179-87.

Dal Pai Silva M, Freitas EMS, Dal Pai V, Rodrigues AC. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Archive of Fishery And Marine Research* 2003b; 50 (2): 149-60.

Dal Pai V, Dal Pai Silva M, Carvalho ED, Fujihara CY, Gregório EA, Curi PR, et al. Morphological, Histochemical and Morphometric Study of the Myotomal Muscle Tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*: Holmberg, 1887): Serrasalminae, Characidae, Teleostei . *Anatomia Histologia Embriologia* 2000; 29: 283-89.

Demestre M, Orth M, Wells M, Gearing AJ, Hughes RAC, Gregson NA. Characterization of matrix metalloproteinases in denervated muscle. *Neupathology and Applied Neurobiology* 2005; 31: 545-55.

Driedzic WR, Hochachka PW. Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am J Physiol* 1976; 230: 579-82.

Duance VC, Black CM, Dubowitz V, Hughes GH, Bailey AJ. Polymyositis an immunofluorescence study on the distribution of collagen types. *Muscle Nerve* 1980; 3(6): 487-90.

Duance VC, Restall DJ, Beard H, Boume FJ, Balley AJ. The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1977; 79 (2): 248-52.

Eldridge CF, Sanes JR, Chiu AY, Bunge RP, Combrooks CJ. Basal lamina associated heparan sulphate proteoglycan in rat PNS: characterization and localization using monoclonal antibodies. *J Neurocytol* 1986; 15(1): 37-51.

Fauconneau B, Chamaitilly J, Andre S, Cardinal M, Cornet J, Vallet JL, et al. Characteristics of rainbow trout flesh: I Chemical composition and cellularity of muscle and adipose tissues. *Sciences des Aliments* 1993; 13: 173-87.

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

Foidart M, Foidart JM, Engel WK. Collagen localization in normal and fibrotic human skeletal muscle. *Arch Neurol* 1981; 38(3): 152-7.

Giannelli G, De Marzo A, Marinosci F, Antonaci S. Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy. *Histol Histopathol* 2005; 20(1): 99-106.

Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He CS, et al. Human 72-kilodalton type-IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989; 86: 8207-11.

Goldspink G, Wilkes D, Steven E. Myosin expression during ontogeny, post-hatching growth and adaptation. In: Johnston IA, editor. Muscle Development and growth. London: Academic Press 1972; 318p.

Gomez De, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Bioll 1997; 74: 111-22.

Goodman, LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. Annals of Mathematics Statistics 1964; 35(2): 716-25.

Goodman, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. Technometrics 1965; 7(2): 247-54.

Greene J, Wang MS, Liu YLE, Raymond LA, Rosen C, Shi YNE, et al. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. J Biol Chem 1996; 271: 30375-380.

Grizzle JM, Rogers WA. Anatomy and histology of the channel cat fish. Albuin University Agricultural Experimen Station, Opelika 1979; 94p.

Grosselin IE, Adams C, Cotter TA, McCormick RJ, Thomas DP. Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix. J Appl Physiol 1998; 87: 1011-1016.

Guerin, CW, Holland PC. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteinases by human skeletal muscle satellite cells. Dev Dyn 1995; 202(1): 91-99.

Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, et al. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H1540-H47.

Hallet IC, Bremner HA. Fine structure of the myommatum-muscle fibre junction in hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *J Sci Food Agric* 1988; 44: 245-61.

Hatae K, Yoshimatsu F, Matsumoto JJ. Role of muscle fibres in contributing firmness of cooked fish *J Food Sci* 1990; 55: 693-96.

Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 2814-18.

Hughes, SM, Blau HM. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature* 1990; 345: 350-53.

Hurling R, Rodell JB, Hunt HD. Fibre diameter and fish texture. *J Texture Studies* 1996; 27: 679-85.

Inoue S. Ultrastructure of basement membranes. *Int Rev Citol* 1989; 117: 57-98.

Ito K, Toyohara H, Sakaguchi M. Desintegration of the pericellular connective tissue of ayu muscle in the spawning season relevant to softening. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; 58: 1553.

Johnston IA, Alderson D, Sandham C, Mitchell D, Selkirk C, Dingwall A, et al. Patterns of muscle growth in early and late maturing population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 2000a; 189: 307-33.

Johnston IA, Alderson R, Sandham C, Dingwall A, Mitchell D, Selkirk C, et al. Muscle fibre density in relation to colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture* 2000b; 189: 335-49.

