

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO CRESCIMENTO
MUSCULAR EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
MELHORADAS

Autora: Simone Siemer

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO CRESCIMENTO
MUSCULAR EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
MELHORADAS

Autora: Simone Siemer

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração Produção Animal”

MARINGÁ

Estado do Paraná

Fevereiro – 2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S571e

Siemer, Simone

Expressão de genes associados ao crescimento muscular em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) melhoradas / Simone Siemer. -- Maringá, PR, 2021.
55 f. figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2021.

1. Genética. 2. Hiperplasia. 3. Hipertrofia. 4. Músculo esquelético. 5. Peixe - Tilápia do Nilo - *Oreochromis niloticus*. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 639.31

Marinalva Aparecida Spolon Almeida - 9/1094



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO CRESCIMENTO
MUSCULAR EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
MELHORADAS

Autora: Simone Siemer

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 08 de março de 2021.

Profª Drª Eliane Gasparino

Profª Drª Fernanda Losi Alves de
Almeida

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
Orientador

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

Com amor, aos meus pais, Celso Siemer e Sônia Fatima Teles Siemer, pelo amor, pela compreensão, confiança, pelo suporte e por me ensinarem a nunca desistir dos meus objetivos e por contribuírem tornando esse sonho possível. Vocês são minhas fontes de inspiração e exemplo.

Aos meus irmãos, Samara e Bruno, pela compreensão, pelo amor, amizade e apoio.

Aos meus familiares e amigos por sempre torcerem por mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todas as bênçãos concedidas.

A meus queridos pais, Celso e Sônia, e meus irmãos Samara e Bruno pelo todo o amor e dedicação, eu amo vocês.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por ter possibilitado desenvolver este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização da pesquisa.

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pela oportunidade, pela orientação, paciência, confiança e por todo o suporte para o desenvolvimento deste trabalho e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, agradeço de coração, muito obrigada.

Ao Professor Dr. Carlos Antônio Lopes de Oliveira, pela contribuição, instruções e por todo apoio.

À Professora Dr^a. Fernanda Losi Alves de Almeida, pela contribuição, dedicação e ensinamentos.

À Professora Dr^a Eliane Gasparino, pelos ensinamentos e contribuição.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM, pelos ensinamentos.

Ao Núcleo de Pesquisa PEIXEGEN e GeneZ (Genética Molecular e Expressão Gênica na Zootecnia), e todos os integrantes do grupo pela amizade e ensinamentos, em especial aos que estiveram juntos comigo me ajudando no laboratório e nos experimentos.

A Dr^a Fernanda Tanamati, pela amizade, paciência e por toda contribuição e ensinamentos.

Aos meus queridos amigos de pós-graduação, pela amizade, pelos ensinamentos e por tornar os dias mais divertidos, Gislaine Gonçalves Oliveira, Gisele Ferreira da Silva, Stefane Correa, Jaisa Casetta, Fernanda Tanamati, Luiz Fernando de Souza Alves, Carolina Schlotefeldt, Juliana Stocco, Eric Campos, Karla Tsujii, Bruno da Silva Pires, Laís Mantovani, Filipe Chagas, Humberto Todesco, Rodrigo Feuerharmel, Pedro Castro, Jefferson Murici Penafort, Alex Junio, muito obrigada galera.

A todos os meus amigos queridos que foram minha família em Maringá, obrigada pelo acolhimento.

Aos funcionários, Vitor, Cleiton e Zé Geraldo, obrigado pelos ensinamentos, no cotidiano da Codapar.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

SIMONE SIEMER, filha de Celso Siemer e Sônia Fatima Teles Siemer, nasceu em Chapecó, Estado de Santa Catarina, no dia 27 de maio de 1994. Coursou graduação bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade de Cuiabá (UNIC), Campus de Primavera do Leste, no período de 2011 a 2014. Trabalhou com carteira assinada do período de 2011 a fevereiro de 2019. Coursou Especialização *Lato sensu* em Biotecnologia e Bioprocessos, pela Universidade Estadual de Maringá, no período de 2016 a 2018. Em março de 2019, iniciou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção animal, subárea Aquicultura sob orientação do Professor Dr. Ricardo Pereira Ribeiro. Em fevereiro de 2021, submeteu-se à banca examinadora para a defesa de dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRAT	xvi
I. INTRODUÇÃO	xviii
1. Breve panorama da aquicultura mundial	xviii
2. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis Niloticus</i>)	xviii
3. Músculo Estriado Esquelético	xx
3.1 Desenvolvimento e crescimento muscular em peixes	xxii
3.2 Fatores de regulação miogênica	xxiii
4. Genes relacionados ao crescimento: MRFs e Miostatina.	xxv
4.1 <i>MyoD</i> e Miogênina (<i>Myog</i>)	xxv
4.2 Miostatina (<i>Mstn</i>)	xxvii
LITERATURA CITADA	xxix
II. OBJETIVOS GERAIS	xxxv
III - Análise da expressão de genes associados ao crescimento muscular em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) dentro de um programa de melhoramento genético	36
RESUMO	36
1. Introdução	38
2. Materiais e métodos	39
2.1 Animais	39

2.2 Expressão Gênica	39
2.3 Morfologia e Morfometria da musculatura branca.....	42
2.4 Análises estatísticas	42
3. Resultados	43
3.1 Desempenho	43
3.2 Morfologia muscular	43
3.3 Expressão de mRNA de <i>MyoD</i> , miogenina (<i>Myog</i>) e miostatina (<i>Mstn</i>).....	45
4. Discussão.....	46
5. Conclusão.....	48
Referências Bibliográficas	48

LISTA DE TABELAS

	Páginas
III - Análise da expressão de genes associados ao crescimento muscular em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) dentro de um programa de melhoramento genético	35
Tabela 1- Sequências de <i>primers</i> utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real - qPCR- RT).....	41

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
I. INTRODUÇÃO.....	XVII
FIGURA 1. Organização anatômica da musculatura estriada esquelética, mostrando os miosseptos (tecido conjuntivo entre os miômeros). Fonte: (johnston, 2001).....	XX
Figura 2. Desenho esquemático de um corte transversal da musculatura de peixe mostrando a organização anatômica da musculatura estriada. Observa-se o septo horizontal separando a musculatura epiaxial da hipaxial, o septo medial separando a musculatura em dois antímeros (direito e esquerdo), músculo vermelho (superficial) e branco (profundo). Fonte: adaptado de mareco, 2012.	XXI
Figura 3. Representação dos principais eventos que acontecem durante o crescimento do músculo estriado esquelético. Fonte: adaptado de (watabe, 1999).	XXIII
Figura 4. Sistema cristalográfico do complexo constituído através do dímero do fator transcricional da família “basic helix-loop-helix” (bhlh), myod e o dna. Fonte: (adaptado de ma et al., 1994).....	XXIV
Figura 5. (a) esquema demonstrando a linhagem das células precursoras miogênicas (mpcs) do miótomo que comprometida com a linhagem miogênica expressa pax3 que colabora para a expansão das células precursoras miogênicas e a diferenciação dos mioblastos. Myod e myf5 controlam a proliferação de mioblastos. Miogenina e mrf4 regulam a diferenciação de mioblastos em miotubos, que mais tarde se diferenciam para formar miofibras maduras. (b) a subpopulação de mpcs expressando pax3 e pax7 deu origem às células semelhantes aos mioblastos, localizadas nas fibras musculares maduras. Essas células, quando ativadas, proliferam sob o controle de myod e myf5, diferenciam-se sob o controle de	

miogenina e mrf4, e controlar o crescimento muscular pela hipertrofia da fibra (aumento das fibras em diâmetro e comprimento com núcleo adicionado na fibra preexistente) e hiperplasia da fibra (acréscimo do número de fibras musculares). Uma população de mioblastos ao expressar pax3 e pax7 são responsáveis pela auto renovação dos mioblastos inativados fonte: adaptado de dal-pai-silva et al., (2020).
 XXVI

III - Análise da expressão de genes associados ao crescimento muscular em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) dentro de um programa de melhoramento genético 35

Fig. 1. Desempenho de peso (a) e comprimento total (b) para os grupos de alto valor genético (AVG) e baixo valor genético (BVG). Os valores médios com letras diferentes foram significativos a ($p < 0,05$)..... 43

Fig. 2. Fotomicrografias representativas de cortes transversais do músculo esquelético branco em tilápia do Nilo (*oreochromis niloticus*). (a) grupo de alto valor genético (AVG). (b) grupo de baixo valor genético (BVG). Observa-se um padrão em mosaico discreto das fibras musculares menores(a) entre as fibras grandes (b). Endomísio (e). Coloração hematoxilina – eosina (he). Objetiva de 20x..... 44

Fig. 3. Distribuição das fibras musculares brancas em classes de diâmetros em tilápias do Nilo adultas (*oreochromis niloticus*). As colunas representam frequências de fibras brancas (%) nas classes de diâmetros em cada grupo (avg: alto valor genético; bvg (baixo valor genético)). As letras diferentes na coluna mostram frequências de fibras com variação significativa em uma mesma classe de diâmetro ($p < 0,05$). 44

Fig. 4. Distribuição das fibras de 0 μm a 130 μm para o grupo de alto valor genético (AVG) e o grupo de baixo valor genético (BVG) e a frequência (%) de chances de ocorrer para o grupo (AVG). 45

Fig. 5. Expressão de proteína da *Myod*, miogenina (*Myog*) e miostatina (*Mstn*). Grupo de alto valor genético (AVG); grupo de baixo valor genético (BVG). Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando o mesmo gene entre os grupos são indicadas pelas diferentes letras minúsculas acima das barras. 45

RESUMO

O processo de crescimento muscular envolve a ativação, proliferação e diferenciação de mioblastos, ocorrendo por dois mecanismos: a hiperplasia e hipertrofia que são reguladas por uma série de proteínas, como os fatores de regulação miogênica (*MRFs*) e a miostatina (*Mstn*). Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), dentro de um Programa de Melhoramento Genético a expressão de genes que controlam o crescimento muscular, e caracterizar os mecanismos de crescimento hipertrófico e hiperplásico da musculatura branca através da morfometria das fibras musculares. Os animais são provenientes da décima geração do Programa de Melhoramento da Linhagem GIFT- TILAMAX/UEM, da Universidade Estadual de Maringá (PMGT-UEM), onde foram coletadas amostras da musculatura branca dorsal dos 16 peixes adultos de tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*), separadas em dois grupos: animais de alto valor genético (AVG) e animais de baixo valor genético (BVG). Foram realizadas análises de peso e comprimento ao peso final, análises de expressão gênica para os genes relacionados ao crescimento muscular - *MyoD*, miogenina (*Myog*) e miostatina (*Mstn*) e análises de morfologia e morfometria das fibras musculares. Os animais de alto valor genético apresentaram valores de peso e comprimento maiores comparados aos animais de baixo valor genético. Para as análises de expressão gênica, os resultados não foram significativos para os genes *MyoD* e miogenina para ambos os grupos. Entretanto, para o gene da miostatina o resultado foi

significativo, e houve maior expressão para o tratamento com baixo valor genético. A análise morfométrica das fibras musculares mostrou valores significativos para as classes de diâmetros entre 20 e 50 μ m e maiores que 50 μ m, porém não foi significativo para a classe de diâmetro das fibras menores que 20 μ m, demonstrando que o intenso crescimento muscular hipertrófico. Como conclusão, os animais de AVG apresentaram maior desempenho como resultado de maior ganho de massa muscular por hipertrofia, como consequência de menor expressão de miostatina em relação ao BVG. Salienta-se que o presente trabalho é o primeiro estudo com tilápias do Nilo melhoradas e que é de grande interesse futuros estudos relacionados ao crescimento muscular, principalmente em peixes de água doce, de rápido crescimento.

