

EFEITOS DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO CRESCIMENTO MUSCULAR EM TILÁPIAS DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*) LINHAGEM GIFT

**EDSON ASSUNÇÃO MARECO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular e Estrutural.

*Orientadora: Maeli Dal Pai Silva*

**BOTUCATU – SP  
2012**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil  
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 [posgraduacao@ibb.unesp.br](mailto:posgraduacao@ibb.unesp.br)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO CRESCIMENTO MUSCULAR EM TILÁPIAS  
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) LINHAGEM GIFT

**EDSON ASSUNÇÃO MARECO**

**MAELI DAL PAI SILVA**

**VANDER BRUNO DOS SANTOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral  
e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular e  
Estrutural.

*Orientadora: Maeli Dal Pai Silva*

**BOTUCATU – SP  
2012**

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada  
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil  
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Mareco, Edson Assunção.

Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientadora: Maeli Dal Pai Silva

Coorientador: Vander Bruno dos Santos

Capes: 50405004

1. Tilápia (Peixe) - Criação. 2. Morfologia. 3. Genética animal.

Palavras-chave: Fatores regulatórios miogênicos; Miostatina; Músculo esquelético; Produção animal; Temperatura de cultivo.

*Dedico este trabalho...*

*A minha querida esposa Raquel,  
por estar ao meu lado, sempre me  
apoiando e me incentivando durante  
todos os momentos da vida.*

**Agradecimentos**

A orientadora, Dra. Maeli Dal Pai Silva, pela competência, paciência e por ter confiado em mim.

Ao Dr. Vander Bruno dos Santos, pela competência, pela oportunidade, pela confiança e pelo companheirismo desde o período de iniciação científica e a presença constante durante o mestrado.

Ao Dr. Robson Francisco Carvalho, pelas colaborações e pelo companheirismo.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético (LBME): Ândreo, Aline, Bruno, Cassiane, Carol Nebo, Fernanda Carani, Fernanda Alves, Fernanda Losi, Flávia, Henrique, Ivan, Jason, Leonardo, Luana, Paula, Raquel, Rodrigo, Tassiana e Warlen pelo companheirismo e pelos momentos alegres de nosso convívio.

Aos todos os amigos do APTA – Presidente Prudente (Polo alta sorocabana) em especial Milton, Robson e Rondi pelo companheirismo e pelo auxílio nos diversos períodos de nosso convívio.

Aos meus amigos de todos os laboratórios do Departamento de Morfologia pelo excelente convívio.

Aos técnicos de laboratório, José Eduardo e Ricardo pelo auxílio profissional e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu por serem prestativos.

A Luciana, secretária do Departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu, pela atenção e por todo auxílio.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2009/12157-6).

Muito obrigado!

*Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas*

*Friedrich Nietzsche*

## Sumário

<b>Lista de Figuras e Tabelas</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1 Introdução</b> .....	9
1.1 Tilápia do Nilo.....	9
1.2 Músculo esquelético .....	9
1.3 Desenvolvimento e crescimento do tecido muscular em peixes .....	15
1.4 Controle molecular da miogênese e do crescimento muscular .....	19
1.4.1 MIOSTATINA .....	23
1.5 Influência dos fatores ambientais no crescimento: Temperatura .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3 - Material e Métodos</b> .....	27
3.1 - Instalações e condições experimentais.....	27
3.2 - Preparações das amostras para a análise morfológica e morfométrica .....	28
3.3 - Análise da expressão gênica da MyoD, Miogenina e da Miostatina .....	29
3.3.1- Extração do RNA .....	29
3.1.2 - Quantificação e integridade do RNA .....	29
3.1.3 - Tratamento do RNA com DNase .....	30
3.3.4 - Transcrição Reversa (RT) .....	30
3.3.5 - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	30
3.4 - Análise Estatística .....	32
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	33
<b>CAPITULO 1</b> .....	41
EFFECTS OF TEMPERATURE ON GENE EXPRESSION RELATED TO MUSCLE GROWTH IN NILE TILAPIA ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	41
<b>ABSTRACT</b> .....	42
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	43
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b> .....	45
<b>2.1. Experimental design</b> .....	45
<b>2.2 Morphological and morphometric analysis</b> .....	45

<b>2.3 MyoD 1, Myogenin and Myostatin 1 mRNA expression.....</b>	<b>46</b>
<b>2.3.1 RNA extraction and cDNA synthesis .....</b>	<b>46</b>
<b>2.4 Quantitative expression analysis (RT- qPCR) .....</b>	<b>46</b>
<b>2.5 Statistical analysis.....</b>	<b>47</b>
<b>3 RESULTS .....</b>	<b>48</b>
<b>3. 1 Muscle morphology .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3. MyoD 1, Myogenin and Myostatin I mRNA Expression .....</b>	<b>52</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>55</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>59</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>59</b>
<b>Reference .....</b>	<b>59</b>



## Lista de Figuras e Tabelas

<b>Figura 1</b> – Desenho esquemático de um corte transversal da musculatura de peixe.....	10
<b>Figura 2</b> - (A) Desenho esquemático demonstrando a região da musculatura lateral, (B) Formato de um miômero de peixe teleósteo. (C) Esquema demonstrando o movimento de natação dos Peixes. ....	11
<b>Figura 3</b> – (A) Corte transversal da musculatura branca dorsal de alevino de Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ). Adaptado de Figueiredo et al., 2011. (B) Corte longitudinal de Fibra muscular. adaptado de Franck et al., 2009. ....	12
<b>Figura 4</b> – (A) Corte transversal da musculatura estriada esquelética de <i>Danio rerio</i> . Reação histoquímica da ATPase miofibrilar. (B) Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). ....	14
<b>Figura 5</b> – Esquema demonstrativo dos principais eventos que ocorrem durante a embriogênese do músculo estriado esquelético.....	16
<b>Figura 6</b> – Esquema demonstrando a localização das células satélites. ....	17
<b>Figura 7</b> – Esquema demonstrando os principais fatores que modulam a atividade das células satélites. ....	17
<b>Figura 8</b> – Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular nos peixes.....	19
<b>Figura 9</b> – Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular. ....	21
<b>Figura 10</b> – Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular, influenciada pela ação da miostatina (MSTN) inibindo os MRFs.. ....	22
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática simplificada das principais proteínas envolvidas na via de sinalização da Miostatina.....	24
<b>Figura 12</b> – Esquema demonstrando como as alterações nas condições ambientais podem afetar a histofisiologia e o fenótipo do músculo esquelético em peixes.....	25
<b>Figura 13</b> – Localização da amostra tecidual. Materiais e métodos.....	28
<b>Tabela 1</b> –Descrição do gene, sequência do primer, tamanho e eficiência da amplificação.....	28

## RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), amplamente utilizada na piscicultura brasileira, destaca-se por apresentar inúmeras qualidades para o mercado consumidor. Assim como ocorre com outras espécies de peixes, o desenvolvimento muscular das tilápias pode sofrer a influência de diversos fatores (extrínsecos e intrínsecos), podendo assim comprometer os custos de produção. Neste estudo, objetivamos avaliar a morfologia e a expressão de genes que controlam o crescimento muscular em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT cultivada em diferentes temperaturas. Noventa peixes (n=10) de uma população monosexo de machos revertidos, pesando aproximadamente 1,4 g, foram distribuídos aleatoriamente em seis caixas d'água de 0,5 m<sup>3</sup> em sistema de recirculação d'água e cultivados em três diferentes temperaturas (22, 28 e 30° C) durante 7, 30 e 60 dias. Foram realizadas análises biométricas e morfológicas, bem como análises de expressão gênica dos fatores reguladores miogênicos (MyoD e Miogenina) e do fator de crescimento Miostatina. A análise de expressão gênica foi realizada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR). Os dados de peso(g) e comprimento padrão (cm) demonstraram que a temperatura pode influenciar o ganho de peso final, sendo que os animais cultivados a 22°C apresentaram menor peso a partir do 30° dia, quando comparado com os animais cultivados a 28 e 30°C. A análise morfométrica (distribuição do diâmetro médio das fibras), não apresentou diferenças significativas entre os animais nas temperaturas estudadas. Entretanto, os animais cultivados a 22 e 30°C apresentaram comportamento similar na distribuição do diâmetro médio das fibras. A análise de expressão gênica para a MyoD, apresentou os maiores níveis de mRNA nos animais cultivados a 22°C, quando comparados com os animais cultivados a 28 e 30°C, em praticamente todos os períodos estudados. Os níveis de mRNA para o gene da Miogenina foram constantes em todas as temperaturas e em todos os períodos estudados (demonstrando que a expressão deste gene é menos influenciado pela temperatura de cultivo). Aos sete dias de tratamento, foram observados os menores níveis de mRNA para o gene da miostatina em todas as temperaturas estudadas. Aos 30 dias, observou-se um pico na expressão gênica que manteve-se estável nos animais com 60 dias de tratamento. Este trabalho demonstrou que a temperatura de cultivo pode influenciar a expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em juvenis de tilápia do Nilo, sem promover alteração na taxa de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares. Nossos resultados mostram que o cultivo desta espécie de peixe a baixas temperaturas e por curtos períodos de tempo pode ser usado como uma tecnologia alternativa para obter maior produtividade. Estudos com crescimento compensatório deve ser realizada para confirmar esta hipótese.

**Palavras-chave:** fatores regulatórios miogênicos; miostatina; musculo esquelético; temperatura de cultivo.

## ABSTRACT

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.), widely used in Brazilian aquaculture, stands out for its numerous qualities to the consumer market. As with other fish species, tilapia muscle development may be influenced by several factors (extrinsic and intrinsic) and, thus, it can lead to compromise production costs. This study aimed to evaluate the morphology and expression of genes that control muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) of GIFT strain grown at different temperatures. Ninety fish (n = 10) of a reverted males monosex population, weighing about 1.4 g were randomly divided into six water tanks of 0.5 m<sup>3</sup> of water recirculation system and reared in three different temperatures (22, 28 and 30 ° C ) for 7, 30 and 60 days. It was performed biometric and morphological analysis, along with gene expression of myogenic regulatory factors (MyoD and myogenin) and growth factor myostatin analysis. The gene expression analysis was performed using the technique of Polymerase Chain Reaction Real-Time after Reverse Transcription (qRT-PCR). Weight (g) and standard length (cm) data showed that temperature can influence final weight gain, and the animals grown at 22 ° C had lower weight from the 30<sup>th</sup> day, when compared with animals reared at 28 and 30 ° C. The morphometric analysis (distribution of the fiber mean diameter), did not show significant differences among animals in the studied temperatures. However, animals reared at 22 and 30 ° C showed similar behavior in the distribution of the fiber mean diameter. The gene expression analysis for MyoD, showed the highest mRNA levels in animals grown at 22 ° C, when compared to animals reared at 28 and 30 ° C in almost all studied periods. The levels of mRNA for the myogenin were constant at all studied temperatures and periods. At seven days of cultivation, we observed the lowest levels of mRNA for myostatin gene at all studied temperatures. At 30 days, there was a peak in gene expression that remained stable in animals with 60 days of treatment. This study has demonstrated that rearing temperature can influence the expression of genes related to muscle growth in juvenile Nile tilapia, without change muscle fibers hyperplasia and hypertrophy. Our results show that the cultivation of this species of fish at low temperatures and for short periods of time can be used as an alternative technology to obtain greater productivity. Studies with compensatory growth must be performed to confirm this hypothesis.

**Keywords:** myogenic regulatory factors, myostatin, skeletal muscle, temperature rearing.

## 1 Introdução

### 1.1 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a segunda espécie de água doce mais cultivada do mundo, logo após a carpa (FAO, 2010). Segundo Popma e Masser (1999), “tilápia” é o nome genérico de um grupo de ciclídeos endêmicos da África. A tilápia é originária da bacia do rio Nilo, porém foi introduzida em diversas regiões do mundo (El-Sayed, 2006). O grupo consiste em três gêneros importantes para a aquicultura (*Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilápia*). A sua grande aceitação é devido a sua adaptabilidade a variados sistemas de produção e condições ambientais, facilidade de reprodução, alta prolificidade, e rápido crescimento. A tilapicultura vem se intensificando de forma significativa sendo a espécie mais utilizada na produção aquícola brasileira (132.957 toneladas em 2009, MPA 2010), seguida da carpa comum (*Cyprinus carpio*) e do tambaqui (*Colossoma macropomum*). Devido a sua fácil adaptação, alta qualidade de sua carne e ampla distribuição geográfica, a tilápia tornou-se um produto de interesse industrial com excelente aceitação pelo mercado consumidor, sendo intensamente cultivada na piscicultura mundial, é uma das espécies mais indicadas para cultivo em regiões tropicais (Castagnolli, 1992).

Devido a grande importância desta espécie para a aquicultura mundial, foi realizado entre 1988-1997, um programa “multidisciplinar” e “multi-institucional” de seleção e melhoramento genético. Deste programa de melhoramento originou-se a linhagem conhecida como linhagem GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*), oriunda do cruzamento entre quatro linhagens silvestres de tilápias capturadas no Egito, Gana, Quênia e Senegal, e quatro linhagens confinadas, introduzidas nas Filipinas em 1979-1984 de Israel, Singapura, Tailândia e Taiwan (Bentsen et al., 1998). Estes cruzamentos mostraram que esta linhagem melhorada possui alto desempenho zootécnico (melhor crescimento, maior peso do pescado, filé mais espesso) quando comparada às linhagens tradicionais.

### 1.2 Músculo esquelético

O tecido muscular esquelético tem como principal característica a plasticidade, o que habilita esse tecido a alterar suas funções morfológicas, metabólicas e funcionais em resposta a vários estímulos (Acosta et al., 2005). A característica acima descrita torna o músculo extremamente importante para a adaptação dos organismos ao seu habitat. Nos peixes, essa versatilidade necessita ser ainda maior, uma vez que o ambiente pode afetar profundamente o desenvolvimento e o crescimento do tecido muscular (Johnston, 2006).

O músculo natatório dos peixes teleósteos compreende uma grande parte da massa corporal. Nestes organismos aquáticos, os fortes músculos axiais, que flexionam a coluna vertebral e a região caudal de um lado para o outro, durante a natação, estão divididos em porção epiaxial e hipoaxial por meio de um septo lateral ou transverso (horizontal), de tecido conjuntivo, localizado na região do nervo da linha lateral (Alexander, 1969; Videler, 2011); além disso, a coluna vertebral é flexível e suporta um septo medial que divide o corpo em antímeros direito e esquerdo (Videler, 2011) (FIGURA 1).

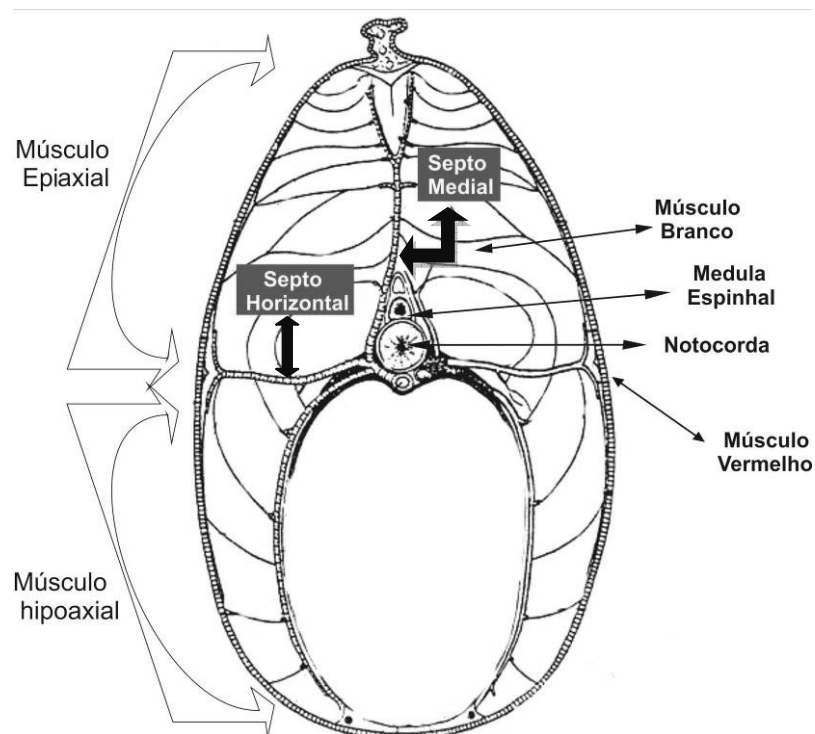


Figura 1 – Desenho esquemático de um corte transversal da musculatura de peixe demonstrado a organização anatômica da musculatura estriada. Observa-se a septo horizontal separando a musculatura epiaxial da hipoaxial, o septo medial separando a

musculatura em dois antímeros (direito e esquerdo), Músculo vermelho (superficial) e branco (profundo). Fonte: O autor, baseado em Videler, 2011.