Johnston IA, Frearson N, Goldspink G. Myofibrillar ATPases activities of red and white myotomal muscles of marine fish. *Experientia* 1972; 28(6): 713-4.

Johnston IA, Manthri S, Alderson R, Smart A, Campbell P, Mitchell D, et al. Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping. *Aquaculture* 2002; 210: 259-83.

Johnston IA, Manthri S, Alderson R, Smart A, Campbell P, Nickell D, et al. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *J Exp Biol* 2003a; 206: 1337-51.

Johnston IA, Manthri S, Smart A, Campbell P, Nickell D, Alderson R, et al. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. *J Exp Biol* 2003b; 206: 3425-35.

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

Johnston IA. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Res* 1981; 214: 369-79.

Johnston IA. Specializations of fish muscle. In: Goldspink, DF (Ed), *Development and Specializations Muscle*. *Soc Exp Biol Sem Ser* 1980; 7: 123-48.

Johnston IA, Mclay HA, Abercromby M, Robbins D. Early thermal experience has different effects on growth and muscle fibre in spring and autumn-running Atlantic salmon population. *J Exp Biol* 2000d; 203: 2553-64.

Jung K, Lein M, Ulbrich N, Rudolph B, Henke W, Schnorr D, et al. Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostatic tissue: Analytical aspects. *Prostate* 1998; 34: 130-36.

Junqueira LCV, Bignolas Bretani PR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue sections. *J Histochem* 1979; 11: 445-47.

Kadi F, Charifi N, Henriksson J. The number of satellite cells in slow and fast fibres from human vastus lateralis muscle. *Histochem Cell Biol* 2005; 126: 83-87.

Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdier-Sahuque M, et al. Expression of metalloproteinase 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and *mdx* muscles. *Dev Biol* 1999; 205(1): 158-170.

Kieseier BC, Seifert T, Giovannoni G, Hartung HP. Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology* 1999, 53: 20-25.

Kim JT, Kim MS, Bae MK, Song HS, Ahn MY, Kim YJ, et al. Cloning and characterization of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) from shark, *Scyliorhinus torazame*. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1517: 311-15.

Kimiya T, Kubota S, Kono M, Hirata M, Toyohara H, Morioka K, et al. Solubilization of type I and V collagens in Japanese flounder muscle during chilled storage. *Fisheries Science* 2005 71: 672-78.

Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 2004; 84 (2): 649-98.

Kobayashi J, Mackinnon SE, Watanabe O, Ball DJ, Gu XM, Hunter DA, et al. The effect of duration of muscle denervation on functional recovery in the rat model. *Muscle Nerve* 1997; 20: 858-66.

Koumans JTM, Akster HA, Witkam A, Osse JWM. Numbers of muscle nuclei myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *J Fish Biol* 1995 44: 391-408.

Kovanen V, Suominen H, Heikkinen E. Mechanical properties of fast and slow skeletal muscle with special reference to collagen and endurance training. *J Biomech* 1984; 17: 725-35.

Kovanen V, Suominen H, Heikkinen E. Connective tissue of "fast" and "slow" skeletal muscle in rats effects of endurance training. *Acta Physiol Scand* 1980; 108: 173-80.

Kovanen V, Suominen H. Age and training-related changes in the collagen metabolism of rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 1989; 58: 765-771.

Kubota M, Kinoshita M, Takeuchi K, Kubota S, Toyohara H, Sakaguchi M, et al. Solubilization of type I collagen from fish muscle connective tissue by matrix metalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish Sci* 2003a; 69: 1053-59.

Kubota S, Kinoshita M, Uji S, Yokoyama Y, Yamamoto E, Hirono L, et al. Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in teleost fish. *Biochim Biophys Acta* 2003b; 1629: 102-08.

Kubota S, Kinoshita M, Yokoyama Y, Toyohara H, Sakaguchi M. Introduction of gelatinolytic activities in ayu muscle at the spawning stage. *Fish Sci* 2000; 66: 574-78.

Lehto MK, Kvist M, Vieno T, Jozsa L. Macromolecular composition of the sarcolemma and endomysium in rat. *Acta Anat (Basel)* 1988; 133 (4): 297-302.

Light N, Champion AE. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J* 1984; 219 (3): 1017-26.