Palavras-chave: Genética, hiperplasia, hipertrofia, músculo esquelético, peixe.

ABSTRAT

The muscle growth process involves the activation, proliferation and differentiation of myoblasts, occurring by two mechanisms: hyperplasia and hypertrophy, which are regulated by a series of proteins, such as myogenic regulation factors (MRFs) and myostatin (*Mstn*). In this sense, the objectives of this work were to evaluate in Nile tilapia (*Oreochromis Niloticus*), from a Genetic Improvement Program the expression of genes that control muscle growth, and to characterize the mechanisms of hypertrophic and hyperplastic growth of white musculature through morphometry muscle fibers. The animals come from the tenth generation of the GIFT-TILAMAX / UEM Lineage Improvement Program, of the State University of Maringá (PMGT-UEM), where samples of the dorsal white musculature of 16 adult Nile tilapia fish (*Oreochromis Niloticus*) were collected and separated into two groups: animals of high genetic value (AVG) and animals of low genetic value (BVG). Analyzes of weight and length at final weight, analysis of gene expression for genes related to muscle growth - *MyoD*, myogenin (*Myog*) and myostatin (*Mstn*) and analysis of morphology and morphometry of muscle fibers were carried out. The animals with high genetic value had higher weight and length values compared to the animals with low genetic value. For gene expression analyzes, the results were not significant for *MyoD* and myogenin genes in both groups. However, for the myostatin gene the result was significant, where there was greater expression for treatment with low genetic value. The morphometric

analysis of the muscle fibers showed significant values for classes of diameters between 20 and 50 μ m and greater than 50 μ m, however it was not significant for fibers class of diameter smaller than 20 μ m, demonstrating that the intense hypertrophic muscle growth. As a conclusion, the AVG animals showed higher performance as a result of greater muscle mass gain due to hypertrophy and as a consequence of a lower expression of myostatin compared to BVG. We emphasize that the present work is the first study with improved Nile tilapia and that it is of great interest for future studies related to muscle growth, especially in fast-growing freshwater fish.

Key words: Fish, genetics, hyperplasia, hypertrophy, skeletal muscle.

I. INTRODUÇÃO

1. Breve panorama da aquicultura mundial

Estima-se que a produção de peixes deverá expandir de 179 milhões para 204 milhões de toneladas até 2030 (Food and Agriculture Organization - FAO, 2020). O aumento da produção de consumo global aumentou de 9,0 kg em peso vivo, para 20,5 kg em 2017 (FAO, 2020). Com base nessa estimativa, espera-se o aumento de 12,9%, na produção brasileira, que deverá se expandir de 1319 mil toneladas de produção de peixes para 1490 mil toneladas (FAO, 2020).

A produção brasileira de cultivo atingiu 758.006 toneladas em 2019, representando o crescimento de 4,9% com base no ano anterior (722,560 t), e desta produção nacional de peixes de cultivo, a tilápia representou 57%, colocando o país como 4º maior produtor de tilápia no mundo (PEIXE-BR, 2020).

2. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Originária da Costa do Marfim, na África, a tilápia do Nilo (CASTAGNOLLI, 1992). Foi a terceira espécie mais produzida na aquicultura mundial, em 2018, com uma produção de 4525,4t perdendo somente para carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) com 5704,0t e a carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) com a produção de 4788,5t (FAO, 2020).

Devido ao seu grande potencial para a aquicultura, a sua distribuição foi expandida para todos os continentes (HAYASHI et al., 1999). Em 1950, na região nordeste do Brasil, matrizes da tilápia Rendalli foram introduzidas para realizar o povoamento dos reservatórios. Porém, devido ao pouco entendimento sobre o desenvolvimento e ao baixo desempenho destes peixes em sistemas de criação não houve continuidade no projeto (MOREIRA et al., 2007).

Em 1971, a tilápia Bouaké, foi importada da Costa do Marfim e por muito tempo se manteve como a principal linhagem criada e serviu como base para outras linhagens importadas da Ásia, como a Chitralada (VIEIRA et al., 2005). Com o propósito de melhorar geneticamente o plantel, em 1996, matrizes da linhagem Chitralada, foram desenvolvidas através de projetos de melhoramento genético a partir da (*Oreochromis niloticus*) do Japão e melhoradas na Tailândia (KUBITZA, 2000;LOVSHIN, 2000).

Na Malásia, em 1998, com o intuito de aumentar a variabilidade genética da *Oreochromis niloticus*, surgiu a linhagem GIFT do inglês (*Genetic Improvement of Farmed Tilápias*) (GUPTA; ACOSTA, B. O., 2005; LI, S. F. et al., 2006). Um projeto de pesquisa de um órgão não governamental (*Worldfish Center*), reproduziu oito linhagens puras, utilizando quatro linhagens comerciais cultivadas na Ásia, e outras quatro linhagens silvestres cultivadas na África (GUPTA E ACOSTA, 2005).

No Brasil, em 2005, a estação experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM-CODAPAR), foi uma das primeiras da América a receber as tilápias geneticamente melhoradas, tornando-se o primeiro país a trabalhar com a GIFT, em um projeto desenvolvido em conjunto com a *World Fish Center*, com a contribuição da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca – SEAP (LUPCHINSKI JUNIOR et al., 2008) Iniciando-se, então, o primeiro Programa de Melhoramento Genético em peixes no Brasil, e neste ano de 2021, entra na 13ª geração de seleção com o nome de Tilamax.

A tilápia se tornou uma espécie de grande importância para a piscicultura em razão de seu grande potencial para a produção, pela rusticidade e rápido crescimento em cultivo intensivo (WATANABE et al., 2002). Também apresenta hábito alimentar fitoplanctófago, aceita em todos os estágios de vida, outros tipos de alimentos, como as rações (SANTIAGO; ALDABA; REYES, 1987). Além de possuir filés ausentes de espinhas de “Y” (SOUZA, M. L. R. De et al., 2004), e uma carne de excelente qualidade (HAYASHI et al., 2002).

3. Músculo Estriado Esquelético

A musculatura esquelética da tilápia representa de 35 a 60% do peso total do animal (LISTRAT et al., 2015), e é constituído por células contráteis que estão envolvidas na locomoção (SILVA, M. D. P.; CARVALHO, 2007) e capacidade de se adaptar, ou seja, quando o tecido é estimulado, muda de acordo com sua morfologia e metabolismo, e reduz ou aumenta seu volume (FERIAN, 2015). E, é uma fonte proteica na alimentação humana (SOUZA, M. L. R. De et al., 2004).

A musculatura dos peixes é dividida em unidades morfofuncionais conhecidas como miômeros e que ao longo do corpo do animal, vão se repetindo e são separados por camadas de fibras colágenas (tecido conjuntivo) chamadas de miosseptos que estão inseridas as fibras musculares (ALEXANDER, 1969) (Figura 1). Os músculos que flexionam a coluna vertebral e a região caudal para um lado e para o outro durante a natação são chamados de músculos axiais, e eles estão divididos em epaxial (dorsal) e hipoaxial (ventral) através de uma divisão chamada septos lateral ou horizontal, localizada na região do nervo da linha lateral (ALEXANDER, 1969; VIDELER, 2011). Além disso, a flexibilidade da coluna vertebral suporta um septo medial que separa o corpo em antímeros direito e esquerdo (VIDELER, 2011) (Figura 2).

O tecido muscular estriado é constituído por fibras musculares que são células musculares estriadas, alongadas, estreitas e multinucleadas, e esses núcleos ficam na região afastada do centro da fibra, abaixo da membrana plasmática (SILVA, M. D. P.; CARVALHO, 2007). O sarcoplasma é formado por um citoesqueleto altamente desenvolvido, formado por filamentos contráteis organizados em miofibrilas e é encontrado por todo o comprimento da fibra (SILVA, M. D. P.; CARVALHO, 2007).

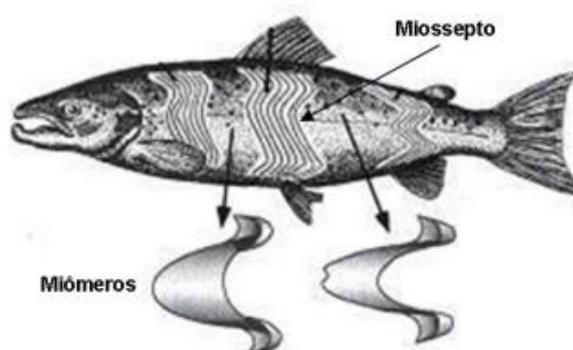


Figura 1. Organização anatômica da musculatura estriada esquelética, mostrando os miosseptos (tecido conjuntivo entre os miômeros). Fonte: (JOHNSTON, I. A. N. A., 2001).

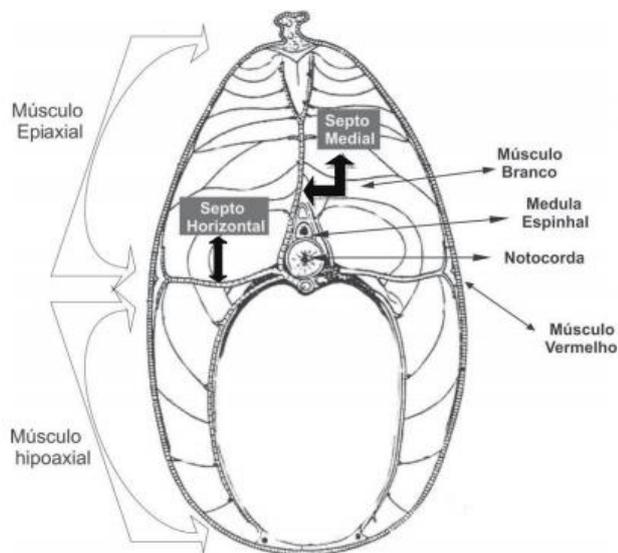


Figura 2. Desenho esquemático de um corte transversal da musculatura de peixe mostrando a organização anatômica da musculatura estriada. Observa-se o septo horizontal separando a musculatura epiaxial da hipoaxial, o septo medial separando a musculatura em dois antímeros (direito e esquerdo), músculo vermelho (superficial) e branco (profundo). Fonte: Adaptado de MARECO, (2012).