Na maioria das espécies de peixes, o músculo estriado esquelético é constituído por unidades morfofuncionais, chamadas de miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal e estão inseridas por curtos tendões em bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos (Alexander, 1969) (FIGURA 2). A disposição dos miômeros confere a esses animais uma maior mobilidade e destreza durante a realização dos movimentos ondulatórios da natação (Leeuwen, 1999). Os miômeros apresentam formato em “W” (FIGURA 2 B) e cada um contém uma região superficial, em formato de cunha, disposta imediatamente abaixo da linha lateral, onde as fibras musculares têm disposição paralela ao eixo corporal, e uma região mais profunda, na qual as fibras musculares apresentam uma disposição em hélice, formando ângulos maiores que  $40^\circ$  em relação ao eixo corporal (Alexander, 1969; Altringham e Ellerby, 1999; Sanger e Stoiber, 2001).

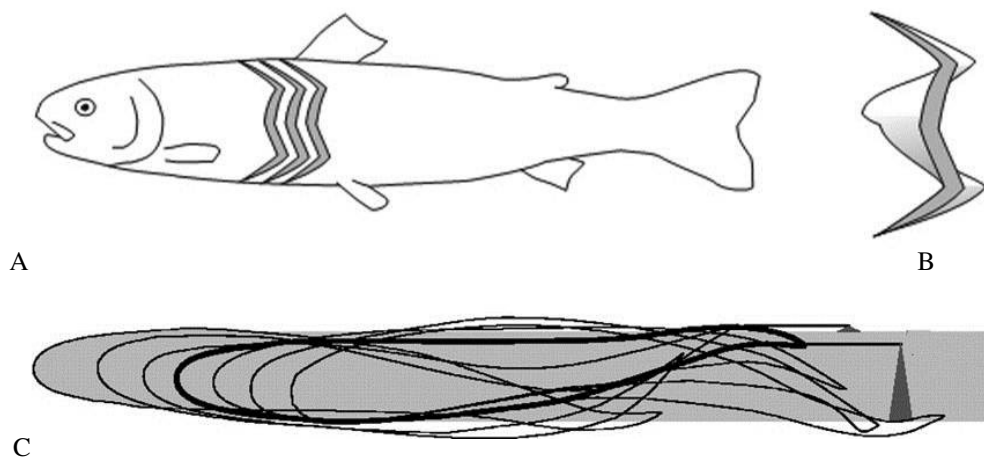


Figura 2 - (A) Desenho esquemático demonstrando a região da musculatura lateral, (B) Formato de um miômero de peixe teleósteo. Adaptado de Altringham e Ellerby, 1999. (C) Esquema demonstrando o movimento de natação ondulatória que tem relação direta com a disposição dos miômeros. Adaptado de Müller et al., 2001.

Os peixes nadam através de movimentos ondulatórios de seu corpo, que são gerados pela ativação sequencial dos miômeros (FIGURA 2 C). A maneira que o músculo é utilizado, para gerar impulso, pode variar ao longo do corpo do animal e entre as espécies (Altringham e Ellerby, 1999).

Na maioria das espécies de peixes, o músculo esquelético pode representar até 60% da massa corporal do animal (Sänger e Stoiber, 2001). Essa relevante porcentagem da massa muscular não é apenas uma adaptação mecânica, específica para a vida aquática, mas serve também como uma importante fonte de proteínas a ser utilizada na alimentação humana (Weatherley e Gill, 1985).

Esse tecido é formado por células modificadas e altamente especializadas: as fibras musculares, que são alongadas e multinucleadas, com núcleos periféricos, localizados abaixo da membrana plasmática (FIGURA 3). O diâmetro das fibras musculares pode variar de 10 a 100  $\mu\text{m}$  e o comprimento pode atingir 10 cm, dependendo da arquitetura do músculo (Dal Pai-Silva et al., 2005). O sarcoplasma das fibras é constituído em sua totalidade por miofibrilas, que apresentam estriações transversais (FIGURA 3 B), decorrentes da organização das proteínas e filamentos contráteis em unidades de contração, denominadas sarcômeros. As fibras musculares são delimitadas por uma fina camada de fibras colágenas (endomísio), e o conjunto de fibras musculares é circundado por uma espessa camada de fibras colágenas (perimísio), (FIGURA 3 A) (Michelin et al., 2009).

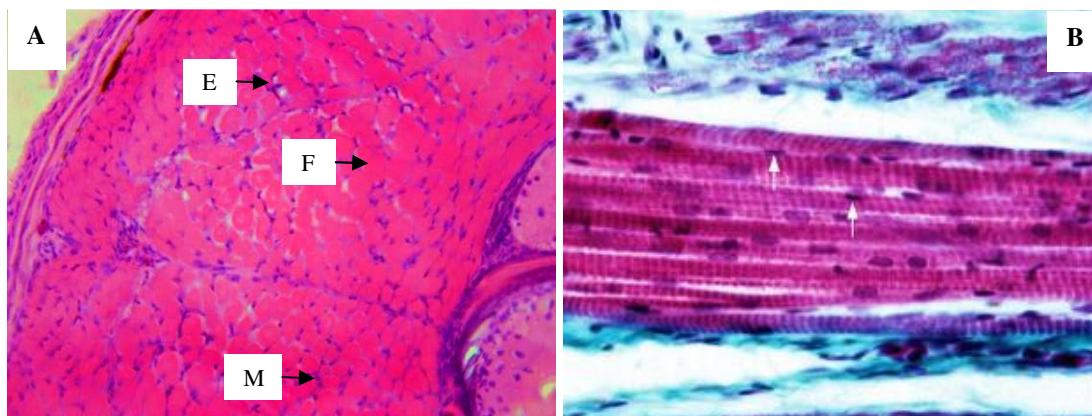


Figura 3 – (A) Corte transversal da musculatura branca dorsal de alevino de Zebrafish (*Danio rerio*). F: Fibras musculares. M: Mionúcleos periféricos. E: Endomísio HE. Adaptado de Figueiredo et al., 2011. (B) Corte longitudinal demonstrando a presença

de mionúcleos periféricos (setas) e estriações (bandas claras e escuras) do músculo estriado esquelético de *Gnathonemus petersii* (adaptado de Franck et al., 2009).

Os músculos natatórios de todos os grupos de peixes são altamente especializados para atender a demanda de força que é necessária, tanto durante o movimento de sustentação quanto durante movimentos rápidos. A solução adotada universalmente pelos peixes é dividir o sistema locomotor em vários compartimentos ou camadas contendo fibras musculares distintas (Sänger e Stoiber, 2001).

A classificação dos tipos de fibras musculares em peixes é mais simples quando comparada com a classificação utilizada nos músculos de mamíferos, onde são encontradas quatro tipos principais de fibras (I, IIa, IId/x e IIb), constituindo as fibras puras e seis subtipos de fibras híbridas descritas como : IC, IIC, IIAD IIDA, IIDB e IIBD (Staron e Pette, 1993). Nos peixes, esta classificação é restrita a três tipos principais de fibras (vermelhas, intermediárias e brancas), distribuídas nos compartimentos Vermelho, Intermediário e Branco, respectivamente. No entanto, essa organização pode variar de acordo com a espécie e a fase de crescimento estudada (Alexander, 1969; Weatherley e Gill, 1987).

A classificação das fibras musculares em peixes leva em consideração duas características funcionais: velocidade de contração (lenta ou rápida) e atividade metabólica (aeróbica/oxidativa ou anaeróbica/ glicolítica).

O compartimento vermelho, normalmente, corresponde de 5 a 15% em relação a toda a musculatura miotomal dos peixes (Altringham e Johnston, 1981). Esta musculatura é encontrada na região superficial, abaixo da derme, em maior proporção na região da cauda e próxima à região da linha lateral. Este compartimento é constituído por fibras musculares vermelhas, de contração lenta e metabolismo oxidativo, apresentam pequeno diâmetro (entre 25 e 45  $\mu\text{m}$ ), excelente suprimento sanguíneo, grande concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias na região subsarcolemal e entre as miofibrilas, e muitas gotículas de lipídios (Altringham e Johnston, 1981; Johnston, 1981; Sänger e Stoiber, 2001). As fibras vermelhas são recrutadas durante a realização de movimentos lentos e de sustentação, como a migração (Bone, 1979) (FIGURA 4).



O compartimento branco corresponde aproximadamente 70 % do volume total do tecido muscular (Sänger e Stoiber, 2001). Essa proporção varia ao longo do comprimento do peixe com maior proporção na região anterior do animal e um grande declínio em direção a região caudal (Zhang et al., 1996). As fibras musculares brancas possuem contração rápida e metabolismo glicolítico. Quando comparadas com as fibras vermelhas, estas apresentam maiores diâmetros (entre 50 e 100  $\mu\text{m}$ ), e menor suprimento de capilares sanguíneos; também possuem baixa concentração de mioglobina, e poucas mitocôndrias (Sänger e Stoiber, 2001). Esse tipo de musculatura é recrutado nos movimentos bruscos de natação, como a captura de alimento e fuga de predadores (Altringham e Johnston, 1981) (FIGURA 4).

Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento intermediário com fibras que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias em relação às das fibras musculares brancas e vermelhas e apresentam contração rápida com metabolismo oxidativo/glicolítico (Sänger e Stoiber 2001) (FIGURA 4).

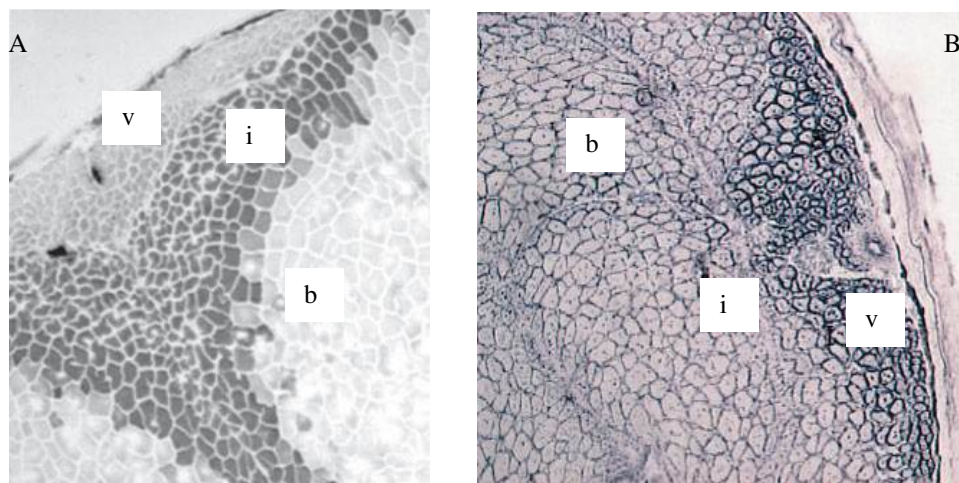


Figura 4 – (A) Corte transversal da musculatura estriada esquelética de *Danio rerio*. Reação histoquímica da ATPase miofibrilar, após pré incubação em pH intermediário demonstrando os compartimentos musculares vermelho (v), intermediário (i) e branco (b). Adaptado de Biga e Goetz, 2006 (B) Corte transversal da musculatura estriada da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), após a reação de NADH-TR. demonstrando a musculatura distribuída em compartimentos Vermelho (v), Intermediário (i) e Branco (b) adaptado de Aguiar et al., 2005.

### 1.3 Desenvolvimento e crescimento do tecido muscular em peixes

A formação das primeiras fibras musculares ocorre nas fases iniciais da embriogênese. Como ocorre com outros animais, o desenvolvimento inicial é crucial e importante para a formação do indivíduo adulto. Nas primeiras etapas da embriogênese, o desenvolvimento dos peixes teleósteos é influenciado por fatores maternos depositados no ovócito durante a ovogênese (Johnston et al., 2011). Após a fertilização, os ovócitos tornam-se ativos, iniciando uma cascata de eventos necessários para o desenvolvimento do indivíduo; também é neste período que ocorre a expressão de genes embrionária e a degradação de muitos dos transcritos de RNAs maternos presentes no ovócito (Pelegrí, 2004).

Inicialmente, os embriões de peixe se desenvolvem externamente, permitindo que os detalhes e os padrões de formação e diferenciação do somito muscular sejam facilmente observados durante a miogênese. Nesta etapa, o embrião apresenta um sistema muscular relativamente simples, em que músculos rápidos (branco) e lentos (vermelho), assim como seus respectivos precursores, são claramente separados uns dos outros, proporcionando assim um modelo ideal para o acompanhamento do processo de diferenciação e desenvolvimento muscular. O padrão de desenvolvimento muscular ocorre de modo similar na maioria dos peixes e segue um padrão de desenvolvimento semelhante ao de outros vertebrados. Durante o processo de formação muscular ocorre a especificação do mesoderma paraxial, definindo um modelo para o desenvolvimento muscular (Zhang et al., 2001). Neste período, ocorre a formação dos somitos, estruturas epiteliais transitórias que se formam nas primeiras etapas do desenvolvimento.

A especificação de células progenitoras musculares no somito depende de sinais indutivos dos tecidos adjacentes, como o tubo neural, a notocorda e o ectoderma dorsal e lateral. Em resposta a estes sinais indutivos, as células precursoras miogênicas (linhagem celular “comprometida” com a miogênese) originam os mioblastos, células mononucleadas. Em seguida, vários mioblastos fundem suas membranas originando os miotubos multinucleados onde os núcleos estão localizados na região central. (Rescan, 2001) (FIGURA 5).

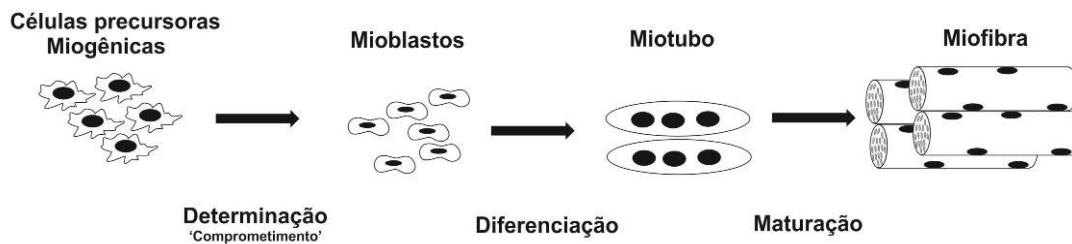


Figura 5 – Esquema demonstrativo dos principais eventos que ocorrem durante a embriogênese do músculo estriado esquelético. Adaptado de Watabe, 1999.

A formação das fibras musculares adultas ocorre através da migração dos mionúcleos centrais para a periferia da fibra e, assim, alcançam sua forma definitiva como uma fibra madura multinucleada com núcleos periféricos.

A maturação/diferenciação da fibra muscular também inclui um aumento da síntese e acúmulo de proteínas miofibrilares, como actina e miosina e uma contínua formação de miofibrilas.

Durante o desenvolvimento embrionário, algumas células precursoras/progenitoras miogênicas não se fundem e permanecem como células indiferenciadas no músculo. Estas células possuem a capacidade de se proliferar, e também têm o potencial de se diferenciar e se fundir com as fibras musculares existentes, sendo denominadas de células satélites ou mioblastos adultos (Vasyutina et al., 2007).

As células satélites são pequenas ( $<5\mu\text{m}$ ), mononucleadas e quiescentes; em cortes transversais do músculo podem ser vistas na periferia das fibras musculares sob a lâmina basal e separada das fibras musculares pela membrana celular. Estas células constituem a principal fonte celular para a regeneração e para o processo de crescimento muscular pós-natal (Buckingham, 2007; Johnston et al., 2000; Mauro, 1961) (FIGURA 6).