Linsenmayer TF, Mentzer A, Irwin MH, Waldrep NK, Mayne R. Avian typeVI collagen. Monoclonal antibody production and immunohistochemical identification as a major connective tissue component of cornea and skeletal muscle. *Exp Cell Res* 1986; 165 (2): 518-29.

Matrisian LM. Metalloproteinase and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6 (4): 121-25.

Mauro A, Adams WR. The structure of the sarcolemma of frog skeletal muscle fiber. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 10 (4) Supp: 177-85.

Mccormick RJ. The flexibility of the collagen component of muscle. *Meat Sci* 1994; 36: 79-91.

Menegey LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 1995; 73: 723-32.

Miller TA, Lesniewski LA, Muller-Delp JM, Major AK, Scalkise D, Delp MD et al. Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 28:(1) 1710-17.

Molkentin JD, Olson EN. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 445-53.

Montero P, Borderas J. Influence of age on muscle connective tissue in trout (*Salmo irideus*) muscle. *J Sci Food Agric* 1990; 52: 141-46.

Montgomery AM, Sabzevari H, Reisfeld RA. Production and regulation of gelatinase B by human T-cells. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1176(3): 265-68.

Mosse PRL, Hudson TCL. The functional roles of different muscle fibre types identified in the myotomes of marine teleost: a behavioural, anatomical and histochemical study. *J Fish Biol* 1977; 11: 417-30.

Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 614-21.

Murphy G, Hobrechts A, Cockett ML, Williamson RA, Oshea M, Docherty AJP, et al. The C-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 1991; 30: 8097-8101.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378: 151-60.

Nihei T, Monckton G. A study of protein metabolism in denervation and reinnervation following sciatic nerve crush. *FEBS Lett* 1980; 119: 275-78.

Norman GR, Streiner, DL. *Biostatistics – The Bare Essentials*, Mosby Year Book, Inc St Louis 1993; 260p.

Ofstad R, Egelanddal B, Kidman S, Myklebust R, Olsen RL, Hermansson AM. Liquid loss as affected by post mortem ultrastructural changes in fish: cod (*Gadus morhua*, L.) and salmon (*Salmo salar*). *J Food Agric* 1996; 71: 301- 12.

Okada Y, Mordomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, et al. Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem* 1990; 194(3): 721-30.

Periago MJ, Ayala MD, López-Albors O, Abdel I, Martinez C, Garcia-Alcázar A, et al. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 2005; 249: 175-88.

Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Resp J* 1994; 7: 2062-72.

Rescan PY. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comp Bioch Physiol* 2001; Part B, 130: 1-12.

Reznick A Z, Menashe O, Bar-Shai M, Coleman R, Carmeli E. Expression of matrix metalloproteinase, inhibitor and acid phosphatase in muscle of immobilized hind limb of rats. *Muscle Nerve* 2003; 27: 51-59.

Rowlerson A, Veggetti A. Cellular Mechanisms of Post- Embryonic Muscle Development and Growth. Academic Press 2001; 18: 103-40.

Rudnick MA, Jaenish R. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays* 1995; 17: 203-09.

Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000; 57: 16-25.

Saito M, Kunisaki N, Urano N, Kimura S. Characterization of cDNA clone encoding the matrix metalloproteinase 2 from rainbow trout fibroblast. *Fisheries Sci* 2000; 66: 334-42.

Saito M, Sato K, Kunusaki N, Kimura S. Characterization of a rainbow trout matrix metalloproteinase capable of degrading type I collagen. *Eur J Biochem* 2000b; 267: 6943-50.

Sanes JR. Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J Cell Biol* 1982; 93(2): 442-51.

Sänger AM, Kim ZS, Adam H. The fine structure of muscle fibers of roach, rutilus and effects of habitat and season. *J Fish Biol* 1990; 36: 205-13.

Sänger AM, Stoiber W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: *Muscle Development and Growth*, Johnston IA. Ed Academic Press 2001; London, 318p.

Sänger AM. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. *Environ Biol Fishes* 1992; 33: 97-104.

Sato K, Ando M, Kubota S, Origasa K, Kawase H, Toyohara H, et al. Involvement of type v collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1997; 45: 343-48.

Sato K, Koike A, Yoshinaka R, Sato M, Shimizu Y. Postmortem changes in type I and V collagens in myocommatal and endomysial fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *J Aq Food Prod Technol* 1994b; 3: 5-11.