As fibras musculares nos peixes estão distribuídas por diferentes compartimentos: superficial, intermediário e profundo (NEBO, 2011). As fibras musculares superficiais (vermelhas) representam até 30% da musculatura total dos peixes (SÄNGER; STOIBER, 2001). Possuem diâmetro pequeno ($25-45\mu\text{m}$), muitas mitocôndrias e lipídeos (Close, 1972), grande quantidade de mioglobina metabolismo oxidativo e cadeia pesada de miosina (MHC) *slow* (SÄNGER; STOIBER, 2001), contraindo as fibras lentamente, ou seja, responsáveis pelos movimentos lentos e de sustentação do corpo (Fauconneau et al., 1995).

O compartimento intermediário, fica localizado entre o compartimento superficial e profundo, e representa menos de 10% da massa corporal dos peixes, possui força e contração rápida, metabolismo oxidativo/glicolítico (SÄNGER; STOIBER, 2001). Podendo ser recrutadas para atividades de sustentação e movimentos rápidos ((JOHNSTON, I. A., 1999; SÄNGER; STOIBER, 2001).

No compartimento profundo (branco) concentra-se a maior quantidade da massa muscular, representando nunca inferior a 70% do total e suas fibras possuem diâmetro acima de $50 - 100\mu\text{m}$, ou até mais, poucas mioglobinas, poucos lipídeos (SÄNGER;

STOIBER, 2001). Nesse compartimento possui poucas mitocôndrias, metabolismo glicolítico e apresentam fibras de contração rápida, cadeia pesada de miosina (MHC) *fast* para movimentos bruscos de locomoção, como captura de alimentos e fuga de predadores (DRIEDZIC; HOCHACHKA, 1976; SÄNGER; STOIBER, 2001).

3.1 Desenvolvimento e crescimento muscular em peixes

Nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, ocorre a formação das primeiras fibras musculares (DE ALMEIDA, 2011). No decorrer do processo da formação muscular, ocorre com a especificação do mesoderma paraxial do embrião, e nesta etapa, acontece a formação de estruturas epiteliais transitórias denominados somitos (ZHANG et al., 2001). Os somitos, ao longo do eixo dorso-ventral do embrião se diferenciam e originam-se os dermomiótomo e os esclerótomo. O dermomiótomo fica situado do dorsalmente e origina a derme, musculatura esquelética dos membros e o do tronco. Já o esclerótomo se localiza na região ventral e origina a cartilagem, ossos das vértebras e costelas (SILVA, M. D. P.; CARVALHO, 2007).

Nos miótomos, uma população de células mesodérmicas denominadas adaxiais se organiza em camada única, cercando ambos os lados da notocorda (DEVOTO et al., 1996). Essas células adaxiais se alongam e migram em direção a superfície do miótomo e se fundem para formar em miotubos, gerando embaixo da epiderme, uma monocamada de células musculares que se incorporam umas às outras formando os miotubos, que se diferenciam em fibra muscular vermelha (músculo lento) (CURRIE; INGHAM, 2001; DEVOTO et al., 1996). As células adaxiais que não migraram para a superfície, também chamadas de células laterais pré-somíticas ou mioblastos *fast*, alongam em direção ao miótomo e se fundem para formar em miotubos, dando origem a musculatura branca no embrião (CURRIE; INGHAM, 2001; DEVOTO et al., 1996).

O crescimento pós-embrionário do músculo estriado, e inicia antes da absorção do saco vitelínico continuando até a fase adulta (JOHNSTON, I. A.; HALL, 2004; STEINBACHER et al., 2007). Em posições dispersas no miótomo e entre as fibras já existentes ocorre o recrutamento e formação de novas fibras musculares, atribuindo a aparência de mosaico a musculatura quanto ao tamanho das fibras (STEINBACHER et al., 2007).

As células progenitoras musculares (MPCs) no somito dependem de sinais que induzidos pelos tecidos adjacentes, como o tubo neural, notocorda e o ectoderma dorsal

e lateral, e em resposta a esses sinais, as células precursoras miogênicas originam os mioblastos (RESCAN, Pierre Yves; JUTEL; RALLIÈRE, 2001). No momento em que, os mioblastos quiescentes são ativados, proliferam-se, fusionam uns aos outros, formando miotubos que se diferenciam em novas fibras musculares (WATABE, S., 1999) (Figura 3). Quando esses mioblastos se incorporam a uma fibra preexistente para formar novos miotubos, e posteriormente a diferenciação em novas fibras musculares, processo chamado de hiperplasia, sendo mais evidente durante a fase juvenil (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001). Já o crescimento hipertrófico aumenta o diâmetro das fibras e acontece em todos os estágios de desenvolvimento do animal, porém é predominante durante a fases adulta (ALMEIDA, DE et al., 2010).

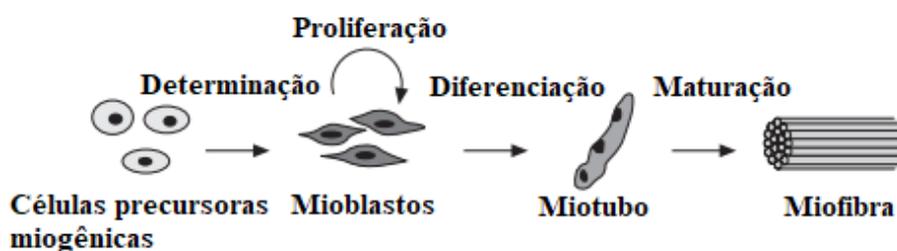


Figura 3. Representação dos principais eventos que acontecem durante o crescimento do músculo estriado esquelético. Fonte: Adaptado de WATABE, (1999).

3.2 Fatores de regulação miogênica

A formação, o crescimento e manutenção das fibras musculares, ocorre na miogênese (PARKER; SEALE; RUDNICKI, Michael A., 2003). No decorrer do desenvolvimento embrionário, ações das células somáticas dependem da sinalização de sinais positivos ou negativos de tecidos adjacentes como a notocorda e tubo neural (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). E, em resposta a esses sinais, os mioblastos começam a expressar ativadores transcricionais que controlam a expressão de genes estruturais musculares, transformando células não musculares com um fenótipo muscular (SILVA, M. D. P.; CARVALHO, 2007).

Os genes encarregados por essa transformação são membros da família dos fatores transcricionais *basic helix-loop-helix* (bHLH), os fatores de regulação miogênica (do inglês, *myogenic regulatory factors* ou *MRFs*) que são proteínas de determinação dos mioblastos (*MyoD*), miogenina (*Myog*), fator miogênico 5 (*Myf5*) e fator miogênico 4 (*MRF4*) (SILVA, M. D. P.; CARVALHO, 2007).

A região *helix-loop-helix* (HLH) é formada por duas α -hélices separadas por um loop. A região básica (*basic*) compreende uma extensão de uma das α -hélices da região

HLH (COLE et al., 2004). Esses fatores de ligação miogênica demonstram 80% de similaridade e na sua sequência com os aminoácidos, compartilham um domínio altamente conservado, o bHLH que são fundamentais para a ligação com o DNA e para controlar os fatores transcricionais da família da proteína E (Figura 4) (EDMONDSON, D. G.; OLSON, E. N., 1993; MURRE et al., 1989). Os heterodímeros MRF-proteína E ou homodímeros de *MRFs* se ligam a sequências de DNA (5'-CANNTG-3'), chamadas como E-box, presentes na região promotora de genes específicos para promover a sua transcrição (CAMPOS et al., 2010; JOHANSEN; OVERTURF, 2006; MURRE et al., 1989; RESCAN, P. Y., 2001).

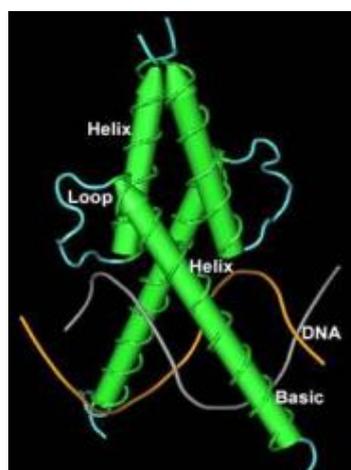


Figura 4. Sistema cristalográfico do complexo constituído através do dímero do fator transcricional da família “basic Helix-Loop-Helix” (bHLH), MyoD e o DNA. Fonte: Adaptado de MA et al., (1994).

Os MRFs são os primeiros a serem necessários para a linhagem miogênica para serem expressos pelos mioblastos (JOHANSEN; OVERTURF, 2005; RELAIX, 2006).. Os genes *MyoD* e *Myf5*, determinam a proliferação dos mioblastos, enquanto os genes *Myog* e *MRF4* são responsáveis pela diferenciação dos mioblastos (JOHANSEN; OVERTURF, 2006; MEGENEY; RUDNICKI, M. A., 1995). Ao contrário dos *MRFs* que contribuem a favor do crescimento muscular, a miostatina (*Mstn*), conhecida como GDF8 (“*β transforming growth factor*”), atua inibindo a proliferação e diferenciação dos mioblastos no músculo esquelético (GABILLARD, Jean Charles et al., 2013).

4. Genes relacionados ao crescimento: MRFs e Miostatina.

4.1 *MyoD* e Miogenina (*Myog*)

O gene *MyoD*, descoberto por DAVIS; WEINTRAUB; LASSAR, (1987) e a miogenina (*Myog*) por WRIGHT; SASSOON; LIN, (1989), são conhecidos como fatores de transcrição que pertencem à família de proteínas "basic helix-loop-helix" (COLE et al., 2004). O desenvolvimento da miogênese acontece pela ação de várias moléculas de sinalização que regulam temporariamente a ativação, proliferação, diferenciação e fusão da linhagem de células miogênicas para a formação dos miotubos, que quando amadurecem formam a fibra muscular ((BUCKINGHAM; RIGBY, 2014). Dessa forma, ocorre a especificação de células progenitoras para formar a célula precursora miogênica (MPCs), linhagem dos somitos, e essas células dão origem aos mioblastos que se diferenciam com a regulação positiva de *MyoD* e *Myf5*, formando as fibras musculares lentas (vermelho) ou rápidas (brancos) (DAL-PAI-SILVA et al., 2020; CHARGÉ E RUDNICK, 2004).

Os genes *MyoD* e *Myf5* determinam a identidade dos mioblastos e contribuem para a expansão de células precursoras miogênicas, só que antes da expressão dos *MRFs*, essas células necessitam ser pré-comprometidas com a linhagem miogênica (SILVA, M. D. P.; CARVALHO, 2007). No embrião, esse pré-compromisso sofre ação da família Pax, como o Pax3 que é expresso em células da mesoderme (GOULDING; LUMSDEN; PAQUETTE, 1994; WILLIAMS; ORDAHL, 1994), os mioblastos deixam o ciclo celular para expressar *MyoD* e *Myf5*, formando em miócitos diferenciados e logo após, inicia-se a expressão da miogenina e *MRF4* para regular a diferenciação das fibras musculares (Figura 5) (MEGENEY; RUDNICKI, M. A., 1995).