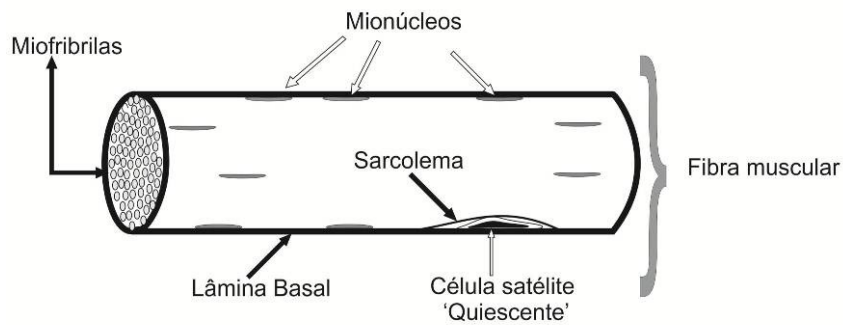


Figura 6– Esquema demonstrando a localização das células satélites, entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular. Fonte: O autor, baseado em Mauro, 1961

O crescimento muscular pós-embriológico na maioria dos peixes ocorre através da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites; essa ativação é promovida por diversos hormônios e fatores de crescimento que utilizam diversas vias de sinalização (FIGURA 7).

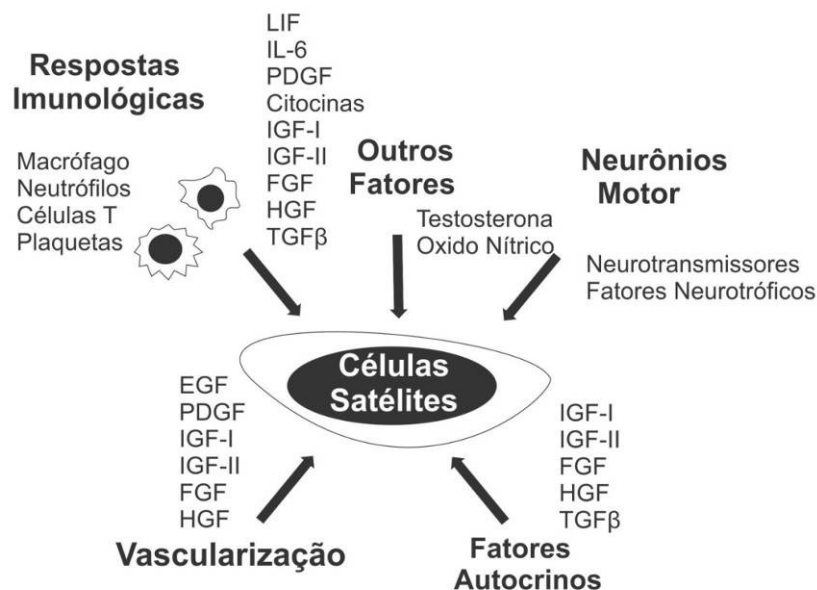


Figura 7– Esquema demonstrando os principais fatores que modulam a atividade das células satélites. Os fatores de crescimento e hormônios liberados a partir de vários tecidos modulam a atividade das células satélites (proliferação e diferenciação). Adaptado de Hawke et al., 2001

Com poucas exceções, a maioria das espécies de peixes tendem a apresentar um crescimento indeterminado. Nestes animais, o crescimento muscular ocorre através de

dois processos: hiperplasia e hipertrofia, os quais contribuem por todo o período de crescimento pós-embrionário da musculatura estriada.

O crescimento “hiperplásico” do músculo se refere ao aumento no número de fibras musculares devido à formação de novas fibras. A produção de miotubos e novas fibras musculares, continua até que o peixe alcance cerca de 40% do comprimento máximo do corpo (Johnston, 2004).

Na hiperplasia, a fusão entre células satélites ativadas resultam na formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em fibras musculares (Stellabotte e Devoto, 2007).

Durante o crescimento hipertrófico, as células satélites ativadas fundem-se com fibras musculares existentes, aumentando o número de mionúcleos e a síntese de miofibrilas, levando ao aumento no diâmetro ou área da fibra muscular (Johnston, 1999) (FIGURA 8). As fibras musculares crescem por hipertrofia durante todo o período de crescimento pós-larval até atingirem um máximo diâmetro funcional que é em torno de 100 $\mu$ m (fibras brancas). A taxa de crescimento hipertrófico varia com a taxa de crescimento somático e em diferentes estágios de vida do animal (Rowlerson e Veggetti, 2001).

A contribuição relativa da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular nas espécies de peixes são variáveis, dependendo da espécie, fase de crescimento e tipo de músculo (Aguiar et al., 2005; Dal Pai-Silva et al., 2003). Em geral, nos peixes com crescimento indefinido ocorrem os dois tipos de crescimento muscular (hiperplasia e hipertrofia), durante todo o período de crescimento. No entanto, a hiperplasia é um processo de crescimento mais evidente durante a fase juvenil e o crescimento hipertrófico mais intenso e mais evidente durante a fase adulta do animal (Almeida et al., 2010).

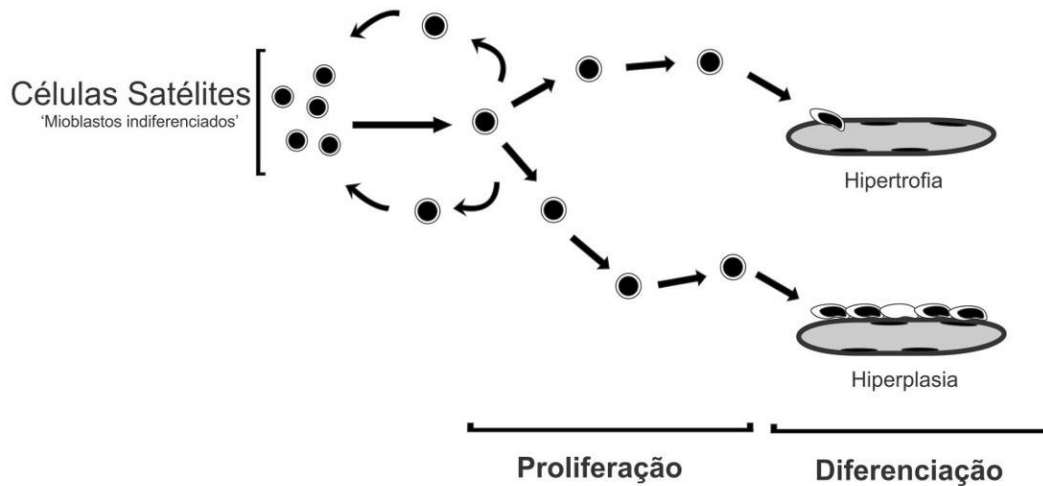


FIGURA 8 – Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia. A população de Células Satélites contribui para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético. Adaptado de Johnston, 1999.

O recrutamento de novas fibras e a hipertrofia das fibras existentes é independentemente regulado, durante o crescimento, por vários fatores extrínsecos (temperatura, fotoperíodo, regime de alimentação) e fatores intrínsecos (genótipo, estágio de maturação sexual). Em algumas espécies de peixes, a temperatura de incubação dos ovócitos promove grandes alterações no número de fibras musculares recrutadas durante os estágios seguintes do ciclo de vida. (Assis et al., 2004; Johnston et al., 1997, 1995; Macqueen et al., 2007). Isso sugere que comprometimento das células progenitoras miogênicas destinadas a participar processo de recrutamento de novas fibras e do processo de hipertrofia das fibras existentes ocorre nas fases iniciais de formação do embrião.

#### 1.4 Controle molecular da miogênese e do crescimento muscular

A formação do tecido muscular envolve a ação de diversos fatores regulatórios atuando e regulando o processo de desenvolvimento muscular através da ação inicial de moléculas de sinalização. Estas moléculas de sinalização se ligam a seus receptores e ativam ou reprimem fatores de transcrição intracelular (Du, 2004).

Todos os eventos da miogênese são iniciados e controlados pela expressão diferencial de fatores transcricionais conhecidos como fatores de regulação miogênica (do Inglês *myogenic regulatory factors* ou MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Watabe, 1999, 2001; Weintraub, 1993). Durante a miogênese, os MRFs (MyoD e Myf5) determinam a proliferação dos mioblastos ou das células satélites, enquanto a expressão da miogenina e MRF4 determina o processo de diferenciação dos mioblastos ou das células satélites (Rescan, 2001; Watabe 1999, 2001).

Os MRFs compartilham um domínio altamente conservado, conhecido como *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH), que apresenta 80% de similaridade na sua sequência de aminoácidos (Edmondson e Olson, 1993). A região *Helix-Loop-Helix* é caracterizada por duas  $\alpha$ -hélices separadas por um *loop*. A região básica (*basic*) compreende uma extensão de uma das  $\alpha$ -hélices da região HLH (Cole et al., 2004).

Os MRFs reconhecem, através de seu domínio básico, uma sequência consenso no DNA conhecida como *E-box* (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Blackwell e Weintraub 1990; Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989). A região *Helix-Loop-Helix* dos MRFs constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47 (Murre et al., 1989). A ligação do heterodímero "MRFs/proteína E" ou de homodímeros dos "MRFs/MRFs" à sequência E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, levando à sua expressão (Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989).

Muitos estudos têm caracterizado as sequências codificantes completas dos RNAs mensageiros (RNAm) referentes à MyoD e à miogenina em diversas espécies de peixes. Essas sequências apresentam alta similaridade com as mesmas sequências descritas em outras espécies de vertebrados, principalmente em relação ao domínio de ligação ao DNA bHLH. Na carpa, a sequência de nucleotídeos do gene da MyoD apresenta 93, 81 e 73 de similaridade com a MyoD de *zebrafish* (Weinberg et al., 1996), truta arco-íris (Rescan et al., 1994) e em *Xenopus* (Hopwood et al., 1989), respectivamente. A sequência nucleotídica completa da miogenina apresenta 69, 55 e 51% de similaridade com a miogenina da truta arco-íris (Rescan et al., 1995), galinha (Fujisawa-Sehara et al., 1990) e camundongo (Edmondson et al., 1994), respectivamente. A comparação da sequência de aminoácidos dos MRFs da carpa com a

de outros vertebrados mostrou que a sequência da MyoD é mais conservada que a da miogenina, inclusive em relação ao domínio bHLH (Kobiyama et al., 1998).

Durante a miogênese, o programa miogênico é sinalizado pela expressão dos MRFs. A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo expressos na fase de proliferação dos mioblastos, enquanto os fatores secundários, miogenina e MRF4, são expressos em mioblastos nas fases de fusão e diferenciação em fibras musculares maduras (Watabe, 1999). (FIGURA 9).

A família de fatores transcricionais chamados de MEF2 (do Inglês *myocyte specific enhancer factor 2*) controla a regulação da diferenciação celular através da ligação em regiões de sequências ricas em A/T presentes em sítios promotores e em *enhancer* de genes músculo específicos. Os MEFs atuam sinergicamente com os MRFs cooperando na indução e transcrição de genes músculo específicos. (FIGURA 10).

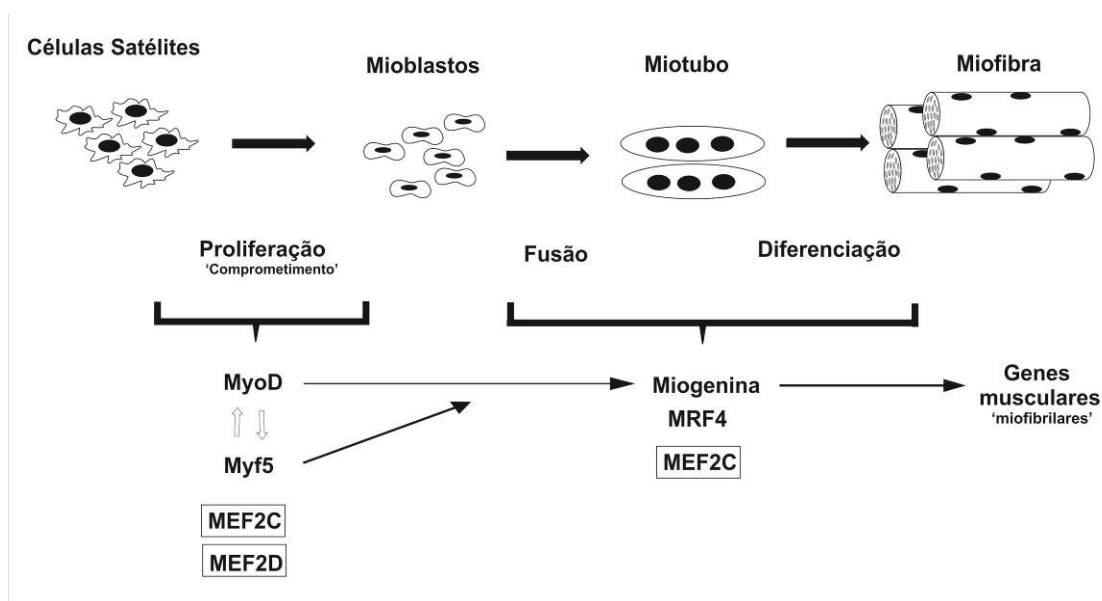


FIGURA 9 – Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular. A população de células satélites contribuem para o crescimento, influenciada pelos Fatores de Regulação Miogênica (MRFs). Adaptado de Watabe, 1999

A manutenção do fenótipo muscular durante o crescimento é o resultado do equilíbrio entre a síntese proteica e a degradação proteica. Estes processos são mediados pela ação de hormônios e de fatores de crescimento e pela ação de fatores de regulação miogênicas como a miostatina. Ambos iniciam uma cascata de eventos, culminando na



síntese ou degradação proteica (Matsakas e Patel, 2009). Embora existam diferenças entre as espécies, a participação desses fatores e seus mecanismos de ação são, geralmente, bem conservados entre os vertebrados (Patrino et al., 2006).

O aumento da massa muscular nos peixes adultos ou em fase de crescimento pode ocorrer através do crescimento hiperplásico ou hipertrófico da musculatura. Durante estes processos, ocorre a retomada dos eventos ocorridos durante a miogênese. O crescimento muscular é controlado positiva e negativamente por uma série de fatores transcricionais e de crescimento, que controlam a proliferação e diferenciação das células satélites. Entre esses fatores estão os MRFs, a miostatina (MSTN) e o IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I). (FIGURA 10).

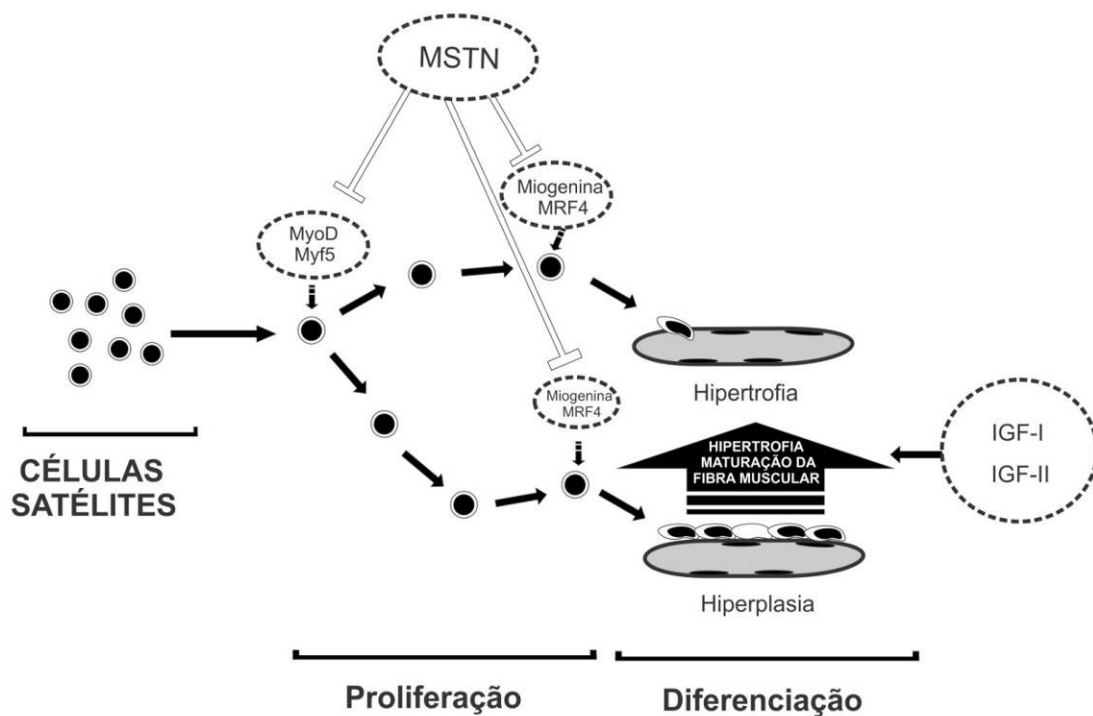


FIGURA 10 – Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular. A proliferação de células satélites é influenciada pela ação da miostatina (MSTN) inibindo os MRFs, conseqüentemente inibindo o crescimento. Durante a maturação da fibra muscular (hipertrofia) ocorre a ação dos Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina (IGF – I e II). Adaptado de Johnston, 2006.