Sato K, Ohashi C, Ohtsuki K, Kawabata M. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J Agric Food chem* 1991; 39: 1222-25.

Sato K, Sakuma A, Ohtsuk I K, Kamabata M. Subunit composition of eel (*Anguilla japonica*) type V collagen: evidence for evidence of a novel fourth 4(V) chain. *J Agric Food Chem* 1994a; 42: 675-78.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Ikeda S. A simplified method for determining collagen in fish muscle. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1986a; 52: 889-93.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Itoh Y, Sato M. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. *Comparative Biochemistry Physiology* 1989; 92B: 87-91.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Shimizu Y. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bull Jpn Sci Fish* 1986b; 52: 1595-600.

Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Shimizu Y. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 1986; 52: 1595-1600.

Sato T, Foged NT, Delaissé JM. The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors. *J Bone Mineral Res* 1998; 13: 59-66.

Sawicki G, Leon H, Sawicka J, Sariahmetoglu M, Schulze CJ, Scott PG, et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. *Circulation* 2005; 112(4): 544-52.

Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FBS Lett* 1998; 441(1):137-40.

Shimokomaki M, Elden DF, Bailey AJ. Meat tenderness: Age related changes in bovine intramuscular collagen. *J Food Sci* 1972; 37: 892-96.

Sikorski ZE, Scott DN, Buisson DH. The role of collagen in the quality and processing of fish. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1984; 20: 301-43.

Stahle-Backdahi M, Inoue M, Guidice GJ, Parks WC. 92-KD gelatinase is produced by eosinophils at the site of blister formation in bullous pemphigoid and cleaves the

extracellular domain of recombinant 180-KD bullous pemphigoid autoantigen. *J Clin Invest* 1994; 93(5): 2022-30.

Stamenkovic I, Matrix metalloproteinase in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 415- 4334.

Staskus PW, Masiarz FR, Pallanck LJ, Hawkes SP. The 21-Kda protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 449-54.

Stephens HR, Duance VC, Dunn MJ, Bailey AJ, Dubowitz V. Collagen types in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci* 1982; 53 (1): 45-62.

Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 541-73.

Taboga SR, De Campos Vidal B. Collagen fibres in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. *J Submicrosc Cytol* 2003; 35 (1): 11-16.

Takata TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10: 321-25.

Tanzer ML. Cross-linking of collagen. Endogenous aldehydes in collagen react in several ways to form a variety of unique covalent cross-links. *Science* 1973; 180: 561-66.

Valente LMP, Rocha E, Gomes EFS, Silva MW, Oliveira MH, Monteiro RAF, et al. Growth dynamics of White and red muscles in fast and slow growing strains of rainbow trout. *J Fish Biol* 1999; 55: 675-91.

Veggetti A, Mascarello F, Scapolo PA, Rowlerson A, Candia CMD. 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* 1993; 187: 353-61.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Development* 2000; 17: 2123-33.

Walsh FS, Moore SE, Dhut S. Monoclonal antibody to human fibronectin: production and characterization using human muscle cultures. *Dev Biol* 1981; 84 (1): 121-32.

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

Weatherley AH, Gill HS, Lobo AF. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J Fish Biol* 1988; 33: 851-59.

Weatherley AH, Gill HS. Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth. *Experientia* 1985; 41: 353-54.

Weatherley AH, Gill HS. *The biology of fish growth*. Academic Press, London, 1987.

Werb Z, Chin JR. Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; 857: 110-18.

Wilson MJ, Garcia B, Woodson M, Sinha AA. Metalloproteinase activities expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicles. *Biol Reprod* 1992; 47: 683-91.

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinase and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-54.

Woessner JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press 2000, New York.

Yamada T, Yoshiyama Y, Sato H, Seiki M, Shinagawa A, Takahashi M, et al. White matter microglia produce membrane-type matrix metalloproteinase, an activator of gelatinase A, in human brain tissues. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995; 90(5): 421-24.

Zacks SI, Sheff MF, Sato A. Structure and staining characteristics of myofiber external lamina. *J Histochem Cytochem* 1973; 21(8): 703-714.

Zar JH, Biostatistical analysis. Prentice-Hall 1999; 4th ed: New Jersey, 663p.

Zhang G, Swank DM, Rome LC. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *J Morphol* 1996; 229: 71-81.

Zhang J, Bai S, Tanase C, Nagase H, Sarras MP. The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev Genes Evol* 2003a; 213: 382-89.