Quando ocorre a formação do músculo vermelho e branco, uma subpopulação de células precursoras miogênicas não se funde para formar miotubos, ocupando um espaço próximo às miofibrilas no processo final de desenvolvimento do músculo, essas células expressam principalmente os genes *Pax3* e *Pax7*, que dão origem aos mioblastos em mamíferos e em peixes (ALMEIDA, DE et al., 2008; BERBEROGLU et al., 2017; DUMONT; WANG; RUDNICKI, 2015; KASSAR-DUCHOSSOY et al., 2005; ZHANG; ANDERSON, 2014).

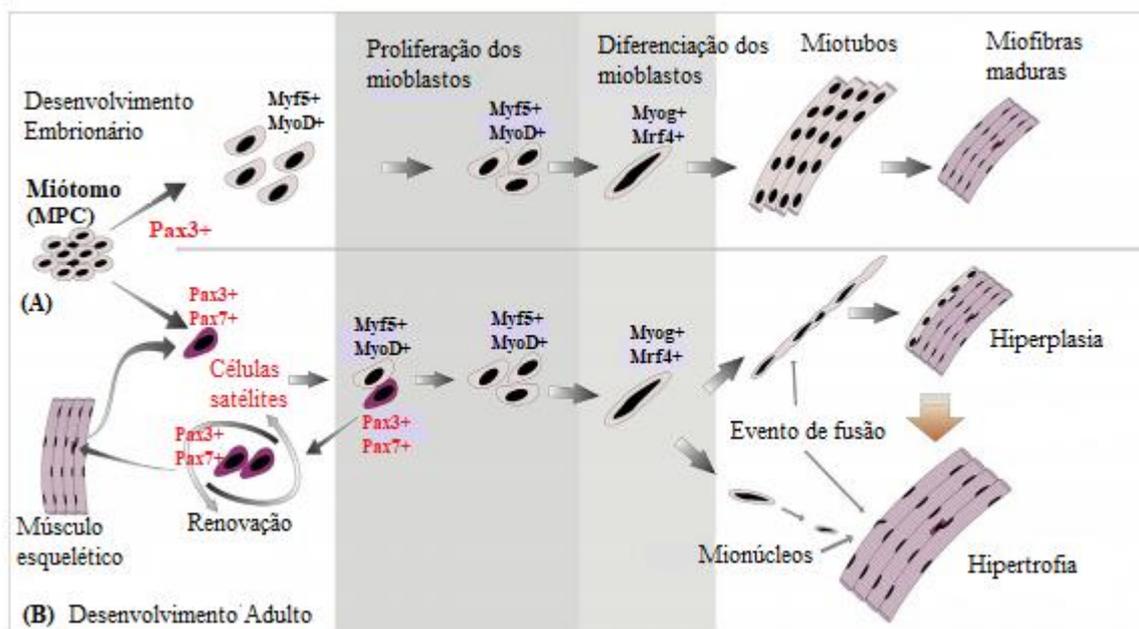


Figura 5. (A) Esquema demonstrando a linhagem das células precursoras miogênicas (MPCs) do miótomo que comprometida com a linhagem miogênica expressa Pax3 que colabora para a expansão das células precursoras miogênicas e a diferenciação dos mioblastos. MyoD e Myf5 controlam a proliferação de mioblastos. Miogenina e MRF4 regulam a diferenciação de mioblastos em miotubos, que mais tarde se diferenciam para formar miofibras maduras. (B) A subpopulação de MPCs expressando Pax3 e Pax7 deu origem às células semelhantes aos mioblastos, localizadas nas fibras musculares maduras. Essas células, quando ativadas, proliferam sob o controle de MyoD e Myf5, diferenciam-se sob o controle de Miogenina e MRF4, e controlar o crescimento muscular pela hipertrofia da fibra (aumento das fibras em diâmetro e comprimento com núcleo adicionado na fibra preexistente) e hiperplasia da fibra (acréscimo do número de fibras musculares). Uma população de mioblastos ao expressar Pax3 e Pax7 são responsáveis pela auto renovação dos mioblastos inativados Fonte: Adaptado de DAL-PAI-SILVA et al., (2020).

Estudos relacionados com os genes *MyoD* e miogenina foram encontrados em zebrafish (HIRSINGER et al., 2004; JOHANSEN; OVERTURF, 2006), truta arco-íris (STEINBACHER et al., 2007), pacu (ALMEIDA, DE et al., 2010), pirarucu (ALMEIDA, DE et al., 2008), salmão (JOHNSTON, I. A. N. A., 2001), tilápia do Nilo (NEBO et al., 2013). De acordo com o estudo de RUDNICKI, et al., (1993) ao avaliarem ratos mutantes sem *MyoD* e *Mrf5*, observaram que a perda desses genes, resultou na falha completa na determinação de mioblastos para formar o músculo esquelético, indicando que a rede de transcrição regula o processo da miogênese. Quando apresentam deficiência da miogenina, os embriões morrem durante o período perinatal, pela falta de diferenciação de miócitos, mostrando ausência quase total de fibras musculares (HASTY et al., 1993; NABESHIMA, Y. et al., 1993).

4.2 Miostatina (*Mstn*)

O gene da miostatina (*Mstn*) ou GDF8 (Fator de crescimento e diferenciação – 8), descrita por (MCPHERRON, A C.; LAWLER; LEE, S J, 1997)McPherron et al. (1997), é uma proteína da família TGF- β (fator de crescimento transformador β) e possui papel como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético (ACOSTA, J. et al., 2005; MCPHERRON, A C.; LAWLER; LEE, S J, 1997.) A expressão da miostatina nos mamíferos é exclusivamente no músculo esquelético, nas fases de desenvolvimento e adultos (MACCATROZZO et al., 2001). Nos peixes, é possível encontrar a expressão da miostatina no tecido muscular, olhos, brânquias, ovários, testículo, intestino e cérebro, possuindo papel também função em tecidos reprodutivos ((ACOSTA, J. et al., 2005; MACCATROZZO et al., 2001; RODGERS et al., 2001).

A superexpressão da miostatina pode causar atrofia muscular, enquanto a rejeição ou perda da função pode causar crescimento excessivo do músculo (RODRIGUEZ et al., 2014). Em camundongos, o gene da miostatina atua como fator regulador negativo, e resulta na perda intensa da massa muscular (ZIMMERS et al., 2002). Porém, foi relatado que em camundongos que possuía a mutação do gene, ocorreu o aumento do número e do tamanho das fibras musculares, demonstrando que a miostatina controla o número de fibras durante o período embrionário e o crescimento no período pós-natal (MCPHERRON, A C.; LAWLER; LEE, S J, 1997).

A via de sinalização da miostatina, assim como de outros genes do músculo é muito importante para a manutenção do fenótipo muscular, pois é capaz de inibir a ativação da via fosfatidilinositol quinase (PIK3), que inibe a fosforilação da proteína AKT, inibindo a via de síntese proteica AKT/MTOR (OTTO; PATEL, 2010). Ao inibir a proteína PIK3, através da ligação aos receptores específicos na membrana da célula-alvo, ativando várias proteínas da família Smads fazendo que formem complexos (OTTO; PATEL, 2010). Esses complexos de proteínas Smads são transportados para o núcleo, que interage com proteínas 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, inibindo o crescimento muscular (JOHNSTON, I. A.; BOWER; MACQUEEN, 2011). Consequentemente, proteínas responsáveis pela degradação proteica deixam de ser inibidas e passam a atuar, inibindo o crescimento muscular (OTTO; PATEL, 2010).

Assim, a modulação do crescimento muscular está diretamente relacionada com o controle da proliferação dos mioblastos através da expressão do gene *MyoD* e a diferenciação dos mioblastos pela expressão da miogenina (JOHANSEN; OVERTURF, 2006), e esse crescimento pode ser inibido pela ação do gene da miostatina (ACOSTA, J. et al., 2005). Por isso, o conhecimento dos fatores que controlam o crescimento muscular é importante para entender a dinâmica desse processo, principalmente, na área da aquicultura, em espécies com grande valor comercial como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), considerando a importância e o potencial de crescimento das linhagens geneticamente melhoradas.

LITERATURA CITADA

ACOSTA, J. et al. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. **Journal of Biotechnology**, 2005. v. 119, n. 4, p. 324–331.

ALEXANDER, R. M. N. The orientation of muscle fibres in the myomeres of fishes. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 1969. v. 49, n. 2, p. 263–290.

ALMEIDA, F. L. A. DE et al. 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**, 2008. v. 39, n. 8, p. 1306–1311.

ALMEIDA, F. L. A. DE et al. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**, 2010. v. 41, n. 8, p. 997–1004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2010.06.012>>.

BERBEROGLU, M. A. et al. Satellite-like cells contribute to pax7-dependent skeletal muscle repair in adult zebrafish. **Developmental Biology**, 2017. v. 424, n. 2, p. 162–180. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.004>>.

BUCKINGHAM, M.; RIGBY, P. W. J. Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that Control Myogenesis. **Developmental Cell**, 2014. v. 28, n. 3, p. 225–238. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020>>.

- CAMPOS, C. et al. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). **Journal of Experimental Biology**, 2010. v. 213, n. 2, p. 200–209.
- CASTAGNOLLI, N. 1992. Piscicultura de água doce. Jaboticabal: Funep, 1992. pp. 189.
- CHARGÉ, S. B; RUDNICK, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological reviews**. 2004, v.84, n.1, p.209-238.
- CLOSE, R. I. Dynamic Mammalian Properties of Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**. 52. 1972, pp. 129-197.
- COLE, N. J. et al. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. **Journal of Experimental Biology**, 2004. v. 207, n. 24, p. 4239–4248.
- CURRIE, P. D.; INGHAM, P. W. 1. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. **Fish Physiology**, 2001. v. 18, n. C.
- DAL-PAI-SILVA, M. et al. Cellular and molecular features of skeletal muscle growth and plasticity. **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**. 2020, p. 163–183. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00008-7>.
- DAVIS, R. L.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. **Cell**, 1987. v. 51, n. 6, p. 987–1000.
- DEVOTO, S. H. et al. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. **Development**, 1996. v. 122, n. 11, p. 3371–3380.
- DRIEDZIC, W. R.; HOCHACHKA, P. W. Control of energy metabolism in fish white muscle. **American Journal of Physiology**, 1976. v. 230, n. 3, p. 579–582.
- DUMONT, N. A.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, Michael A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. **Development (Cambridge)**, 2015. v. 142, n. 9, p. 1572–1581.
- EDMONDSON, D. G.; OLSON, E. N. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. **Journal of Biological Chemistry**, 1993. v. 268, n. 2, p. 755–758.
- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Food & Agriculture Org. Rome. doi: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAUCONNEAU, B et al. Growth and meat quality relations in carp. **Aquaculture**. 1995, 129: pp. 265–297. doi:10.1016/0044-8486(94)00309-C.
- FERIAN, A. Efeito da suplementação de leucina na sinalização da via da miostatina durante atrofia muscular esquelética Dissertação. **Instituto de Ciências Biomédicas**, 2015.
- GABILLARD, Jean Charles et al. Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes. **General and Comparative Endocrinology**, 2013. v. 194, p. 45–54. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.012>>.
- GOULDING, M.; LUMSDEN, A.; PAQUETTE, A. J. Regulation of Pax-3 expression

in the dermomyotome and its role in muscle development. **Development**, 1994. v. 120, n. 4, p. 957–971.