### 1.4.1 MIOSTATINA

A miostatina, também conhecida como GDF-8 (*Growth and Differentiation Factor-8*), é um membro da superfamília dos fatores de crescimento TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) e está envolvida com a regulação do crescimento do músculo estriado esquelético nos vertebrados (McPherron et al., 1997).

A principal função da Miostatina é regular negativamente o crescimento muscular. Controla a formação de novas fibras musculares e inibe a hipertrofia das fibras existentes, através da diminuição da expressão dos MRFs (Langley et al., 2002; Lee et al., 2009).

A miostatina foi primeiramente descrita em camundongos, sendo inicialmente expressa durante a embriogênese, nos somitos e no músculo esquelético em desenvolvimento (McPherron et al., 1997). Nos peixes o gene da MSTN tem sido descrito e caracterizado em diversas espécies (Ostbye et al., 2007; Rescan, 2001; Rodgers et al., 2001). Em algumas dessas espécies, foram descritos dois genes para a MSTN, denominados MSTN-1 e MSTN-2 (Biga et al., 2004; Garikipati et al., 2007).

A MSTN-1 apresenta os maiores níveis de expressão no músculo esquelético. A expressão de MSTN-2 é mais limitada, restringindo-se sistema nervoso central (Rodgers et al., 2007).

No músculo estriado esquelético de peixes, a expressão gênica da miostatina foi demonstrada, ao longo do desenvolvimento e crescimento muscular. No início do desenvolvimento embrionário, onde o crescimento muscular ocorre, predominantemente, por hiperplasia, os níveis de expressão de miostatina, são baixos, aumentando significativamente nos estágios finais de desenvolvimento, quando a hiperplasia torna-se menos intensa (Patruno et al., 2008).

A Via de sinalização da miostatina, assim como de outros genes músculo específicos é muito importante para a manutenção do fenótipo muscular. A miostatina através da ligação aos receptores específicos na membrana da célula-alvo, ativa varias proteínas da família *Smads* formando complexos, promovendo a interação dessas. O complexo de proteínas *Smad* é translocado para o núcleo, onde interage com proteínas da maquinaria de transcrição, regulando a transcrição de genes-específicos e inibindo a

ação da via IGF/Akt que atuam na síntese proteica, fusão de mioblastos e diferenciação dos mioblastos. Desta forma, proteínas responsáveis pela degradação proteica deixam de ser inibidas e passam a atuar tornando-se ativas (Johnston et al., 2011; Otto e Patel, 2010) (FIGURA 11).

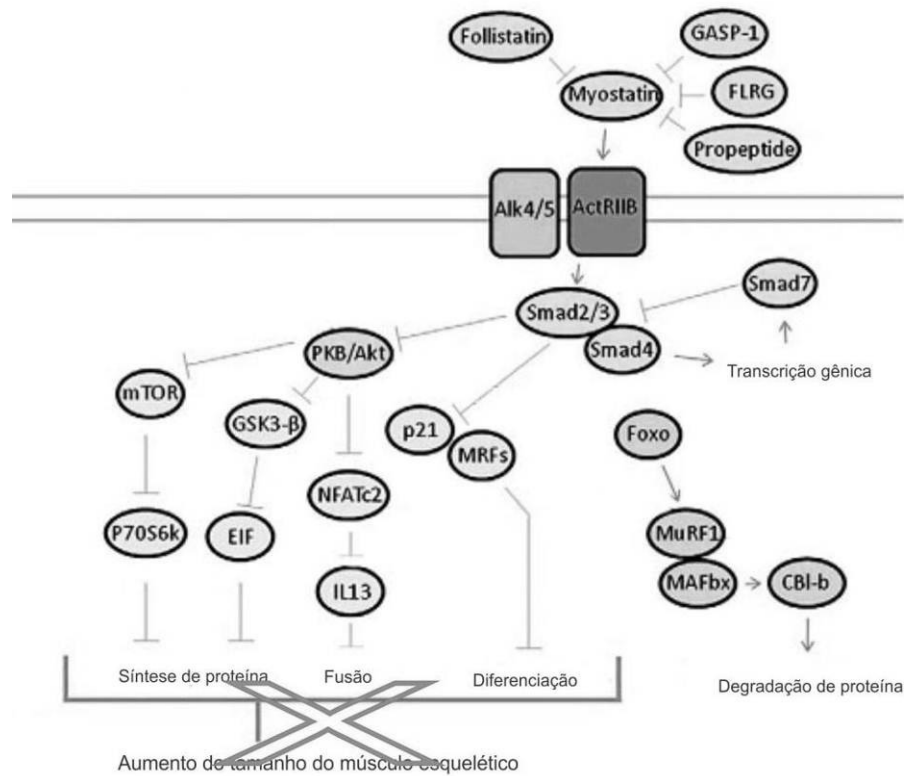


FIGURA 11 – Representação esquemática simplificada das principais proteínas envolvidas na via de sinalização da Miostatina demonstrando o papel da miostatina. Adaptado de (Otto e Patel, 2010)

### 1.5 Influência dos fatores ambientais no crescimento: Temperatura

O crescimento muscular em peixes teleósteos é um processo altamente dinâmico e complexo. O principal fator que contribui para esta complexidade é a necessidade dos peixes de se adaptar às condições físico-químicas impostas em seu habitat. Tais adaptações promovem alterações no padrão de desenvolvimento, crescimento muscular e no fenótipo muscular. (Johnston, 2006; Johnston et al., 2011) (FIGURA 13).

Muitos peixes mostram alterações sazonais na taxa de crescimento, e um dos principais fatores envolvidos nessas alterações é a temperatura da água. Os efeitos da

temperatura no crescimento muscular em diferentes estágios da vida e em diferentes espécies de peixe têm sido descritos em diversos trabalhos (Johnston et al., 1995, 2009; Killeen et al., 1999). Esses efeitos incluem a resposta à aclimação bem como alterações na dinâmica de crescimento muscular (Rowlerson e Veggetti, 2001).

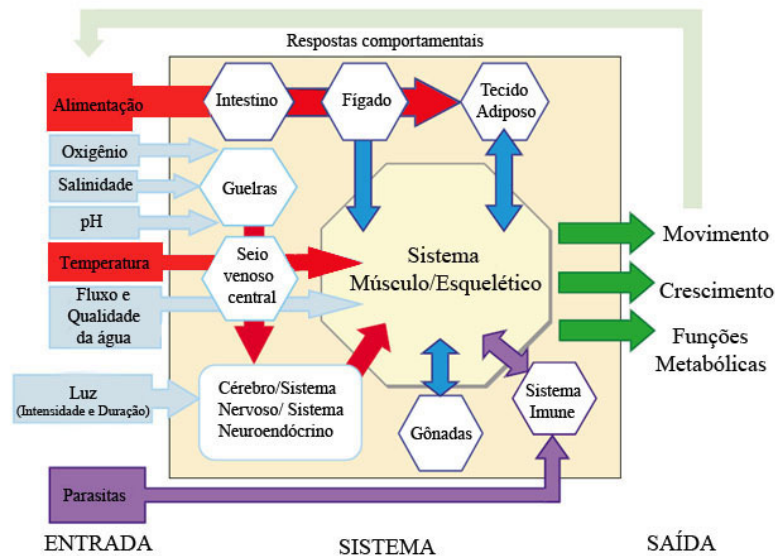


Figura 12 – Esquema demonstrando como as alterações nas condições ambientais (oxigênio, salinidade, pH, temperatura, fluxo de água, iluminação) e no sistema fisiológico podem afetar a histofisiologia e o fenótipo do músculo esquelético em peixes. Adaptado de Johnston, 2006.

Estudos têm demonstrado que a temperatura pode promover vários efeitos no crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético (Vieira e Johnston, 1992; Johnston et al., 1998).

A temperatura pode causar alterações na celularidade do músculo esquelético (número e tamanho das fibras musculares), especialmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento (embrionário e larval). A temperatura de cultivo pode afetar o número e/ou tamanho das fibras musculares, através da alteração na taxa de proliferação e diferenciação das células miogênicas, embora o efeito exato da temperatura de cultivo possa variar entre espécies e o período sazonal estudado (Vieira e Johnston, 1992; Usher et al., 1994; Johnston, 1999).

Em zebrafish (*Danio rerio*) cultivados em diferentes temperaturas de incubação (22°, 26° e 31°C), observaram-se diferenças consideráveis quanto ao desenvolvimento e número final de fibras musculares brancas. Nos peixes mantidos a 22 e a 31° C, o comprimento final foi de 25 e 23 mm, respectivamente, e o número final de fibras (3009±28 e 3081±35, respectivamente) foram igualmente menores, quando comparados com os animais cultivados a 26° C que apresentaram maior comprimento final (28 mm) e maior número de fibras (3559±35) (Johnston et al., 2009).

Em um estudo com incubação de ovos de pacu em diferentes temperaturas (25°, 27° e 29° C), o crescimento dos peixes apresentou diferenças significativas entre as temperaturas estudadas, sendo que após 60 dias (pós-eclosão), os animais que foram incubados a 29°C, apresentaram maior comprimento total, maior número de núcleos e fibras brancas quando comparados com ovos incubados a 25° e 27°C (Assis et al., 2004).

Em peixes de clima temperado, como o salmão do Atlântico, as temperaturas de incubação (2°, 5° e 8°C) influenciaram no desenvolvimento dos somitos. Os animais criados na temperatura mais elevada de 8°C desenvolveram os somitos mais rapidamente que os animais cultivados nas temperaturas inferiores de 2° e 5°C. (Mcqueen et al., 2007).

Em geral a taxa de desenvolvimento e crescimento dos peixes aumenta quando a temperatura da água é aumentada até atingir a temperatura próxima à temperatura ótima para o cultivo da espécie. Além disso, na medida em que as diferentes espécies de peixe têm sido introduzidas em diversas regiões geográficas do mundo, a adaptação desses animais à temperatura da água em seus novos habitats receberam especial atenção (El-Sayed, 2006).

Sifa et al. 2002, observaram que duas linhagens selvagens de tilápias do Nilo, encontradas na China, tiveram melhor tolerância ao frio do que a linhagem GIFT; os autores atribuíram isso aos seguintes fatores: a recente introdução da linhagem GIFT na China não possibilitou a seleção desta linhagem a baixas temperaturas; as linhagens africanas introduzidas na China há vários anos, foram expostas a baixas temperaturas da água e assim possibilitou uma espécie de seleção natural. Outra possibilidade para esta baixa tolerância ao frio, pode ser consequência de eventual contaminação com

*Oreochromis mossambicus* (que possui baixa tolerância ao frio) durante a seleção da linhagem GIFT.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da temperatura de cultivo sobre a musculatura banca de juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT. Para tanto foram avaliados parâmetros como morfologia e distribuição do diâmetro médio das fibras musculares (grau de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares), a expressão dos fatores regulatórios miogênicos (MyoD e miogenina) e do fator de crescimento (miostatina) de peixes cultivados nas temperaturas de 22, 28 e 30°C em diferentes períodos 7, 30 e 60 dias.

## 3 - Material e Métodos

### 3.1 - Instalações e condições experimentais

O experimento foi conduzido no Pólo Regional da Alta Sorocabana, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), com sede em Presidente Prudente, SP e iniciou-se em novembro de 2009.

Foram utilizados alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT (do inglês Genetically Improved Farmed Tilapia). Os peixes, oriundos de uma população monosexo masculina, foram mantidos em três sistemas de recirculação. Cada sistema contendo duas caixas d'água de 0,5 m<sup>3</sup>, sendo que cada caixa recebeu 50 alevinos pesando aproximadamente 1,4 g. A temperatura da água dos sistemas de recirculação foram mantidas à 22 ± 1.5° C, 28 ± 1° C e 30 ± 1.5° C. O oxigênio dissolvido e a temperatura d'água foram monitorado diariamente, os parâmetros físico-químicos da água como o pH, alcalinidade, dureza, amônia, nitrito e nitrato, foram monitorados semanalmente.

Todas as tilápias foram alimentadas com uma mesma ração comercial, específica para cada fase de crescimento, sendo a quantidade fornecida de acordo com a biomassa do tanque e a temperatura da água.

Em cada período analisado (7, 30 e 60 dias), foram realizadas amostragens de 10 peixes e após terem passado por um período de jejum de 24 horas, foram insensibilizados por choque térmico (água e gelo) e abatidos (anóxia). Os peixes amostrados foram pesados (g), medidos em comprimento padrão (cm), foram retiradas amostras da musculatura dorsal para serem utilizadas nas análises de morfometria e de expressão gênica.

### 3.2 - Preparações das amostras para a análise morfológica e morfométrica

As amostras de tecido muscular da região do músculo branco foram removidas na porção mediana do corpo, abaixo da nadadeira dorsal para posterior análise das fibras brancas conforme ilustradas na Figura 14.

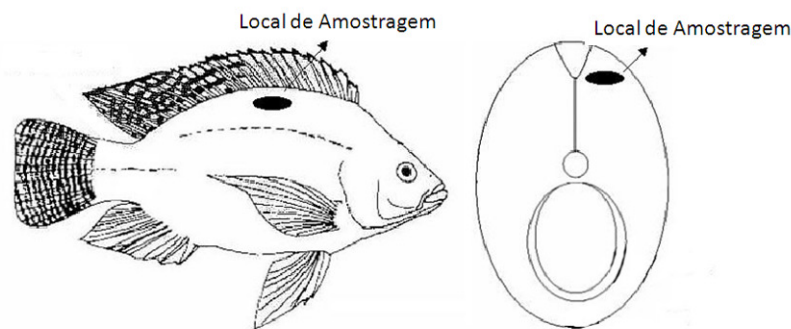


Figura 13. Localização da amostra tecidual. À esquerda está apresentada à vista longitudinal do peixe e a direita, seção transversal do corpo localizando a amostra musculatura tomada abaixo da nadadeira dorsal.

As amostras musculares foram fixadas em formalina tamponada (10%), preservadas em álcool 70 % e submetidas à inclusão em historresina. Secções transversais de 4  $\mu$ m foram coradas em hematoxilina e eosina e montadas em lâminas de microscopia, e foram avaliadas quanto à morfologia. Utilizando um sistema de análise de imagens (Leica Qwin, Germany), foi calculada a área de 200 fibras musculares por animal, sendo o diâmetro de cada fibra foi determinado utilizando a seguinte fórmula:  $D = 2A^{0.5} \pi^{-0.5}$  (Valente et al., 1999). Os valores do diâmetro médio das fibras musculares

foram agrupados, nas seguintes classes de diâmetros <20, 20-50 e >50 (Almeida et al. 2008).

### **3.3 - Análise da expressão gênica da MyoD, Miogenina e da Miostatina**

Para análise da expressão gênica, foram retirados fragmentos musculares da região dorsal (Figura 14), congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C.

#### **3.3.1- Extração do RNA**

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs, MyoD, Miogenina e da Miostatina na musculatura esquelética da tilápia foi realizada através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR). Para isso, foi realizada a extração do RNA total com auxílio de um homogeneizador de tecidos (IKA Ultra Turrax/T-25) em 1ml de TRIzol/100mg tecido. O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-proteico. Em seguida, 0,2 mL de clorofórmio foram acrescentados e a solução foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa formada foi retirada e transferida para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico. Esta solução foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O pellet de RNA formado após a centrifugação foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante removido cuidadosamente. O pellet de RNA foi seco em temperatura ambiente durante 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em água ultrapura, e incubado por 30 minutos a 0° C. Em seguida o RNA foi armazenado à -80°C.