GUPTA, M. V; ACOSTA, B. O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. **NAGA, WorldFish Center Quarterly**, 2005. v. 27, n. 3, p. 4–14.

HASTY, P. et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, 1993. v. 364, n. 6437, p. 501–506.

HAYASHI, C., BOSCOLO et al. Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. **Acta Scientiarum**. 1999, 21:3, pp. 733-737

HAYASHI, C. et al. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2002. v. 31, n. 2 SUPPL., p. 823–828.

HIRSINGER, E. et al. Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. **Developmental Biology**, 2004. v. 275, n. 1, p. 143–157.

JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Marine Biotechnology**, 2005. v. 7, n. 6, p. 576–587.

JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2006. v. 144, n. 1, p. 119–127.

JOHNSTON, I. A. Muscle development and growth: Potential implications for flesh quality in fish. **Aquaculture**, 1999. v. 177, n. 1–4, p. 99–115.

JOHNSTON, I. A ; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, 2011. v. 214, n. 10, p. 1617–1628.

JOHNSTON, I. A ; HALL, T. E. Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. **American Fisheries Society Symposium**, 2004. v. 2004, n. 40, p. 85–116.

JOHNSTON, I. A. N. A. of Muscle Growth Patterns. 2001. v. 18.

KASSAR-DUCHOSSOY, L. et al. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. **Genes and Development**, 2005. v. 19, n. 12, p. 1426–1431.

KUBITZA, F. Tilápias : qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. **Panorama da Aquicultura**, 2000. v. 10, p. 1–11.

LI, S. F. et al. Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection. **Aquaculture Research**, 2006. v. 37, n. 12, p. 1165–1171.

LISTRAT, A. et al. How muscle structure and composition determine meat quality. **Productions animales**, 2015. v. 28, n. 2, p. 125–136.

- LOVSHIN, L. L. Tilapia culture in Brazil. In: Costa-Pierce, B. A., Rakocy, J. E. (Ed.). *Tilapia aquaculture in the Americas*. Louisiana: **The World Aquaculture Society**, 2000, v.2, p.133-140.
- LUPCHINSKI JUNIOR, E. et al. Avaliação da variabilidade das gerações G0 e F1 da linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 2008. v. 30, n. 2, p. 233–240.
- MA, P. C. M. et al. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: Perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. **Cell**, 1994. v. 77, n. 3, p. 451–459.
- MACCATROZZO, L. et al. Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): Sequence, genomic structure, and expression pattern. **Marine Biotechnology**, 2001. v. 3, n. 3, p. 224–230.
- MARECO, E. A. (*Oreochromis niloticus*) LINHAGEM GIFT RELACIONADOS AO CRESCIMENTO MUSCULAR EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) LINHAGEM GIFT. 2012. n. 14.
- MCPHERRON, A C.; LAWLER, A M.; LEE, S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [In Process Citation]. **Nature**, 1997. v. 387, n. May, p. 83–90.
- MEGENEY, L. A.; RUDNICKI, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, 1995. v. 73, n. 9–10, p. 723–732.
- MOREIRA, A. A. et al. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2007. v. 42, n. 4, p. 521–526.
- MURRE, C. et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell**, 1989. v. 58, n. 3, p. 537–544.
- NABESHIMA, Y. et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. **Nature**, 1993. v. 364, n. 6437, p. 532–535.
- NEBO, C. Expressão de genes relacionados ao crescimento muscular durante a restrição alimentar e relacionamento em juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Aleph**, 2011. p. 94 f.
- NEBO et al. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2013. v. 164, n. 4, p. 268–274. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.003>>.
- OTTO, A.; PATEL, K. Signalling and the control of skeletal muscle size. **Experimental Cell Research**, 2010. v. 316, n. 18, p. 3059–3066. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.009>>.
- PARKER, M. H.; SEALE, P.; RUDNICKI, Michael A. Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nature Reviews Genetics**,

2003. v. 4, n. 7, p. 497–507.

PEIXE-BR. Anuário Peixe Br da Piscicultura 2020. **Associação Brasileira de Piscicultura**, 2020. p. 1–136.

RELAIX, F. Skeletal muscle progenitor cells: From embryo to adult. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2006. v. 63, n. 11, p. 1221–1225.

RESCAN, P. Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, 2001. v. 130, n. 1, p. 1–12.

RESCAN, Pierre Yves; JUTEL, I.; RALLIÈRE, C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Experimental Biology**, 2001. v. 204, n. 20, p. 3523–3529.

RODGERS, B. D. et al. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. **Endocrinology**, 2001. v. 142, n. 4, p. 1412–1418.

RODRIGUEZ, J. et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2014. v. 71, n. 22, p. 4361–4371.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. **Fish Physiology**, 2001. v. 18, n. C, p. 103–140.

RUDNICKI, Michael A. et al. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, 1993. v. 75, n. 7, p. 1351–1359.

SÄNGER, A. M. AND STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. **Academic Press London**. 2001, pp. 187-250.

SANTIAGO, C. B.; ALDABA, M. B.; REYES, O. S. Influence of feeding rate and diet form on growth and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquaculture**, 1987. v. 64, n. 4, p. 277–282.

SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2007. v. 36, n. suppl, p. 21–31.

SOUZA, M. L. R. De et al. Defumação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inteira eviscerada e filé: aspectos referentes às características organolépticas, composição centesimal e perdas ocorridas no processamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2004. v. 33, n. 1, p. 27–36.

STEINBACHER, P. et al. MyoD and Myogenin expression during myogenic phases in brown trout: A precocious onset of mosaic hyperplasia is a prerequisite for fast somatic growth. **Developmental Dynamics**, 2007. v. 236, n. 4, p. 1106–1114.

VIDELER, J. J. An opinion paper: Emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2011. v. 37, n. 2, p. 337–343.

VIEIRA, V. P. et al. Avaliação da variabilidade genética de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com o uso do marcador de RAPD. **Revista Acadêmica**

Ciência Animal. 2005, 3:3. pp. 41-49.

WATANABE, W. O. et al. Tilapia Production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, 2002, 10: 3-4. pp. 465-498.

WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. **Journal of Fish Biology**, 1999. v. 55, n. SUPPL. A, p. 1–18.

WILLIAMS, B. A.; ORDAHL, C. P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. **Development**, 1994. v. 120, n. 4, p. 785–796.

WRIGHT, W. E.; SASSOON, D. A.; LIN, V. K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. **Cell**, 1989. v. 56, n. 4, p. 607–617.

ZHANG, H.; ANDERSON, J. E. Satellite cell activation and populations on single muscle-fiber cultures from adult zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, 2014. v. 217, n. 11, p. 1910–1917.

ZIMMERS, T. A. et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science**, 2002. v. 296, n. 5572, p. 1486–1488.

II. OBJETIVOS

Avaliar em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), dentro de um programa de melhoramento genético a contribuição dos mecanismos hiperplásico e hipertrófico e a expressão de genes que controlam o crescimento muscular.

1 **III - Expressão de genes associados ao crescimento muscular em tilápia do Nilo**
2 **(*Oreochromis niloticus*) melhoradas**

3

4 Improved gene expression associated with muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis*
5 *niloticus*)

6

7

8

9 **RESUMO**

10 O processo de crescimento muscular envolve a ativação, proliferação e diferenciação
11 de mioblastos, ocorrendo por dois mecanismos: a hiperplasia e hipertrofia que são reguladas
12 por uma série de proteínas, como os fatores de regulação miogênica (MRFs) e a miostatina
13 (*Mstn*). Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar em tilápia do Nilo
14 (*Oreochromis niloticus*), dentro de um Programa de Melhoramento Genético a expressão de
15 genes que controlam o crescimento muscular, e caracterizar os mecanismos de crescimento
16 hipertrófico e hiperplásico da musculatura branca através da morfometria das fibras
17 musculares. Os animais são provenientes da décima geração do Programa de Melhoramento
18 da Linhagem GIFT- TILAMAX/UEM, da Universidade Estadual de Maringá (PMGT-UEM),
19 onde foram coletadas amostras da musculatura branca dorsal dos 16 peixes adultos de tilápia
20 do Nilo (*Oreochromis Niloticus*), separadas em dois grupos: animais de alto valor genético
21 (AVG) e animais de baixo valor genético (BVG). Foram realizadas análises de peso e
22 comprimento ao peso final, análises de expressão gênica para os genes relacionados ao
23 crescimento muscular - *MyoD*, miogenina (*Myog*) e miostatina (*Mstn*) e análises de
24 morfologia e morfometria das fibras musculares. Os animais de alto valor genético
25 apresentaram valores de peso e comprimento maiores comparados aos animais de baixo valor
26 genético. Para as análises de expressão gênica, os resultados não foram significativos para os
27 genes *MyoD* e miogenina para ambos os grupos. Entretanto, para o gene da miostatina o
28 resultado foi significativo, e houve maior expressão para o tratamento com baixo valor
29 genético. A análise morfométrica das fibras musculares mostrou valores significativos para as
30 classes de diâmetros entre 20 e 50µm e maiores que 50µm, porém não foi significativo para a
31 classe de diâmetro das fibras menores que 20 µm, demonstrando que o intenso crescimento

32 muscular hipertrófico. Como conclusão, os animais de AVG apresentaram maior desempenho
33 como resultado de maior ganho de massa muscular por hipertrofia, como consequência de
34 menor expressão de miostatina em relação ao BVG. Salientando que o presente trabalho é o
35 primeiro estudo com tilápias do Nilo melhoradas e que é de grande interesse futuros estudos
36 relacionados ao crescimento muscular, principalmente em peixes de água doce, de rápido
37 crescimento.

38

39 **Palavras-chave:** Genética, hiperplasia, hipertrofia, músculo esquelético, peixes.