#### **3.1.2 - Quantificação e integridade do RNA**



Uma alíquota de 2 µl de RNA total extraído foi quantificado, com auxílio de um espectrofotômetro NanoVue (ND-1000 - Thermo Scientific). A integridade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S, após eletroforese de 1 µg de RNA em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA).

### **3.1.3 - Tratamento do RNA com DNase**

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

### **3.3.4 - Transcrição Reversa (RT)**

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o Kit High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), onde 2 µg de RNA total obtido do músculo esquelético foram acrescidos de 10 µl de tampão de transcriptase reversa (10X RT buffer), 4 µL de dNTP (25X), 10 µL de Randon Primers (10X), 5 µL de enzima transcriptase reversa (50 unidades/µl), 5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT (40 unidades/µL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o volume final da reação ajustado para 100 µL com água ultrapura. As amostras foram incubadas durante duas horas no termociclador: 10 minutos à 95° C, 40 ciclos de 15 segundos para denaturação à 95° C e anelamento a 55° C e extensão à 72° C por uma hora. Em seguida, os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C.

### **3.3.5 - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)**

Foram desenhados primers para os genes Miostatina, MyoD e Miogenina e para os genes de referência  $\beta$ ACT, EF1a e RPL13, a partir de seqüências publicadas no GenBank (Tabela 1). A amplificação de todos os genes foi realizada no termociclador e os produtos da reação de PCR foi verificada por sequenciamento nucleotídico, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A partir das sequências obtidos do sequenciamento, e com o objetivo de confirmar se os fragmentos amplificados eram realmente referentes os genes estudados, realizou-se um alinhamento das seqüências obtidas com as seqüências publicadas de outros peixes. Após a confirmação das seqüências obtidas, foram desenhados novos primers específicos para serem utilizados na PCR em tempo real (qPCR).

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs MyoD, Miogenina e da Miostatina foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real com a utilização do Kit *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para cada amostra muscular, utilizou-se 2  $\mu$ L cDNA (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5  $\mu$ L de *Power SYBR<sup>®</sup> Green Mix* (2,5X), 1,5  $\mu$ L de primers “sense” e 1,5  $\mu$ L de primer “anti-sense” e 7,5  $\mu$ L de água ultrapura, suficiente para um volume final de 25  $\mu$ L de solução. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. Os valores obtidos de “corrida” foram normalizados pelos valores obtidos dos genes de referência  $\beta$ ACT, EF1a e RPL13 e ao término de cada PCR foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

Tabela 1 Descrição do gene, Sequência do primer, tamanho eficiência da amplificação

Identificação do Gene	Sequência do Primer	Tamanho da amplificação (bp)	Eficiência Amplificação
MyoD 1 (GU246722)*	5' CATCCAGCCCCGCTCCAAC 3' 5' GTCTGACAGGTGGGGCCGTT 3'	64	1.835
MyoG (GU246725)*	5' CTCAACCAGCAGGACACTGA 3' 5' ATCCTCGCTGCTGTAGCTCT 3'	171	1.745
MSTN 1 (FJ972683)*	5' CGCAACCACGGAGACAATT 3' 5' CACCTGGACAGCGGAATCA 3'	58	1.846
$\beta$ ACT (EU887951)*	5' ACCTTCAACACCCCCGCCAT 3' 5' ACAGGGACAGCACAGCCTGGAT 3'	52	1.85
EF1a (AB075952)*	5' CCAGAACGACGGTCGATCTT 3' 5' GCCCACATCGCTTGCAA 3'	56	1.76
RPL13**	5' AGATAACCCTGGCCTTCTCCTT 3' 5' GCTCGCTGGTCCAGTCATG 3'	62	1.913

\* Número de acesso GenBank

\*\* Sequência obtida através do alinhamento de varias sequência publicadas de espécies de peixes

### **3.4 - Análise Estatística**

Os dados de desempenho foram analisados através da análise de variância (Anova) seguido do teste de comparações múltiplas Tukey, considerando o nível de 5% de significância. Para a análise de expressão gênica os dados foram analisados através da análise de variância não paramétrica (Kruskal Wallis) seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, considerando o nível de 5% de significância (ZAR, 2009).

### Referências Bibliográficas

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., e Estrada, M. P. 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of biotechnology*, 119(4), 324-31.
- Aguiar, D. H., Barros, M. M., Padovani, C. R., Pezzato, L. E., e Dal Pai-Silva, M. 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *Journal of Fish Biology*, 67(5), 1287-1298.
- Alexander, R. 1969. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, Cambridge, 263-90.
- Almeida, F. L. A.; Carvalho, R. F.; Pinhal, D. et al. 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron*, 39, 1306 - 11.
- Almeida, F. L. A., Pessotti, N. S., Pinhal, D., Padovani, C. R., Leitão, N. J., Carvalho, R. F., Martins, C., et al. 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*, 41(8), 997–1004. Elsevier.
- Altringham, J. D., e Ellerby, D. J. 1999. Fish swimming: patterns in muscle function. *The Journal of experimental biology*, 202(Pt 23), 3397-403.
- Altringham, J. D., e Johnston, I. A. 1981. Quantitative histochemical studies of the peripheral innervation of cod (*Gadus morhua*) fast myotomal muscle fibres. *Journal of Comparative Physiology A*, 143(1), 123-127.
- Assis, J. M. F. D., Carvalho, R. F., Barbosa, L., Agostinho, A., e Dal Pai-Silva, M. 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 237, 251 - 267.
- Bentsen, H.B., A.E. Eknath, M.S. Palada-de Vera, J.C. Danting, H.L. Bolivar, R.A Reyes, E.E. Dionisio, F.M Longalong, A.V Circa, M.M. Taymen, and B. Gjerde. 1998. "Genetic improvement of farmed tilapias: growth performances in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*". *Aquaculture* 160: 145-173.

- Biga, P. R., Cain, K. D., Hardy, R. W., Schelling, G. T., Overturf, K., Roberts, S. B., Goetz, F. W., et al. 2004. Growth hormone differentially regulates muscle myostatin1 and -2 and increases circulating cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*, 138(1), 32-41.
- Biga, P. R., e Goetz, F. W. 2006. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 291(5), 1327-37.
- Blackwell, T. K., e Weintraub, H. 1990. Differences and similarities in DNA-Binding MyoD and E2A Protein Complexes Revealed by Binding Site Selection. *Science*, 250, 1104-1110.
- Bone, Q. 1978. Locomotor muscle. *Fish physiology*, 7, 361–424. Elsevier.
- Buckingham, M. 2007. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *Comptes rendus biologiques*, 330(6-7), 530-3.
- Castagnolli, N. 1992. *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, pp. 189.
- Cole, N. J., Hall, T. E., Martin, C. I., Chapman, M. a, Kobiyama, A., Nihei, Y., Watabe, S., et al. 2004. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. *The Journal of experimental biology*, 207(Pt 24), 4239-48.
- DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F.; PELLIZZON, C. H.; PAI, V. DAL. 2003. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell*, 35(3), 179-187.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., e Carvalho, R. F. 2005. Célula muscular estriada esquelética. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. Editora Manole: São Paulo, 83–94. São Paulo: Manole.
- Du, S. J. 2004. Molecular regulation of fish muscle development and growth. In G. Zhiyuan e V. Korzh (Eds.), *Fish development and genetics: the zebrafish and medaka models* (2nd ed., pp. 339–391). Singapore: World Scientific Publishing.
- Edmondson, D. G., e Olson, E. N. 1993. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 755–755.

- Edmondson, D., Lyons, G. E., Martin, J. F., e Olson, E. N. 1994. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 120(5), 1251-63.
- El-Sayed, A.-F. M. 2006. *Tilapia Culture*. (A.-F. M. El-Sayed, Ed.) *Aquaculture*. pp. 2-293). King's Lynn: Cabi.
- FAO. 2010. *The state of world fisheries and aquaculture*.
- Figueiredo, M. A., Mareco, E. A., Silva, M. D. P., e Marins, L. F. 2011. Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic research*.
- Franck, G., Eddy, T., e André, D. 2009. *An atlas of fish histology: normal and pathological features*. *Annals of Physics (Vol. 54, pp. 1-219)*. Brussels: Science Publishers.
- Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y., Hosoda, Y., Takashi, O., e Nabeshima, Y.-ichi. 1990. Myogenin Factors Two Domains Conserved among Myogenic Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25), 15219-15223.
- Garikipati, D. K., Gahr, S. A., Roalson, E. H., Rodgers, B. D., e Virginia, W. 2007. Characterization of *Rainbow Trout* Myostatin-2 Genes Expression , and Pseudogenization. *Cloning*, 2106-2115.
- Hawke, T. J., Garry, D. J., Lueders, T. N., Zou, K., Huntsman, H. D., Meador, B., Mahmassani, Z., et al. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*, 91, 534-551.
- Hopwood, N. D., Pluck, a, e Gurdon, J. B. 1989. A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell*, 59(5), 893-903.
- Johnston, I. A. 1981. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flatfish *Pleuronectes platessa*. *Cell and tissue research*, 214(2), 369-86.
- Johnston, I. A., Vieira, V., e Abercromby, M. 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring *Clupea harengus*. *The Journal of experimental biology*, 198(Pt 6), 1389-403.
- Johnston, I. A., Cole, N. J., Vieira, V., e Davidson, I. 1997. Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. *The Journal of experimental biology*, 200, 849-68.

- Johnston, I. A.; Cole, N.; Abercromby, M.; Vieira, V. L. A. 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *Journal of Experimental Biology*, 201, 623-46.
- Johnston, I. A. 1999. Muscle development and growth : potential implications for flesh quality in fish. *Atlantic*, 99-115.
- Johnston, I. A., McLay, H. a, Abercromby, M., e Robins, D. 2000. Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellite cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. *The Journal of experimental biology*, 203(Pt 17), 2539-52.
- Johnston, I. A. 2004. Mechanisms of Muscle Development and Responses to Temperature Chan in Fish Larvae. *American Fisheries Society Symposium*, 85-116.
- Johnston, I. A. 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of experimental biology*, 209(Pt 12), 2249-64.
- Johnston, I. A.; Lee, H.-T.; Macqueen, D. J. et al. 2009. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *The Journal of experimental biology*, 212, 1781-93.
- Johnston, I. A. A., Bower, N. I., e Macqueen, D. J. 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of experimental biology*, 214(Pt 10), 1617-28.
- Killeen, J.; Mclay, H. .; Johnston, I. A. 1999. Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons. *Journal of Fish Biology*, 55, n. 2, p. 382-404.
- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, K., Suetake, H., Johnston, I. A., e Watabe, S. 1998. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. *Journal of experimental biology*, 201(20), 2801. Company of Biologists.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., e Kambadur, R. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of biological chemistry*, 277(51), 49831-40.

- Lassar, a B., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D., e Weintraub, H. 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, 58(5), 823-31.
- Lee, C.-Y., Hu, S.-Y., Gong, H.-Y., Chen, M. H.-C., Lu, J.-K., e Wu, J.-L. 2009. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochemical and biophysical research communications*, 387(4), 766-71. Elsevier Inc.
- Leeuwen, J. L. V. A. N. 1999. A MECHANICAL ANALYSIS OF MYOMERE SHAPE IN FISH. *Journal of Experimental Biology*, 3414, 3405-3414.
- Macqueen, D. J., Robb, D., e Johnston, I. A. 2007. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of experimental biology*, 210(Pt 16), 2781-94.
- Matsakas, A., e Patel, K. 2009. Intracellular signalling pathways regulating the adaptation of skeletal muscle to exercise and nutritional changes. *Histology and histopathology*, 24(2), 209-22.
- Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9, 493-5.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M., e Lee, S. J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*. Nature Publishing Group.
- Michelin, A. C., Justulin, L. A., Delella, F. K., Padovani, C. R., Felisbino, S. L., e Dal Pai-Silva, M. 2009. Differential MMP-2 and MMP-9 activity and collagen distribution in skeletal muscle from pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during juvenile and adult growth phases. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 292(3), 387-95.
- MPA. 2010. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., et al. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58(3), 537-44.



- Müller, U. K., Smit, J., Stamhuis, E. J., e Videler, J. J. 2001. How the body contributes to the wake in undulatory fish swimming: flow fields of a swimming eel (*Anguilla anguilla*). *The Journal of experimental biology*, 204(Pt 16), 2751-62.
- Ostbye, T.-K. K., Wetten, O. F., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K. S., Yafe, A., Etzioni, S., Moen, T., et al. 2007. Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. *Gene*, 403(1-2), 159-69.
- Otto, A., e Patel, K. 2010. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Experimental cell research*, 316(18), 3059-66. Elsevier Inc.
- Patrino, M., Maccatrozzo, L., Funkenstein, B., e Radaelli, G. 2006. Cloning and expression of insulin-like growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry e molecular biology*, 144(2), 137-51.
- Patrino, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., et al. 2008. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell and tissue research*, 331(3), 643-58. 0
- Pelegri, F. 2004. The Role of Maternal Factors in Early Zebrafish Development. (C. Leong e K. Vanya, Eds.) in *Fish Development and Genetics the Zebrafish and Medaka Models* (2nd ed., pp. 1-38). World Scientific Publishing.
- Popma, T., e Masser, M. 1999. *Tilapia: life history and biology. Growth* (Lakeland). Southern Regional Aquaculture Center.
- Rescan, P. Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., e Fauconneau, B. 1994. Identification of a muscle factor related to MyoD in a fish species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1218(2), 202–204. Elsevier.
- Rescan, P. Y., Gauvry, L., e Paboeuf, G. 1995. A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the *Rainbow trout* and in vitro during the conversion of myosatellite cells to myotubes. *Cloning*, 362, 89-92.
- Rescan, P. Y. 2001. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry e molecular biology*, 130(1), 1-12.

- Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V., e Levine, M. a. 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology*, 142(4), 1412-8.
- Rodgers, B. D., Roalson, E. H., Weber, G. M., Roberts, S. B., e Goetz, F. W. 2007. A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292(2), E371-2.
- Rowlerson, A., e Veggetti, A. 2001. Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth. In I A Johnston (Ed.), *Muscle Development and Growth* (1st ed., pp. 101-130). San Diego - Califórnia.
- Staron, R. S., e Pette, D. 1993. The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry*, 100(2), 149-53.
- Stellabotte, F., e Devoto, S. H. 2007. The teleost dermomyotome. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(9), 2432-43.
- Sänger, A., e Stoiber, W. 2001. 7. Muscle fiber diversity and plasticity. In I. a Johnston (Ed.), *Fish physiology* (Vol. 18, pp. 187–250). Elsevier.
- Usher, M. L., Stickland, N. C. and Thorpe, J. E. 1994. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. *Journal of Fish Biology* 44, 953–964.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., e Fauconneau, B. 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of *Rainbow trout*. *Journal of Fish Biology*, 55, 675-691.
- Vasyutina, E., Lenhard, D. C., e Birchmeier, C. 2007. Notch Function in Myogenesis ND SC RIB. *Cell Cycle*, (June), 1451-1454.
- Vieira, V. I. A.; Johnston, I. A. 1992. Influence of temperature on muscle-fibre development in larvae of the *herring Clupea harengus*. *Marine Biology*, 112, 333-341.
- Videler, J. J. 2011. An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. *Fish physiology and biochemistry*, 37(2), 337-43.

- 
- Watabe, S. 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of Fish Biology*, 55, 1-18.
- Watabe, S. 2001. Myogenic regulatory factors. In I.A. Johnston (Ed.), *Muscle development and growth* (1st ed., Vol. 156, pp. 19-39). San Diego - California: ACADEMIC PRESS INC.
- Weatherley, A. H., e Gill, H. S. 1985. Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth. *Experientia*.
- Weatherley, A. H., e Gill, H. S. 1987. *The Biology of Fish Growth*. Growth (Lakeland) (pp. 2 - 442). London: ACADEMIC PRESS INC.
- Weinberg, E. S., Allende, M. L., Kelly, C. S., Abdelhamid, a, Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O. G., et al. 1996. Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development* (Cambridge, England), 122(1), 271-80.
- Weintraub, Harold. 1993. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, 75(7), 1241-1244.
- Zar, J.H., 2009. *Biostatistical Analysis*, fourth 5th ed. Prentice-Hall, New Jersey, 944.
- Zhang, G., Swank, D. M., e Rome, L. C. 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenotomus chrysops*. *Journal of morphology*, 229(1), 71-81.
- Zhang, S., Bhattacharya, H., e Li, H. 2001. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*. Nature.

## **CAPITULO 1**

### **EFFECTS OF TEMPERATURE ON GENE EXPRESSION RELATED TO MUSCLE GROWTH IN NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)**

## ABSTRACT

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.), widely used in Brazilian aquaculture, stands out for its numerous qualities to the consumer market. As in other fish species, tilapia muscle development may be influenced by several factors (extrinsic and intrinsic) and, thus, it can affect the production costs. This study aimed to evaluate the morphology and expression of genes that control muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) of GIFT strain grown at different temperatures. Ninety fish (n=10) of a reverted males monosex population, weighing about 1.4 g were randomly divided into six water tanks of 0.5 m<sup>3</sup> of water recirculation system and reared in three different temperatures (22, 28 and 30°C ) for 7, 30 and 60 days. It was performed biometric and morphological analysis, along with gene expression of myogenic regulatory factors (MyoD and Myogenin) and growth factor Myostatin analysis. The gene expression analysis was performed using the technique of Polymerase Chain Reaction Real-Time after Reverse Transcription (qRT-PCR). Weight (g) and standard length (cm) data showed that temperature can influence final weight gain, and the animals grown at 22°C had lower weight from the 30<sup>th</sup> day, when compared with animals reared at 28 and 30°C. The morphometric analysis (distribution of the fibre mean diameter), did not show significant differences among animals in the studied temperatures. However, the relationship between mean diameter fibres and standard length showed that the animals reared at 22°C presented less standard length but the mean of diameter fibres was similar to the animals cultivated in the temperature of 28 and 30°C. The gene expression analysis for MyoD, showed the highest mRNA levels in animals grown at 22°C, when compared to animals reared at 28 and 30°C in almost all studied periods. The levels of mRNA for the Myogenin were constant at all studied temperatures and periods. At seven days of cultivation, we observed the lowest levels of mRNA for Myostatin 1 gene at all studied temperatures. At 30 days, there was a peak in gene expression that remained stable in animals with 60 days of treatment. This study has demonstrated that rearing temperature can influence the expression of genes related to muscle growth in juvenile Nile tilapia, promoting a higher muscle fibres hypertrophy in animals reared at 22°C. Our results show that the cultivation of this fish species at low temperatures for short time periods can be used as an alternative technology to obtain greater productivity. Studies with compensatory growth must be performed to confirm this hypothesis.

**Keywords:** myogenic regulatory factors, Myostatin, skeletal muscle, temperature rearing.

## 1. INTRODUCTION

Tilapia is a member of the Cichlidae family, which is a group of warm water fish and become the most important fish species cultivated over the world, after carp (FAO, 2010). In Brazil, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) was first introduced in 1971 in order to develop an official program for the production of tilapia stocking of reservoirs (Proença and Bittencourt, 1994). This fish species is considered an excellent mode for studies under laboratory conditions due to its high prolificacy and excellent adaptation to different environmental conditions. Tilapia has genetic variation for cold tolerance (Sifa et al., 2002), but they do not grow well at temperature below 20°C and they stop feeding at about 16°C. Longer exposure at low temperature (7-10°C) will certainly lead to mass mortality; but they are remarkably tolerant to high temperatures, up to 40°C (Azaza et al., 2008; Azaza et al., 2010).

Development and growth in fish is a complex process affected by many factors (Martinez-Palacios et al., 1996). Among these factors, temperature has shown to influence many aspects of development and growth in teleosts, including skeletal muscle. In most fish, the skeletal muscle, which is the major edible tissue, represent up to 60% of total body weight (Sänger and Stoiber, 2001). This significant percentage of muscle mass is not just a mechanical adaptation, specific to aquatic life, but also serves as an important source of protein to be used for human feed (Weatherley and Gill, 1985).

Muscle growth in fish occurs by the activity of myogenic precursors cells (MPCs) (Johnston, 1999) that provide nuclei for muscle fibre recruitment (hyperplasia) and for fibre enlargement (hypertrophy) (Koumans and Akster, 1995). During hypertrophy, as fibres expand in diameter and length, they absorb myoblast in order to maintain a relatively constant ratio between the nucleus and the cytoplasm (Koumans et al., 1994). In hyperplastic growth, new fibres form from myoblasts fusion (Rowlerson and Veggetti, 2001; Johnston, 1999).

Skeletal muscle growth is regulated by a several transcriptional factors, such as the myogenic regulatory factors (MRFs). The MRFs are a family of basic helix-loop-helix" (bHLH) transcription factors involved with the specification and determination of muscle cell lineage. The four members of this protein family, MyoD, Myf5, Myogenin, and MRF4 (Weintraub, 1993; Watabe, 1999, 2001) have a highly conserved region,

which is linked to the DNA sequence called E-box, found in the promoting regions of many specific skeletal muscle genes (Blackwell and Weintraub, 1990; Edmondson and Olson, 1993; Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989). During muscle growth or adult myogenesis, MyoD and Myf-5 regulate satellite cells activation and proliferation, whereas Myogenin and MRF4 act in the cell differentiation (Watabe, 1999, 2001).

Besides the myogenic regulatory factors (MRFs), transcriptional factors controlling muscle development and growth, the Myostatin, a transforming growth factor-b (TGF-b) family member also play an essential role in regulating skeletal muscle growth. In most animals, myostatin has as main function to down regulate skeletal muscle growth (Rodgers et al., 2001; Acosta et al., 2005; Lee et al., 2009). In vitro studies have shown that Myostatin inhibits the proliferation and differentiation of satellite cell (Thomas et al., 2000; Langley et al., 2002). Several studies have shown that Myostatin in fish has a wider role not only limited to skeletal muscle growth inhibition but also contributes to the homeostatic growth control of other tissues (Østbye et al., 2001; Amali et al., 2004).

It was found that temperature influences many aspects of development in fish, including muscle cellularity (Vieira and Johnston, 1992; Assis et al., 2004; Hall et al., 2003), myofibrillogenesis (Johnston et al., 1997) and MRFs gene expression (Macqueen et al., 2007). However, the results related to MRFs gene expression were variable according to the muscle growth development phase and the specie studied.

By contrast to the mammals in which the muscle growth by hyperplastic mechanism generally stops at or shortly after birth (Goldspink, 1972), in fish, this ability is maintained for longer, even after juvenile stage (Weatherley and Gill, 1987). As tilapia exhibit an indeterminate muscle growth pattern, it is possible that, change in temperature regime during juvenile phase can alter the muscle growth characteristics and gene expression of muscle growth factors. Most studies that have the purpose of understanding the effect of temperature on muscle growth in fish, aim at verifying the effect of temperature on the initial periods of development (embryogenesis period), in animals of temperate climate (James et al., 1998; Macqueen et al., 2007). In our study, we aim at evaluating the influence of different rearing temperature on muscle growth characteristics and gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), which is an animal of tropical climate.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Experimental design

The experiment was performed in the Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA - São Paulo's Agency of Agribusiness Technology), Presidente Prudente, SP, Brazil, and in the Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME - Skeletal Muscle Biology Laboratory), Department of Morphology, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

Nile tilapia fingerlings used in this experiment were obtained from a population monosex male (fed with  $17\alpha$ -methyltestosterone). Ninety fish, weighing about 1.4 g, were kept in tanks of 0.5 m<sup>3</sup> with water recirculation systems with controlled temperatures of  $22 \pm 1.5^\circ\text{C}$ ,  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $30 \pm 1.5^\circ\text{C}$ , at different ages (7, 30 and 60 days of treatment). All fish were fed four times a day with the same commercial diet according to age, biomass and water temperature and kept in a photoperiod regime in relation 12:12 (light: dark). Fish were randomly distributed in the temperature with two replicates.

At 7<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days, fish from all reared temperature were stunned by thermal shock (water and ice) and sacrificed by anoxia. Fish were individually weighed (g), measured (mm) and the dorsal white muscle samples were collected for morphological and molecular analysis. This experiment was approved by the Ethics Committee of the Biosciences Institute, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

### 2.2 Morphological and morphometric analysis

Muscle samples were fixed in 10% buffered formalin and preserved in 70% ethanol. Samples were dehydrated with a series of ethanol concentrations (80, 90 and 95%) and soaked in resin (Historesin - Leica Instruments GmbH, Germany), according to the manufacturer's recommendations. Transverse histological sections (4  $\mu\text{m}$ ) of muscle fibres were obtained through a glass-razor microtome. Sections were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) method. Fibre cross-section diameter ( $\mu\text{m}$ ) was estimated by measuring 200 white muscle fibres from each animal per group using an image



analysis system (Leica Qwin, Germany). The area of white muscle fibres was measured and fibre diameter determined using the formula  $D = 2A^{0.5} \pi^{-0.5}$  (Valente et al., 1999).

## 2.3 MyoD 1, Myogenin and Myostatin 1 mRNA expression

### 2.3.1 RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA extraction was performed from white deep muscle sample using TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The amount of RNA extracted was determined using a NanoVue plus Spectrophotometer. RNA purity was ensured by obtaining a 260/280 nm OD ratio equal to 2.0. RNA extracted were analysed using the RNA 6000 Pico Bioanalyzer (Agilent). The samples (1 ml) were separated electrophoretically as described by the manufacturer and data were displayed as a gel-like image and/or an electropherogram. All poor quality RNA samples were discarded.

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

These samples were then PCR amplified with specific primers to MyoD 1, Myogenin and Myostatin I genes. All PCR products were sequenced using the *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing kit* (GE Healthcare - Amersham Biosciences) procedures. The partial nucleic acid sequences obtained (unpublished data) were analyzed in BLASTN search at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and used to design primer pairs for the qRT-PCR analysis with *Primer Express®* software (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

## 2.4 Quantitative expression analysis (RT- qPCR)

ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) and SYBR Green (Power SYBR® Green - Applied Biosystems) was used for RT- qPCR. To ensure the quality of data during all methods of RT- qPCR, it was followed the suggestion of the ‘minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments’ (i.e. the MIQE) (Bustin et al., 2010). It was designed a set of primers specific for the genes of a MyoD 1, Myogenin and Miostatina1 and for reference genes,  $\beta$ ACT and elongation factor1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) (Table 1). Gene-specific primers were selected with Primer 3 software and the specificity of each primer set was confirmed by dissociation curve analysis. One primer per pair spanned an intron/exon border. Cycling conditions were: 10 min at 95°C, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s and annealing/extension at 60°C for 1 min. PCR efficiencies were calculated in LinReg PCR (Ramakers et al., 2003).

Table 1. Gene description, primer sequences and amplification size and efficiency

Gene identification	Primer sequence	Amplification size (bp)	Amplification efficiency
MyoD 1 (GU246722)*	F: 5' CATCCAGCCCCCGCTCCAAC 3' R: 5' GTCTGACAGGTGGGGCCGTT 3'	64	1.83
MyoG (GU246725)*	F: 5' TACCGGCCAGCCCAACTCA 3' R: 5' AGCTCTGCGTGCACTGCTCTG 3'	115	1.74
MSTN 1 (FJ972683)*	F: 5' CGCAACCACGGAGACAATT 3' R: 5' CACCTGGACAGCGGAATCA 3'	58	1.84
$\beta$ ACT (EU887951)*	F: 5' ACCTTCAACACCCCCGCCAT 3' R: 5' ACAGGGACAGCACAGCCTGGAT 3'	52	1.85
EF1 $\alpha$ (AB075952)*	F: 5' CCAGAACGACGGTTCGATCTT 3' R: 5' GCCCACATCGCTTGCAA 3'	56	1.76

\*GenBank ID number

## 2.5 Statistical analysis

ANOVA complemented with the (Tukey) Multiple Comparisons Test, was performed to analyse weight, standard length, diameter and density of white fibres data. The muscle fibres were grouped into classes, depending on their diameter as follows: <20, 20-40, 40-60, 60-80 and >80  $\mu$ m. Muscle fibre frequency (%), was expressed as the number of fibres from each diameter class relative to the total number of fibres measured. Relative gene expression data were expressed as minimum, 1<sup>st</sup> quartile,

median, 3<sup>rd</sup> quartile and maximum values and Dunn test was used to compare means among treatments. Statistical significance level was set at  $P < 0.05$  for all analyses.

### 3 RESULTS

The mean values of water physic-chemical parameters during the experimental period are shown in Table 2. All parameters were considered appropriate for tilapia cultivation (El-Sayed, 2006).

Table 2. Mean values of dissolved oxygen (mg/L), pH, alkalinity (mg/L), hardness (mg/L), ammonia concentrations (mg/L), nitrite (mg/L) and nitrate (mg/L) during the experimental period.

Parameter	Temperature		
	22.0°C	28.0°C	30.0°C
Oxygen (mg / L)	5.24	5.15	4.71
pH	7.05	7.16	7.08
Alkalinity (mg / L)	114.56	100.24	110.98
Hardness (mg / L)	229.12	273.87	297.14
Ammonia (mg / L)	0.03	0.03	0.05
Nitrite (mg / L)	1.3	3.3	2.75
Nitrate (mg / L)	50	70	68.5

Seven days from the beginning of the experiment, no differences in the body weight and standard length were observed in fish in the temperature studied. At 30<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> days, body weight and standard length were higher in fish that was cultivated in 28 and 30°C. During the experimental period, fish cultivated in all temperature showed increase in the body weight and standard length (Table 3).

Table 3. Mean and standard deviation (SD) of body weight (g) and standard length (cm) during the experimental period.

	Day	Temperature (°C)		
		22	28	30
Body weight (g)	7 <sup>th</sup>	1.48 (0.48) Ba	1.88 (0.88) Ca	1.76 (0.65) Ca
	30 <sup>th</sup>	3.88 (1.33) Bb	12.95(3.80) Ba	15.83(6.71) Ba
	60 <sup>th</sup>	9.74 (4.36) Ab	49.94 (16.25) Aa	64.20 (14.80) Aa
Standard length (cm)	7 <sup>th</sup>	3.47(0.41) Ca	3.88 (0.87) Ca	3.86 (0.41) Ca
	30 <sup>th</sup>	4.51(0.54) Bb	6.68 (0.81) Ba	7.25(1.05) Ba
	60 <sup>th</sup>	6.05 (0.85) Ab	10.63 (1.29) Aa	11.65 (1.03) Aa

Capital letters compare means within days of treatments and lower-case letters compare means among temperatures. Means followed by different letters are not equal according to the Tukey test at 5%.

### 3. 1 Muscle morphology

Hematoxilin and Eosin stain showed white skeletal muscle making up most of the muscle mass in fish cultivated in all temperature and the morphological characteristics were also similar in the fish. The muscle consisted of round or polygonal muscle fibres separated by a connective tissue of the endomysium and the perimysium. Muscle fibres were distributed in a mosaic pattern characterized by fibres of different diameters (Figure 1).