40

41 III - Expression of genes associated with muscle growth in Improved Nile tilapia
42 (*Oreochromis niloticus*)

43 ABSTRACT

44 The muscle growth process involves the activation, proliferation and differentiation of
45 myoblasts, occurring by two mechanisms: hyperplasia and hypertrophy, which are regulated
46 by a series of proteins, such as myogenic regulation factors (MRFs) and myostatin (Mstn). In
47 this sense, the objectives of this work were to evaluate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*),
48 from a Genetic Improvement Program the expression of genes that control muscle growth,
49 and to characterize the mechanisms of hypertrophic and hyperplastic growth of white
50 musculature through morphometry muscle fibers. The animals come from the tenth generation
51 of the GIFT-TILAMAX / UEM Lineage Improvement Program, of the State University of
52 Maringá (PMGT-UEM), where samples of the dorsal white musculature in 16 adult Nile
53 tilapia fish (*Oreochromis Niloticus*) were collected and separated into two groups: animals of
54 high genetic value (AVG) and animals of low genetic value (BVG). Analyzes of weight and
55 length at final weight, analysis of gene expression for genes related to muscle growth -
56 MyoD, myogenin (Myog) and myostatin (Mstn) and analysis of morphology and
57 morphometry of muscle fibers were carried out. The animals with high genetic value had
58 higher weight and length values compared to the animals with low genetic value. For gene
59 expression analyzes, the results were not significant for the MyoD and myogenin genes in
60 both groups. However, for myostatin gene, the result was significant, and there was greater
61 expression for treatment with low genetic value. The morphometric analysis of the muscle
62 fibers showed significant values for classes of diameters between 20 and 50 μ m and greater
63 than 50 μ m, however it was not significant for fibers class of diameter smaller than 20 μ m,

64 demonstrating that the intense hypertrophic muscle growth. As a conclusion, the AVG
65 animals showed higher performance as a result of greater muscle mass gain due to
66 hypertrophy and as a consequence of less myostatin expression compared to BVG.
67 Emphasizing that the present work is the first study with improved Nile tilapia and that it is of
68 great interest for future studies related to muscle growth, mainly in fast-growing freshwater
69 fish.

70

71 Keywords: Genetics, hyperplasia, hypertrophy, skeletal muscle, fish.

72 1. Introdução

73 A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca por possuir vários atributos que a
74 tornam apta para promover o crescimento da produção, como por exemplo, possui facilidade
75 de reprodução, por sua adaptabilidade a vários sistemas de produção e rápido crescimento
76 (WATANABE et al., 2002).

77 O índice de crescimento em peixes é um dos fatores mais importantes para o sucesso
78 na aquicultura, pois grande parte da carne, é formada pelos músculos esqueléticos, fornecendo
79 proteína de alto valor na dieta (ZHANG, Y. et al., 2006). Por isso, um programa de
80 melhoramento genético voltado a produção animal, busca por animais com maior ganho de
81 peso e faz com o crescimento muscular seja um fator importante (RESENDE, 2010). As
82 linhagens melhoradas têm favorecido ciclos de produção mais curtos, com melhores índices
83 de desempenho em ganho de peso gerando maior rentabilidade aos produtores e melhor
84 rendimento à indústria (FÜLBER et al., 2009).

85 O crescimento muscular depende da ativação, proliferação e diferenciação de mioblastos,
86 que são células-tronco localizadas na periferia das fibras musculares. Nos peixes, o
87 crescimento muscular ocorre pela hiperplasia e hipertrofia (ROWLERSON; VEGGETTI,
88 2001). Esses eventos são regulados por várias proteínas, como os fatores de regulação
89 miogênica (*MRFs*) e a miostatina (*Mstn*) (RESCAN, P. Y., 2001).

90 Dentre os *MRFs*, estão (*MyoD*), fator miogênico 5 (*Myf5*), miogenina (*Myog*) e fator
91 miogênico 4 (*MRF4*) (WATABE, 1999), que são responsáveis pelo controle da proliferação e
92 diferenciação dos mioblastos, respectivamente, no período embrionário e pós-natal
93 (BUCKINGHAM; RIGBY, 2014; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017). Já a
94 miostatina (*Mstn*) é considerada um regulador negativo do crescimento muscular por inibir a

95 proliferação e diferenciação dos mioblastos em mamíferos (GABILLARD et al., 2013). Em
96 peixes, estudos mostram que a função da Miostatina parece ser mais ampla, pois sua
97 expressão não se restringe ao tecido muscular estriado esquelético (LANGLEY et al., 2002;
98 LEE et al., 2009). No entanto, os mecanismos envolvidos com o controle do crescimento
99 muscular pela miostatina em peixes ainda não é bem compreendido.

100 Portanto o objetivo do trabalho é avaliar em tilápia do Nilo, dentro de um Programa de
101 Melhoramento Genético, a contribuição dos mecanismos hiperplásico e hipertrófico e a
102 expressão dos genes que controlam o crescimento muscular.

103

104 **2. Materiais e métodos**

105 Este experimento foi aprovado pela comissão de ética no uso dos animais (CEUA), da
106 Universidade Estadual de Maringá (parecer de aprovação 4195300320).

107

108 **2.1 Animais**

109 Foram utilizados 16 exemplares de tilápia do Nilo adultas, provenientes da décima
110 geração do Programa de Melhoramento da Linhagem GIFT- TILAMAX/UEM (PMGT-
111 UEM), da unidade demonstrativa de produção de tilápia do Nilo em tanques rede da
112 Universidade Estadual de Maringá, no Rio do Corvo, Município de Diamante do Norte – PR.
113 O experimento foi conduzido em um Delineamento Inteiramente ao acaso (DIC) com dois
114 grupos experimentais, animais melhorados com alto valor genético (AVG) e animais
115 melhorados com baixo valor genético (BVG), com oito repetições por grupo experimental.

116 Antes do abate, foram verificados e registrados os números dos tag PIT (Passive
117 Integrated Transponder). O método de abate foi através de sangria, após a insensibilização por
118 choque-térmico (caixas isotérmicas com gelo moído e água [1:1], temperatura de 0°C). Após
119 o abate, os animais foram pesados individualmente e coletadas as medidas de peso (g) e
120 comprimento total (cm) e as amostras do músculo branco dorsal, próximo à linha lateral.

121

122 **2.2 Expressão Gênica**

123 Amostras da musculatura branca dorsal dos peixes foram coletadas em condições
124 estéreis, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer a -80°C

125 até a extração do RNA. A avaliação da expressão dos genes, *MyoD*, miogenina e da
126 Miostatina na musculatura esquelética da tilápia foi realizada por reação em cadeia da
127 polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR).

128 A extração do RNA foi realizada com o reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA,
129 USA), utilizando 1 ml da solução para cada 100 mg do tecido muscular, conforme
130 recomendado pelo fabricante. Todos os materiais utilizados foram tratados anteriormente
131 com inibidor de RNase - RNase AWAY® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Após a
132 adição do Trizol, as amostras foram trituradas, homogeneizadas e mantidas por 5 minutos à
133 temperatura ambiente. Em seguida, em cada amostra foram adicionados 200 µl de
134 clorofórmio, seguida de agitação manual. Após essa agitação, as amostras foram mantidas por
135 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos a 12.000 xg, a 4°C. O
136 sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo estéril de 1,5 ml contendo 500 µL
137 de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por
138 10 minutos. Novamente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 xg, a 4°C.
139 O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com 1 ml de etanol 75%. Uma última
140 centrifugação a 7.500 xg por 5 minutos foi realizada e o sobrenadante descartado. Por fim, o
141 *pellet* ficou secando por 20 minutos e foi ressuscitado em água ultrapura livre de RNase. A
142 concentração do RNA total foi mensurada via espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo
143 Scientific) e sua integridade avaliada em gel de agarose a 1%, corado com reagente SYBR®
144 Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) e visualizado sob luz ultravioleta.

145 As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA,
146 USA), conforme recomendações do fabricante. Em um tubo estéril foi adicionado 1 µg de
147 RNA total, 1 µL de 10 X DNase I reaction buffer e 1 µL DNase I amplification grade (1
148 U/µL). A reação ficou incubada à temperatura ambiente, por 15 minutos. Foi inativada a
149 DNase adicionando 1µl de EDTA a 25 mM e aquecida a 65°C por 10 minutos.

150 Para síntese do Cdna, utilizou-se o kit SuperScript III First-Strand Syntesis Super Mix
151 (Life Technologies, CA, Carlsbad, USA) conforme as normas do fabricante. Em um tubo
152 estéril e livre de RNase, foram adicionados 1µL de tampão para o anelamento (“annealing
153 buffer”), 1 µL de oligo (dT) (50uM oligo(dT) 20 e 6 µl de RNA total tratado com Dnase. A
154 reação foi incubada por 5 minutos a 65°C, e logo após, colocada em gelo por 1 minuto.
155 Posteriormente, foi adicionado 10 µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix (Life
156 Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa

157 SuperScript III e o inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C e por 5
 158 minutos a 85°C, e imediatamente colocada em gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C
 159 até o momento das análises.

160 As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real foram realizadas,
 161 utilizando o composto fluorescente Power Up SYBR GREEN (Applied Biosystems, Carlsbad,
 162 CA, USA), 10 uL por reação. Esse composto quando está em solução apresenta pouca
 163 fluorescência, porém, o acúmulo do corante nas regiões específicas de ligação na dupla hélice
 164 durante os ciclos da PCR, faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação,
 165 podendo ser detectada e quantificada. As análises de PCR em tempo real foram realizadas no
 166 equipamento Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA,
 167 USA). Os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo software
 168 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> para os genes *MyoD*, *Myog*, *Mstn*, de tilápia,
 169 confeccionados pela (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com o banco de dados do
 170 *National Center for Biotechnology Information* disponível no site
 171 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (número de acesso NM_001279720.1, NM_001279526.1,
 172 XM_003458832.5 e como controle endógeno foi utilizado o gene da β -actina número de
 173 acesso XM_003443125.7). Todas as análises foram realizadas em duplicatas, com volume
 174 final de 20 μ L por amostra.

175 Tabela 1- Sequências de *primers* utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR em tempo real
 176 após transcrição reversa RT-qPCR).

Genes	Temp (°C)	Fw/ Rv	Sequências de <i>Primers</i> (5' - 3')	Amplicom (pb)	Nº de Acesso NCBI
<i>MyoD</i>	60°C	Fw	CTTCTACCCGGTGCTGGAG	200	NM_001279720.1
		Rv	CCAGACTGGAGACCACTGAAC		
<i>Myog</i>	60°C	Fw	CACTGAGACAGGACAGCAGG	219	NM_001279526.1
		Rv	TCCACAATGGAGGTCAAGGC		
<i>Mstn</i>	60°C	Fw	CATCGAGATCAACGCTTTCG	114	XM_003458832.5
		Rv	CTGGGGCCCTCTGAAATCTT		

β -		Fw	TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG		
	60°C			117	XM_003443125.7
actina		Rv	CTGTTGGCTTTGGGGTTCA		

177 Fw= Forward; Rv= Reverse; Temp. (°C)= Temperatura; *MyoD*; *Myog*= Miogenina; *Mstn*=
 178 Miostatina; β -actina= Beta actina.

179

180 2.3 Morfologia e Morfometria

181 Para a análise da morfologia e morfometria das fibras musculares foi utilizada
 182 metodologia descrita por (ALMEIDA, DE et al., 2008). Foram coletados fragmentos da
 183 musculatura branca dorsal, na proximidade da linha lateral. Logo após a coleta, todas as
 184 amostras musculares foram envolvidas em talco neutro, congeladas em nitrogênio líquido e
 185 armazenadas em freezer a -80°C. Os cortes transversais (10 μ m), obtidos em criostato, foram
 186 submetidos à coloração hematoxilina-eosina (H.E) para avaliação da morfologia e
 187 morfometria das fibras musculares. Utilizando um sistema de análise de imagens pela objetiva
 188 de 20X, em campos aleatórios da lâmina histológica, foi determinado o menor diâmetro de
 189 200 fibras musculares, por animal, que foram agrupadas em classes de diâmetros (<20, >20 e
 190 <50, >50), para avaliar o grau de crescimento hipertrófico e hiperplásico das fibras
 191 musculares. Os resultados foram expressos como frequência de fibras musculares em uma
 192 dada classe de diâmetros em relação à frequência total de fibras analisadas.

193

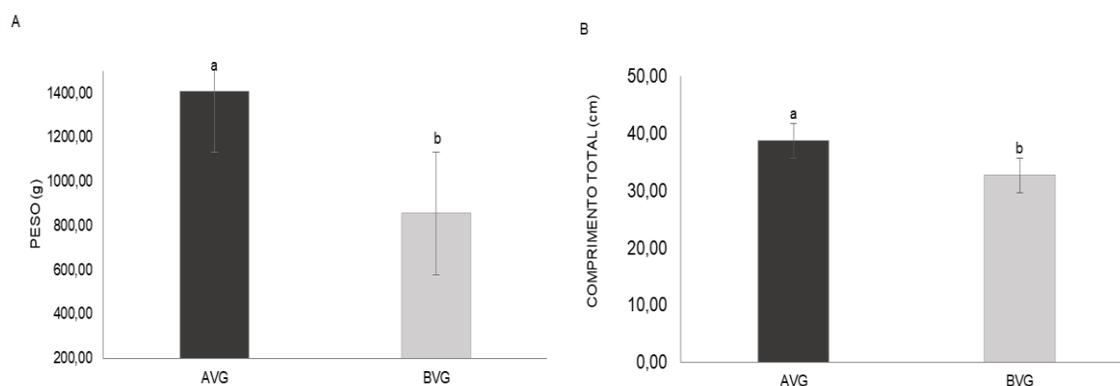
194 2.4 Análises estatísticas

195 Para as análises de expressão relativa foi utilizado o método de Livak $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK;
 196 SCHMITTGEN, 2001) e os resultados foram apresentados como unidade arbitrária (UA). O
 197 teste de Shapiro-Wilk, ao nível de significância de 5%, foi aplicado para verificar a
 198 normalidade da distribuição dos dados de expressão gênica, desempenho e morfometria das
 199 fibras musculares (SHAPIRO; WILK, 1965). A linguagem de programação R (R
 200 development core team, 2019), foi utilizada para as análises de variância, a 5% de
 201 probabilidade para os dados de desempenho e expressão gênica. Para as análises de
 202 morfometria das fibras musculares foram realizadas análises não paramétricas com
 203 distribuição binomial a 5% de probabilidade utilizando o Software SAS (SAS Inst. Inc.,
 204 Cary, NC, USA).

205

206 **3. Resultados**207 **3.1 Desempenho**

208 Na avaliação do desempenho os peixes do grupo com alto valor genético (AVG),
 209 obtiveram maior média de peso ($1409,6\text{g} \pm 381,83\text{g}$), quando comparados com os animais do
 210 grupo de baixo valor genético (BVG; $855,8\text{g} \pm 204,15\text{g}$) ($p=0,0027$) (Figura 1A). Em relação
 211 ao comprimento total AVG também apresentou maior média ($38,75\text{cm} \pm 3,02\text{cm}$), comparado
 212 ao grupo (BVG $32,71\text{cm} \pm 1,93\text{cm}$) ($p=0,0003$) (Figura 1B).



213

214 Fig. 1. Desempenho de peso (A) e comprimento total (B) para os grupos de alto valor genético (AVG)
 215 e baixo valor genético (BVG). Os valores médios com letras diferentes foram significativos a
 216 ($p<0,05$).

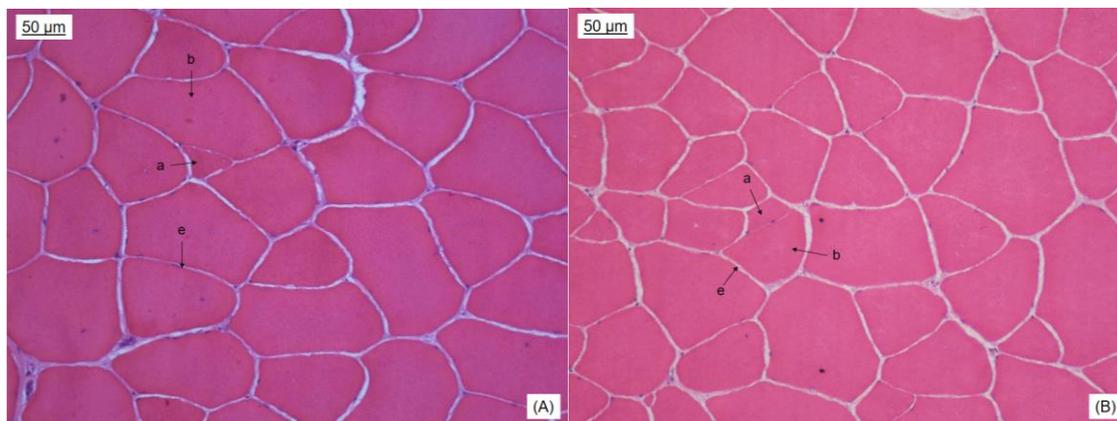
217

218 **3.2 Morfologia e Morfometria**

219 A análise dos cortes histológicos transversais da musculatura branca dorsal, corada em
 220 HE, nos peixes dos grupos AVG e BVG demonstrou fibras musculares redondas ou
 221 poligonais, acidófilas, multinucleadas e com núcleos periféricos. As fibras se mostraram
 222 separadas por septos finos de tecido conjuntivo, o endomísio. Os septos mais espessos de
 223 tecido conjuntivo separaram as fibras musculares em fascículos e compõe o perimísio. As
 224 fibras musculares apresentam um padrão em mosaico discreto, caracterizado por fibras de
 225 grandes diâmetros entremeadas por pequena quantidade de fibras pequenas (Figura 2).

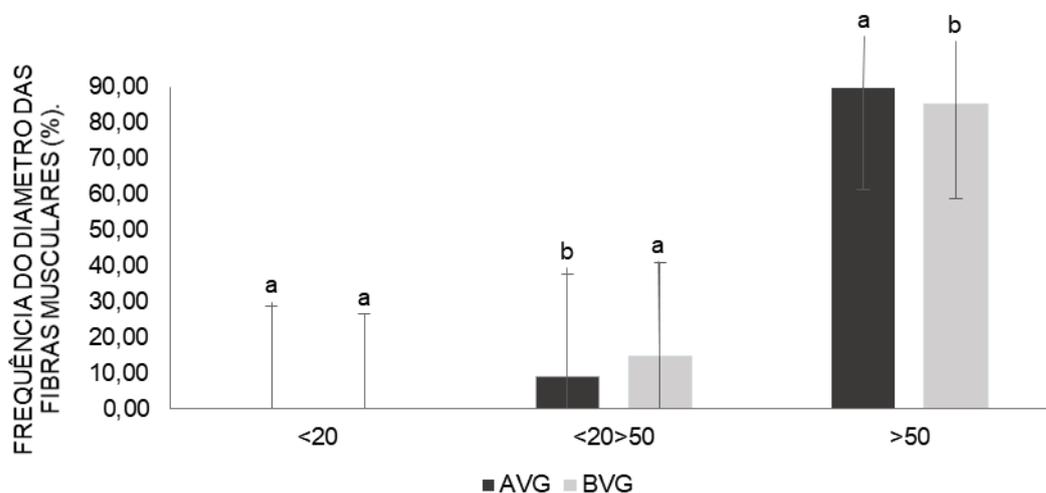
226 A distribuição de frequência de fibras musculares brancas não foi significativa na
 227 classe de diâmetros menores que $20\ \mu\text{m}$ ($p=0,2723$). No entanto, as frequências com
 228 diâmetros apresentaram diferenças significativas entre 20 e $50\ \mu\text{m}$ ($p=0,0007$) e maiores que
 229 $50\ \mu\text{m}$ ($p=0,0060$) entre os dois grupos experimentais. Para ambos os grupos, fibras
 230 musculares com diâmetro menores que $20\ \mu\text{m}$ não apresentou muita frequência. Animais do

231 grupo (BVG) obtiveram 14,63% de suas fibras musculares com diâmetros entre 20 e 50 μm e
 232 enquanto nos animais (AVG) a frequência observada foi de 9,58%. Foram encontradas as
 233 maiores frequências de fibras de diâmetro maiores que 50 μm para os dois grupos, mostrando
 234 que a maior frequência de fibras encontradas foi nos animais do grupo (AVG) apresentando
 235 89,76%, comparados aos animais com (BVG) 85,13% (Figura 3).

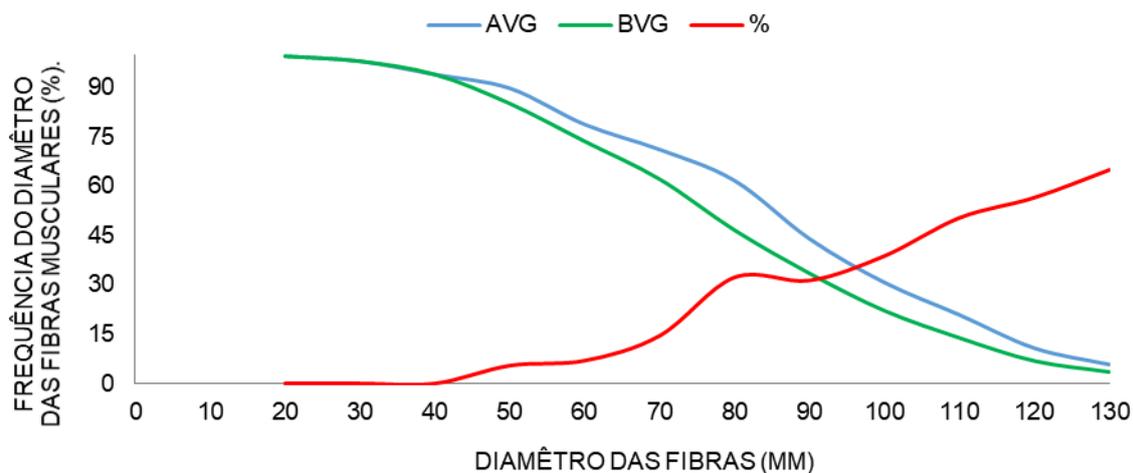


236
 237 Fig. 2. Fotomicrografias representativas de cortes transversais do músculo esquelético branco em
 238 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). (A) Grupo de alto valor genético (AVG). (B) Grupo de baixo
 239 valor genético (BVG). Observa-se um padrão em mosaico discreto das fibras musculares menores(a)
 240 entre as fibras grandes (b). Endomísio (e). Coloração Hematoxilina – eosina (HE). Objetiva de 20X.