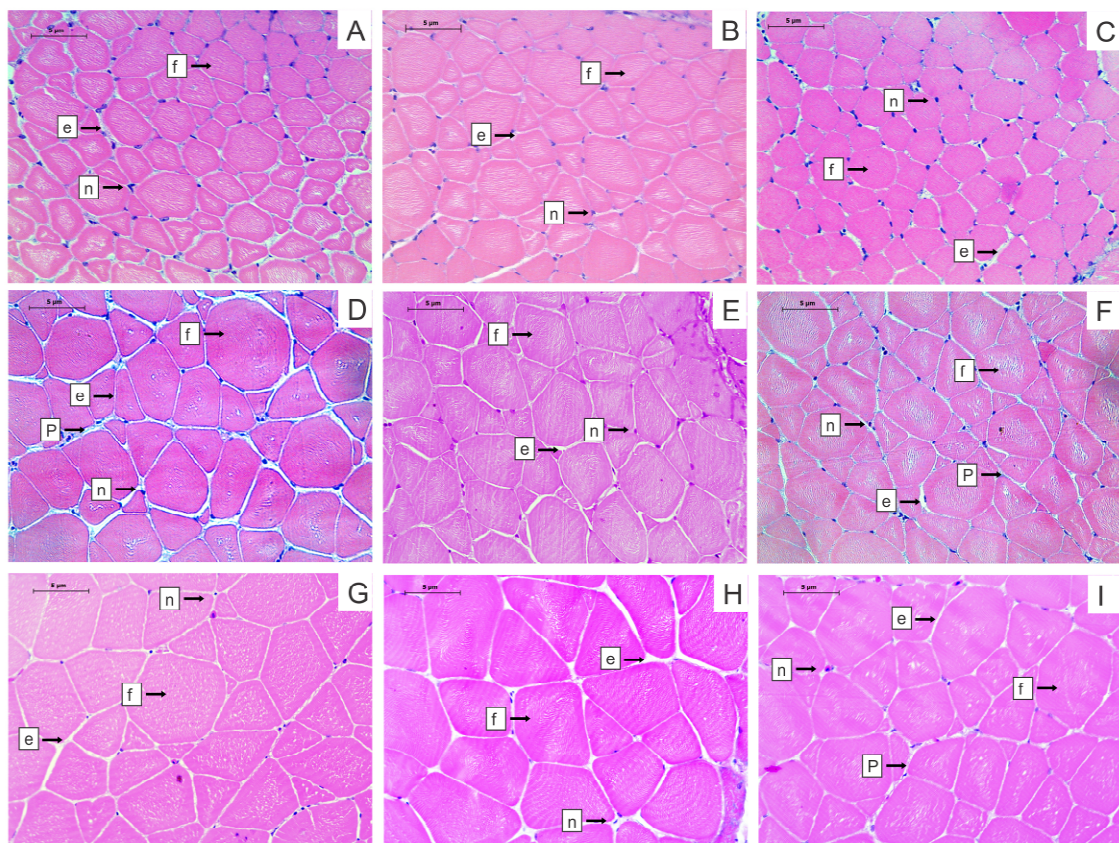


Figure 1 - Transverse sections white skeletal muscle of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at 22 (A, D and G), 28 (B, E and H) and 30°C (C, F and I) of three periods of treatment 7 (A, B and C), 30 (D, E and F) and 60 days (G, H and I). At all temperatures and periods analysed, we observed a normal pattern of growth of muscle fibres with larger and smaller diameters (mosaic pattern of growth). Muscle fibres (f), nucleus (n), endomysium (e), perimysium (p). Hematoxilin-eosin stain. Bars: 5 µm.

The muscle fibre frequency distribution was similar in fish reared in the three temperatures and also during the analysed periods (7, 30 and 60 days).

At seven day of experiment, it was observed a higher muscle fibres frequency in the classes of 20-40 and 40-60  $\mu\text{m}$ , followed by the class of 60-80  $\mu\text{m}$ . At 30 days, a more homogeneous distribution of muscle fibres was observed, with fibres frequency higher in the class 40-60  $\mu\text{m}$ . At 60 days, most fibres had a diameter in the class 60-80 and  $>80$   $\mu\text{m}$ . The frequency of muscle fibres in the class  $<20$   $\mu\text{m}$  was low at all temperatures and periods analysed (Figure 2).

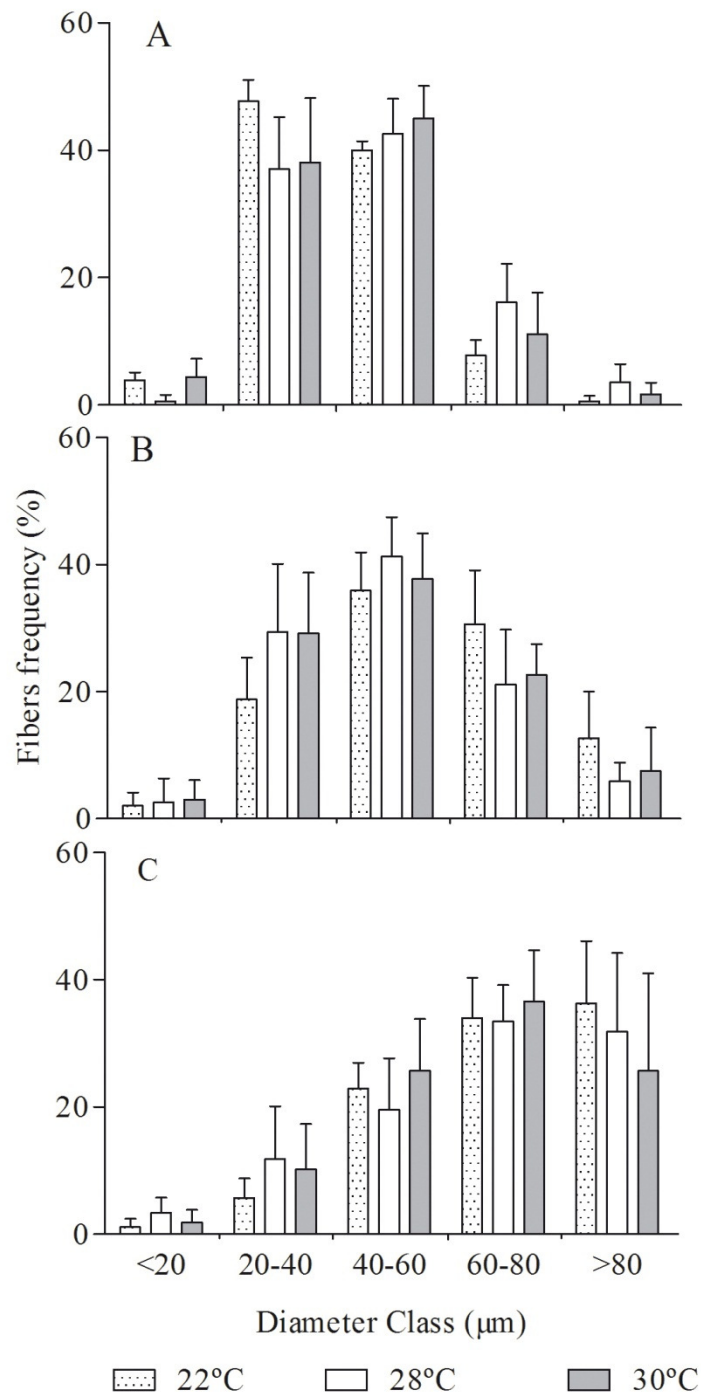


Figure 2 - Distribution of the mean diameter of muscle fibres of the white muscle of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in temperatures of 22, 28 and 30°C in three periods of treatment, 7 (a), 30 (b) and 60 (c) days. Each column represents the frequency (%) of a diameter class of white muscle fibres.

The relationship between mean diameter fibres (200 muscle fibres) and standard length showed a similarity in the muscle fibres diameter at 7 days of rearing period.

From 30 days, fish cultivated 22°C presented less standard length; however, mean diameter fibres was similar to the fish cultivated in the temperature of 28 and 30°C.

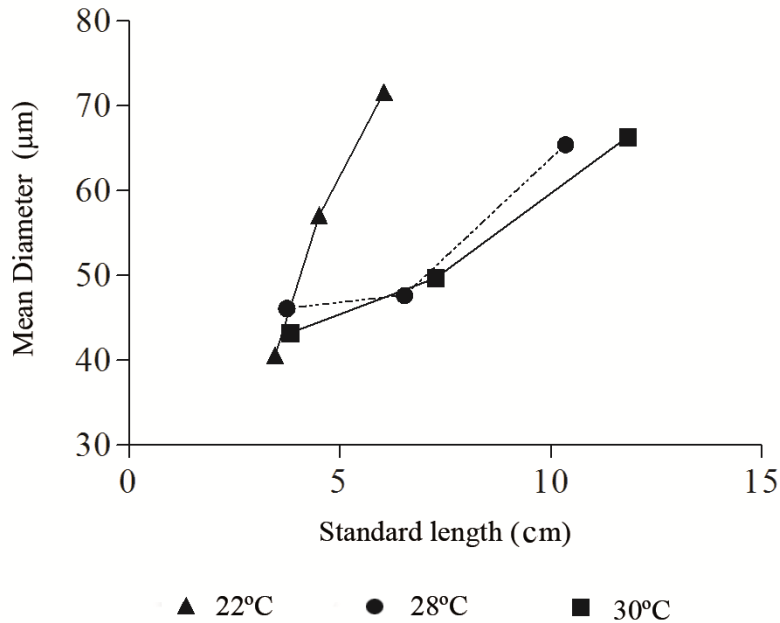


Figure 3 - The relationship between the mean diameters of white muscle fibres and the standard length for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in 22 (▲), 28 (●) and 30°C (■) at 7, 30 and 60 days.

### 3.3. MyoD 1, Myogenin and Myostatin I mRNA Expression

At 7 days, the expression level of MyoD 1 was higher in fish reared at temperature of 22°C in comparison to the ones reared at 30°C. At 30 days, MyoD 1 mRNA levels were similar among the reared temperature and at 60 days, MyoD 1 mRNA levels were similar at 22 and 30°C, being higher than those reared at 28°C. During growth, MyoD 1 levels increased at 22 and 30°C, being similar at 28°C.

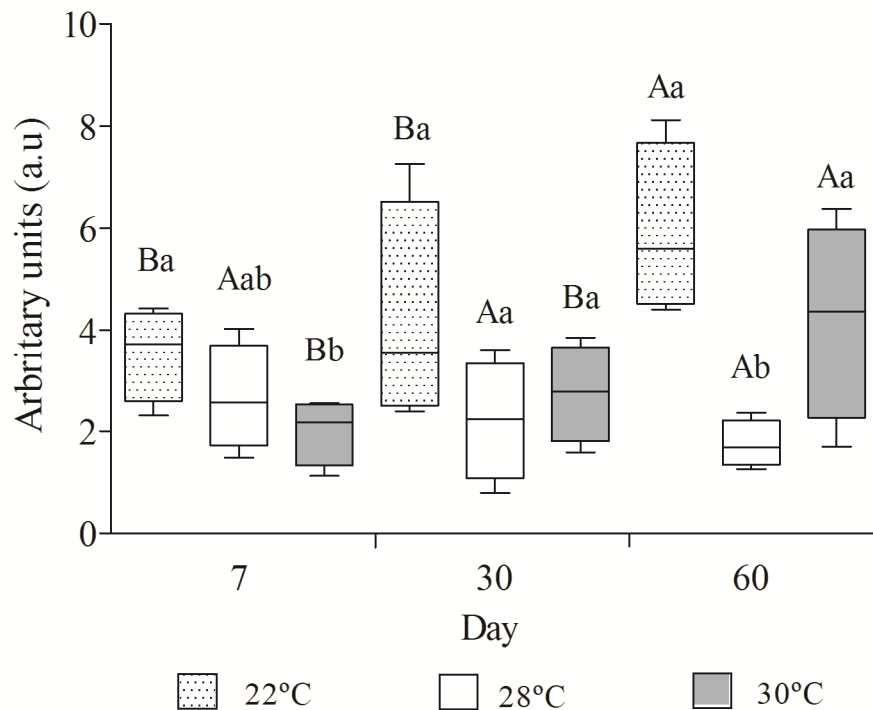


Figure 4. Quantitative RT-PCR quantification of MyoD 1 performed in white skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in 22, 28 and 30°C at 7, 30 and 60 days. Data were expressed as a minimum, 1<sup>st</sup> quartile, median, 3<sup>rd</sup> and maximum values. Capital letters compare means among days of treatments and lower-case letters compare means between temperatures. Means followed by same letters are not equal according to the Dunn test at 5%.

The expression levels of Myogenin did not change during the experimental period (Figure 5). Myostatin 1 mRNA levels were higher at day 30 in comparison to the days 7 and 60, in all reared temperature.



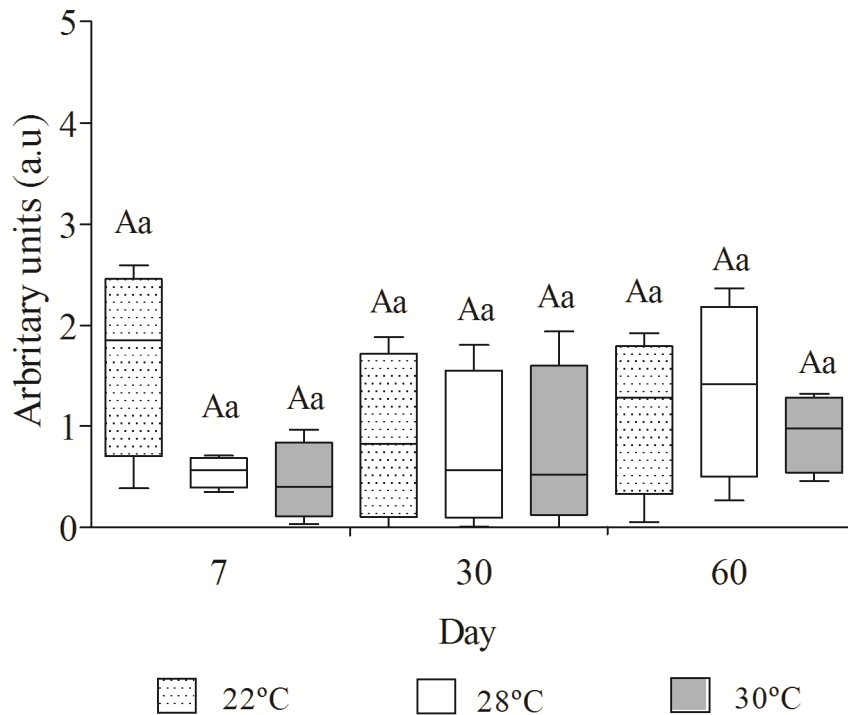


Figure 5 - Quantitative RT-PCR quantification of Myogenin performed in white skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in 22, 28 and 30°C at 7, 30 and 60 days. Data were expressed as a minimum, 1<sup>st</sup> quartile, median, 3<sup>rd</sup> quartile and maximum values. Capital letters compare means among days of treatments and lower-case letters compare means between temperatures. Means followed by same letters are not equal according to the Dunn test at 5%.

At 7 days, the level of Myostatin expression was lower at all temperatures when compared to animals reared in other periods of treatment. In animals with 30 days of treatment, it was observed a peak in Myostatin levels at all studied temperatures at this period. At 60 days of treatment, Myostatin levels were stable and did not differ significantly from the animals of 30 days.

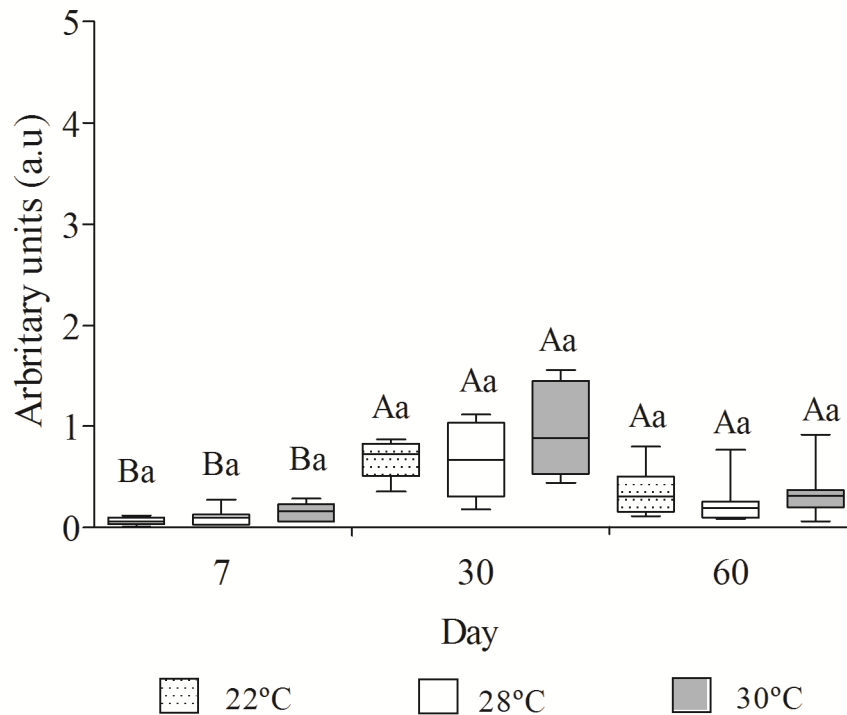


Figure 6- Quantitative RT-PCR quantification of Myostatin 1 performed in white skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in 22, 28 and 30°C at 7, 30 and 60 days. Data were expressed as a minimum, 1<sup>st</sup> quartile, median, 3<sup>rd</sup> quartile and maximum values. Capital letters compare means among days of treatments and lower-case letters compare means between temperatures. Means followed by same letters are not equal according to the Dunn test at 5%.

## Discussion

This study has demonstrated that temperature can influence the expression of genes related to muscle growth in juvenile Nile tilapia, without changes in muscle fibre hyperplasia, but promoting hypertrophy. Furthermore, as shown in other studies, we observed significant differences in final body weight and standard length in fish reared at 22, 28 and 30°C.

According to El-Sayed (2006), most studies that aimed to understand the effect of temperature on growth in Nile tilapia showed that the optimum temperature for growing is between 27-30°C. In a study using recirculating system with five temperatures (24, 26, 28, 30 and 32°C), El-Sayed and Kawanna (2008) showed that the temperature of 28°C was 31% more efficient to promote body weight gain when

compared with the temperature of 30°C. Fish reared in low temperatures (24°C) and high temperatures (32°C), showed a similar effect on growth.

In the present study, the temperature of 30°C was more efficient to promote body weight gain when compared to fish reared at 22°C, temperature that is not considered suitable for commercial cultivation of tilapia. However, when comparing fish reared at 30 to 28°C, we found no significant differences in body weight and standard length, demonstrating that rearing of 30°C did not show greater efficiency in relation to corporal weight gain when compared with animals grown at 28°C.

Temperature has a great influence on the metabolism, swimming activity and food intake in fish (Martinez-Palacios et al., 1996). In embryos and larvae, rearing temperature and development/ growth are closely linked, being important to drive the speed of embryonic and larval development (Macqueen et al., 2007, 2008). Temperature had a dramatic effect on yolk absorption rate (Ojanguren et al., 1999), larval body size (Johnston et al., 1998) and the number of vertebrae (Fowler, 1970).

In juveniles and adults of some species, changes in temperature regimes result in alterations in myofibrillar ATPase activity (Johnston et al., 1973), expression of contractile protein and Myosin Heavy Chain gene expression (Brooks and Johnston, 1993; Cole and Johnston, 2001; Schiaffino and Reggiani, 1996). In our study, it is possible that the cultivation temperature of 28 and 30°C positively influenced these parameters, although we have not been evaluated. On the other hand, animals raised at 22°C, probably showed a decrease in metabolism promoted by low temperature. This is probably related to body temperature adaptation, promoting changes on physiological parameters such as mitochondrial density and capillaries in skeletal muscle (Johnston and Dunn, 1987).

The influence of pre-hatch temperature on skeletal muscle cellularity has been demonstrated in several fish species, such as pacu (Assis et al., 2004), Atlantic salmon *Salmo salar* (Johnston and McLay, 1997; Stickland et al., 1988) and herring *Clupea harengus* (Vieira and Johnston, 1992). However, there are discrepancies in the results, based on the species, considering the reared temperature. In some species of temperate climate, a decrease in incubation temperature increases the number of white fibres after hatching (Usher et al., 1994). On the contrary, in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), an increase in incubation temperature promoted an increase in white fibres after 60 day from hatching (Assis et al., 2004). In our work, we used fish with 1.4g reared at 22, 28 and 30°C and observed a similar effect of the three temperatures on the muscle fibre

diameter and during the growth (60 days of experiment), an increase in muscle fibre diameter (hypertrophy) occurred in all reared temperature, as observed by the morphometric analysis. The data showed increase in muscle fibre diameter from the beginning to the end of the experiment, in spite of the muscle fibre frequency in the class  $<20 \mu\text{m}$ , fact that indicate fibre hyperplasia, was low in all temperature studied.

The distribution analysis of muscle fibres diameters or area is a standardized technique, and is often used as a measure to determine the recruitment of new fibres or hyperplasia (Valente et al., 1999; Rowleson and Veggetti, 2001). However, according to Johnston (1999), this type of analysis has some limitations, especially when trying to analyse the level of hypertrophy of muscle fibres (e.g. fibres  $> 80 \mu\text{m}$ ), and when evaluating a small number of muscle fibres per animal. In our experiment, we measured 200 muscle fibres per animal, as suggested by several studies (Alami-Durante et al., 2007; Carani et al., 2008; Vieira et al., 2007). At the end of the experimental periods, the relationship analyses between the mean fibres diameter and the standard length showed difference in fish reared at  $22^\circ\text{C}$  compared with animals reared at  $28^\circ\text{C}$  and  $30^\circ\text{C}$ . Although the fish cultivated at  $22^\circ\text{C}$  showed a lower standard length (approximately 2x lower) muscle fibre diameter was similar. This fact indicates a higher muscle fibres hypertrophy in fish reared at  $22^\circ\text{C}$ . Our results diverge from the ones observed by Usher et al., 1994 which showed a lower hypertrophy in salmon reared at low temperature ( $5^\circ$  and  $8^\circ\text{C}$ ) when compared to fish reared at  $11^\circ\text{C}$ .

As demonstrated by several studies (Johnston et al., 2009; Malek et al., 2004) the temperature of rearing can change the expression of several myogenic factors, including the myogenic regulatory factors (MRFs). The MyoD family MRFs (myf5, MyoD, Myogenin and MRF4) is responsible for controlling muscle growth and development, regulating the expression of muscle specific genes. Together with the myf5, MyoD is the first myogenic regulatory factor to be expressed and acts to control myoblasts and satellite cells proliferation during development and growth, respectively (Weintraub, 1993). MyoD act on the myoblasts proliferation and Myogenin act on myoblasts differentiation (Kobiyama et al., 1998; Watabe, 1999) through temporal and sequential expression.

In our study, the levels of MyoD mRNA were higher in fish grown at  $22^\circ\text{C}$  in all periods studied. Considering the 7<sup>th</sup> day, MyoD mRNA level was also higher at  $22^\circ\text{C}$ . Thus, we consider that the temperature of  $22^\circ\text{C}$  was more auspicious in increasing the expression of this gene and this fact is interesting and could represent a good strategy

for aquaculture programs, since MyoD mRNA level increased is associated with satellite cell proliferation, which can be a potential to the hyperplasia and hypertrophy processes during an ideal reared temperature. Wilkes et al., (2001) also showed an increased level of mRNA expression of MyoD and Myogenin in newly hatched larvae of rainbow trout, after incubation of eggs at temperatures 4, 8 and 12°C, the highest level of expression was observed in animals incubated at 4°C, which was the lowest temperature studied.

Myogenin has an important role in muscle development and growth by acting during myoblasts differentiation, contributing to muscle fibres hyperplasia and hypertrophy. In our study, the levels of Myogenin were stable at all temperatures and periods studied, demonstrating that this gene can be less influenced by the temperature of cultivation. The stable expression of Myogenin gene probably is related to no differences in the muscle fibre diameter distribution, in spite of promoting the muscle fibre hypertrophy in all temperature and periods studied.

Our results showed that, despite a high expression of MyoD mRNA in the animals cultivated at 22°C, the mRNA expression levels of Myogenin remained constant in all temperatures studied. These differences suggest that Myogenin acted controlling muscle growth partially. Probably, Myogenin was restricted to act on basal levels of differentiation.

In order to have the maintenance of muscle phenotype (Amali et al., 2004), in addition the action of MRFs, other growth factors, such as Myostatin, which acts negatively, controlling growth by inhibiting the action of MyoD and, consequently, inhibiting the proliferation of myoblasts (McPherron et al., 1997).

Our results showed that Myostatin levels at 7 days of treatment were the lowest at all studied temperatures when compared with animals reared in 30 and 60 days. Furthermore, we observed, after 30 days of treatment, an increase in Myostatin gene expression, regardless the studied temperature. Thus, we conclude that the expression of Myostatin is not influenced by water temperature of cultivation. Moreover, it is possible that the increased expression of Myostatin at 30 days of treatment is related to the wider role that Myostatin plays in fish, which is not limited to inhibition of skeletal muscle growth, but also contributes to the homeostatic control of other tissues growth (Amali et al., 2004).

## Conclusion

Our results show that the rearing of Nile tilapia at low temperatures for short time periods can be used as an alternative technology to obtain higher productivity. Studies with compensatory growth must be performed to confirm this hypothesis.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from FAPESP, Proc. No. 2009/12157-6 and 2008/05984-0

## Reference

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., and Estrada, M. P., 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of biotechnology*, 119, 324-31.
- Alami-Durante, H., Olive, N., and Rouel, M., 2007. Early thermal history significantly affects the seasonal hyperplastic process occurring in the myotomal white muscle of *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Cell and tissue research*, 327, 553-70.
- Amali, A. A., Lin, C. J.-F., Chen, Y.-H., Wang, W.-L., Gong, H.-Y., Lee, C.-Y., Ko, Y.-L., et al., 2004. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 229, 847-56.
- Assis, J. M. F. D., Carvalho, R. F., Barbosa, L., Agostinho, A., and Dal Pai-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 237, 251-67.
- Azaza, M. S., Dhraief, M., and Kraiem, M., 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *Journal of Thermal Biology*, 33, 98-105.
- Azaza, M. S., Legendre, M., Kraiem, M. M., and Baras, E., 2010. Size-dependent effects of daily thermal fluctuations on the growth and size heterogeneity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of fish biology*, 76, 669-83.
- Blackwell, T. K., and Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-Binding MyoD and E2A Protein Complexes Revealed by Binding Site Selection. *Science*, 250, 1104-10.

- Brooks, S., and Johnston, I. A. 1993. Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of myotomal muscle-fibre types in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Marine Biology*, 117, 501–13.
- Bustin, S. A; Beaulieu, J.-F.; Huggett, J. et al., 2010. MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC molecular biology*. 11, 74-89
- Carani, F. R., Aguiar, D. H., Losi, F., Almeida, A. D., Gonçalves, H. S., Roberto, C., and Dal Pai-Silva, M., 2008. Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 1817, 205-211.
- Cole, N. J., and Johnston, I. A., 2001. Plasticity of myosin heavy chain expression with temperature acclimation is gradually acquired during ontogeny in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 171, 321-326.
- Edmondson, D. G., and Olson, E. N., 1993. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 755–755.
- El-Sayed, A.-F. M., 2006. *Tilapia Culture*. Aquaculture. King's Lynn: Cabi. pp. 2-293.
- El-Sayed, A.-F. M., and Kawanna, M., 2008. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquaculture Research*, 39, 670-672.
- FAO - Fisheries and Aquaculture Department, 2010. *The state of world fisheries and aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
- Fowler, J., 1970. Control of vertebral number in teleosts an embryological problem. *Quarterly Review of Biology*, 45, 148-167.
- Goldspink, G., 1972. Postembryonic growth and differentiation of striated muscle. In G. H. Bourne (Ed.), *The structure and function of muscle*. Second ed. New York: Academic Press.
- Hall, T. E., Cole, N. J., and Johnston, I. A., 2003. Temperature and the expression of seven muscle-specific protein genes during embryogenesis in the Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Journal of Experimental Biology*, 206(18), 3187-3200.
- James, R., Cole, N. J., Davies, M., and Johnston, I. A., 1998. Scaling of intrinsic contractile properties and myofibrillar protein composition of fast muscle in the fish *myoxocephalus scorpius* L. *The Journal of experimental biology*, 201, 901-12.
- Johnston, I. A, Frearson, N., and Goldspink, G., 1973. The effects of environmental temperature on the properties of myofibrillar adenosine triphosphatase from various species of fish. *The Biochemical journal*, 133(4), 735-8.
- Johnston, I. A. 1999. Muscle development and growth : potential implications for flesh quality in fish. *Atlantic*, 99-115.

- Johnston, I. A., Cole, N. J., Vieira, V., and Davidson, I., 1997. Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. *The Journal of experimental biology*, 200, 849-68.
- Johnston, I. A., and Dunn, J., 1987. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Experimental Biology*, 41, 67-93.
- Johnston, I. A., and McLay, H. A., 1997. Temperature and family effects on muscle cellularity at hatch and first feeding in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Canadian Journal of Zoology*, 75, 64-74.
- Johnston, I. A., Cole, N., Abercrombyl, M., and Vieira, V., 1998. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *Journal of Experimental Biology*, 201 (Pt 12), 623-46.
- Johnston, I. A., Lee, H.-T., Macqueen, D. J., Paranthaman, K., Kawashima, C., Anwar, A., Kinghorn, J. R., et al., 2009. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *The Journal of experimental biology*, 212, 1781-93.
- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, K., Suetake, H., Johnston, I. A., and Watabe, S., 1998. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. *Journal of experimental biology*, 201, 2801.
- Koumans, J., Akster, H., Witkam, A., and Osse, J., 1994. Numbers of muscle nuclei and myosatellite cell nuclei in red and white axial muscle during growth of the carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of fish biology*, 44, 391-408.
- Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *The Journal of biological chemistry*, 277(51), 49831-40.
- Lassar, a B., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D., and Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, 58(5), 823-31.
- Lee, C.-Y., Hu, S.-Y., Gong, H.-Y., Chen, M. H.-C., Lu, J.-K., and Wu, J.-L., 2009. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochemical and biophysical research communications*, 387, 766-71.
- Macqueen, D. J., Robb, D., and Johnston, I. A., 2007. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of experimental biology*, 210, 2781-94.
- Macqueen, D. J., Robb, D. H. F., Olsen, T., Melstveit, L., Paxton, C., G., M., et al., 2008. Temperature until the “eyed stage” of embryogenesis programmes the



- growth trajectory and muscle phenotype of adult Atlantic salmon. *Biology Letters*, 4, 294–298.
- Malek, R. L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M. a, and Gerhard, G. S., 2004. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and pharmacology : CBP*, 138, 363-73.
- Martinez-Palacios, C. A., Cristina, C. S., and Ross, L. G., 1996. The effects of water temperature on food intake, growth and body composition of *Cichlasoma urophthalmus*. *Aquaculture*.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M., and Lee, S. J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*, 387, 84-90.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., et al., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58, 537-44.
- Ojanguren, A. F.; Reyes-Gavilán, F. G.; Muñoz, R. R. 1999. Effects of temperature on growth and efficiency of yolk utilisation in eggs and pre-feeding larval stages of Atlantic salmon. *Aquaculture International*, 81-87.
- Proença, E. C. M., and Bittencourt, P. R. L., 1994. *Manual de Piscicultura Tropical*. Brasília: IBAMA.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., and Moorman, A. F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339, 62-66.
- Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V., and Levine, M. A., 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology*, 142(4), 1412-8.
- Rowlerson, A.; Veggetti, A., 2001. 5. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I. A. (Ed.). *Fish physiology - Muscle Development and Growth*. Elsevier. v. 18p. 103–140.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C., 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological reviews*, 76(2), 371-423.
- Sifa, L., Chenhong, L., and Dey, M., 2002. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. *Aquaculture*, 213, 123 - 129.
- Stickland, N. C., 1983. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of anatomy*, 137 (Pt 2), 323-33.
- Stickland, N., White, R., Mescall, P., Crook, A., and Thorpe, J., 1988. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Anatomy and embryology*, 178, 253–257.

- Sänger, A.; Stoiber, W., 2001. 7. Muscle fiber diversity and plasticity. In: Johnston, I. A (Ed.). Fish physiology - Muscle Development and Growth. Elsevier. v. 18 pp. 187–250. Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., and Kambadur, R., 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *The Journal of biological chemistry*, 275, 40235-43.
- Usher, M. L., Stickland, N., Thorpe, J., 1994. Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. *Journal of fish biology*, 44, 953–964.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., and Fauconneau, B., 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 55, 675-691.
- Vieira, V., and Johnston, I. A., 1992. Influence of temperature on muscle-fibre development in larvae of the herring *Clupea harengus*. *Marine Biology*, 112, 333-341.
- Vieira, V. I. A., Norris, A., and Johnston, I. A. 2007. Heritability of fibre number and size parameters and their genetic relationship to flesh quality traits in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 1, 100-109.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *Journal of Fish Biology*, 55(sa), 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors. In: Johnston, I. A. (Ed.). Fish physiology - Muscle Development and Growth. Academic Press, 156. 19-39.
- Weatherley, A. H., and Gill, H. S., 1985. Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth. *Experientia*.
- Weatherley, A. H., and Gill, H. S., 1987. *The Biology of Fish Growth*. Growth (Lakeland). London: Academic Press. pp. 2 - 442
- Weintraub, Harold., 1993. The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, 75, 1241-1244.
- Wilkes, D., Xie, S. Q., Stickland, N. C., Kentouri, M., Steriotti, A., Royal, T., Colledge, V., et al., 2001. Temperature and myogenic factor transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Biology*, 2771, 2763-2771.
- Østbye, T. K., Galloway, T. F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., and Andersen Ø., 2001. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European journal of biochemistry*, 268, 5249-57.