241



242
 243 Fig. 3. Distribuição das fibras musculares brancas em classes de diâmetros em tilápias do Nilo adultas
 244 (*Oreochromis niloticus*). As colunas representam frequências de fibras brancas (%) nas classes de
 245 diâmetros em cada grupo (AVG: Alto valor genético; BVG (Baixo valor genético). As letras diferentes
 246 na coluna mostram frequências de fibras com variação significativa em uma mesma classe de diâmetro
 247 ($p < 0,05$).



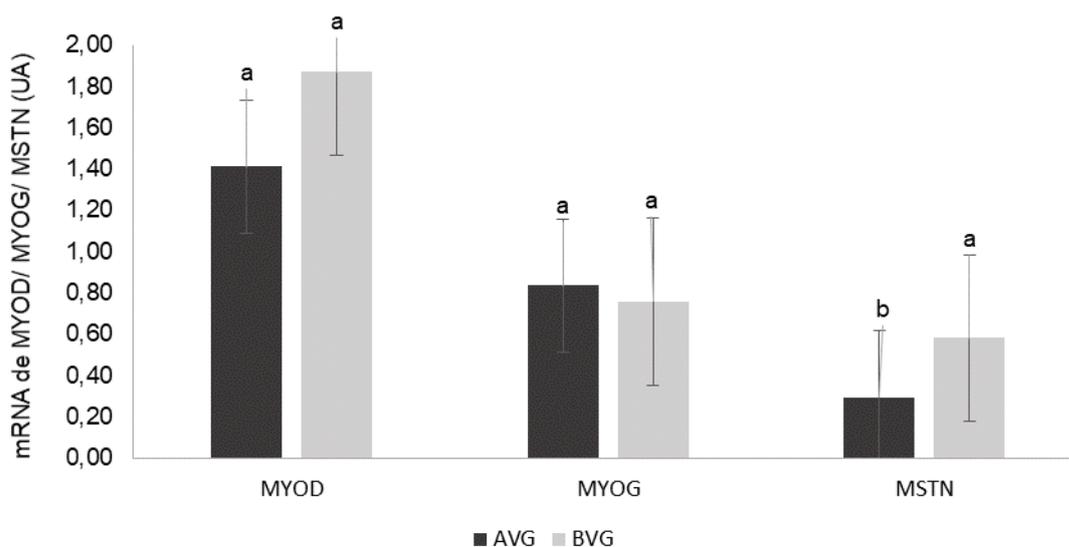
248

249 Fig. 4. Distribuição das fibras de 0 μ m a 130 μ m para o grupo de alto valor genético (AVG) e o grupo
 250 de baixo valor genético (BVG) e a frequência (%) de chances de ocorrer para o grupo (AVG).

251

252 3.3 Expressão de mRNA de *MyoD*, miogenina (*Myog*) e miostatina (*Mstn*)

253 No músculo branco de tilápia do Nilo, não foi observada diferença significativa a
 254 5% na expressão dos genes da *MyoD* ($p=0.4943$) e miogenina (*Myog*) ($p=0.7688$) entre os
 255 grupos de alto e baixo valor genético (Figura 5^a e B respectivamente. Ao contrário, a
 256 expressão do gene da miostatina (*Mstn*) foi significativa ($p=0.0106$). Os peixes do grupo com
 257 baixo valor genético, apresentaram maior expressão em comparação ao grupo com alto valor
 258 genético (Figura 5C).



259

260 Fig. 5. Expressão de proteína da *MyoD*, miogenina (*Myog*) e miostatina (*Mstn*). Grupo de alto valor
 261 genético (AVG); Grupo de baixo valor genético (BVG). Diferenças significativas ($p < 0,05$)

262 comparando o mesmo gene entre os grupos são indicadas pelas diferentes letras minúsculas acima das
263 barras.

264

265 **4. Discussão**

266 Quando se trata de espécies destinadas a produção aquícola, o crescimento muscular
267 possui muito valor econômico, pois o rendimento e a qualidade do filé são importantes
268 (Resende, 2010), principalmente dentro de um programa de melhoramento genético, pois
269 espécies melhoradas tendem a crescer mais. Os resultados demonstraram que os peixes com
270 alto valor genético (AVG) obtiveram maior peso e conseqüentemente maior comprimento
271 comparados aos peixes de baixo valor genético (BVG) (Figura 1A e 1B). O que já era
272 esperado, pois são peixes da décima geração do melhoramento genético, que tem como
273 objetivo aumentar o ganho de peso, rendimento de filé e crescimento.

274 O músculo branco é um tecido bastante estudado em peixes por constituir a maior
275 parte do filé (JOHNSTON, 2006). Nos peixes que apresentam crescimento indeterminado, o
276 crescimento muscular ocorre por hipertrofia e pela formação de novas fibras durante toda a
277 vida do animal (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). Depois que os peixes
278 alcançam a cerca de 56% do tamanho adulto, o crescimento muscular é basicamente pela
279 hipertrofia. Dal Pai-Silva et al., (2003) encontraram em tilápias do Nilo com comprimento
280 médio de 28,30 cm uma menor frequência de fibras brancas com diâmetros de $\leq 21 \mu\text{m}$,
281 sugerindo um recrutamento ativo de fibras para o crescimento. No presente estudo a baixa
282 frequência de fibras menores que $20 \mu\text{m}$ nos dois grupos indica a formação de novas fibras
283 musculares por hiperplasia, refletindo no mosaico discreto observado na análise morfológica.
284 Já na classe de fibras com diâmetro de 20 a $50 \mu\text{m}$ foi observada maior frequência no grupo
285 BVG (14,63%), indicando o início da hipertrofia das fibras recém-formadas (figura. 3).

286 Tilápias AVG apresentaram frequência de aproximadamente 89% para as fibras com
287 diâmetros $>50 \mu\text{m}$, enquanto tilápias BVG apresentaram frequência de aproximadamente 85%
288 (Figura 3C). De acordo com outros estudos, na fase adulta observa-se maior ocorrência da
289 hipertrofia (ALMEIDA, DE et al., 2008, 2010; DAL PAI-SILVA, M. et al., 2003). Os (estes)
290 resultados sugerem que a maior frequência de fibras hipertróficas contribuiu com o maior
291 peso e comprimento nos peixes do grupo com alto valor genético (AVG) quando comparados
292 com o grupo de BVG. Foi observado que conforme ocorre o aumento no diâmetro das fibras
293 (Figura 4.), o grupo AVG apresenta maior probabilidade de ter maior frequência de fibras
294 hipertróficas quando comparado ao grupo BVG. Os diâmetros foram iguais até o $40 \mu\text{m}$,

295 acima de 40 μm , foi observado diferença significativa com vantagem para os animais do
296 grupo AVG, em que nestes, foram observados a porcentagem de 64,97% de probabilidade em
297 possuir fibras de 130 μm comparados ao grupo de BVG.

298 A proliferação de mioblastos está sob controle da expressão de MyoD, enquanto a
299 diferenciação ocorre sob regulação da miogenina (WATABE, 2001). A expressão dos genes
300 da MyoD e miogenina não foi significativa ($p < 0,05$) para ambos os grupos (Figura 5B). Os
301 níveis de MyoD e miogenina encontrados indicam equilíbrio entre os processos de
302 proliferação e diferenciação de mioblastos direcionados para o crescimento hipertrófico das
303 fibras musculares, conforme observado na análise morfométrica (ALMEIDA, DE et al., 2010;
304 NEBO et al., 2013).

305 Em relação ao gene da miostatina (*Mstn*), o grupo AVG apresentou menor expressão
306 em comparação ao grupo BVG. A miostatina possui como função principal regular
307 negativamente o crescimento muscular, pois inibe a proliferação dos mioblastos ao reprimir a
308 transcrição de *MyoD* e ser responsável pela perda da diferenciação pelo gene miogenina e
309 inibindo a síntese de proteínas (LANGLEY et al., 2002). Em zebrafish (*Danio rerio*), os
310 autores (XU, C. et al., 2003), avaliando a expressão da miostatina nas fases larval, juvenil e
311 adulta, encontraram baixa expressão da miostatina na fase larval. Nesta fase, há maior
312 ocorrência da hiperplasia. Na fase juvenil e adulta, o crescimento por hiperplasia é baixo, e a
313 expressão da miostatina aumenta, mostrando que o gene tem ação na inibição do crescimento
314 muscular.

315 Em estudo com o músculo vermelho e branco em pirarucu (*Arapaima gigas*)
316 (CARANI et al., 2013), encontrou maior expressão do gene miostatina no músculo branco,
317 sugerindo que ela esteja inibindo a proliferação dos mioblastos. A maior expressão para o
318 gene da miostatina (*Mstn*) acabou inibindo o crescimento hipertrófico das fibras do grupo
319 BVG, em relação ao grupo AVG. Os maiores níveis de miostatina, ao inibirem a proliferação
320 dos mioblastos, podem ter contribuído para o resultado no desempenho desses animais, uma
321 vez que eles tinham peso e comprimento menores comparado ao grupo AVG. Assim, estes
322 resultados sugerem que a miostatina está envolvida na regulação da massa muscular em
323 tilápias do Nilo melhoradas.

324

325 5. Conclusão

326 Os animais de AVG apresentaram maior desempenho como resultado de maior ganho
327 de massa muscular por hipertrofia, como consequência de menor expressão de miostatina em
328 relação ao BVG. Salientando que o presente trabalho é o primeiro estudo com tilápias do Nilo
329 melhoradas e que é de grande interesse futuros estudos relacionados ao crescimento muscular,
330 principalmente em peixes de água doce, de rápido crescimento.

331

332 Referências Bibliográficas

333

334 ALMEIDA, F. L. A. DE et al. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in
335 pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae,
336 Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**. v.39, n.8, p. 1306–1311, 2008.
337 Acesso em Jan. 12, 2021. doi:10.1016/j.micron.2008.02.011.

338 ALMEIDA, F. L. A. DE et al. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD
339 and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**.
340 v.41, n.8, p.997–1004, 2010. Acesso em Jan. 12, 2021. doi.org/10.1016/j.micron.2010.06.012.

341 BUCKINGHAM, M.; RIGBY, P. W. J. Gene Regulatory Networks and Transcriptional
342 Mechanisms that Control Myogenesis. **Developmental Cell**. v.28, n.3, p. 225–238, 2004.
343 Acesso em Jan. 14, 2021. doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020.

344 CARANI, F. R. et al. Morfologia e expressão de genes relacionados ao crescimento do
345 músculo esquelético em juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimatidae, Teleostei). **Acta**
346 **Scientiarum - Animal Sciences**.v.35, n.3, p.219–226, 2013. Acesso em Jan. 10, 2021.
347 doi:10.4025/actascianimsci.v35i3.18219.

348 DAL PAI-SILVA, M. et al. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*):
349 Histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue and Cell**. v.35, n.3, p. 179–
350 187, 2003. Acesso em Jan, 15, 2021. [doi.org/10.1016/S0040-8166\(03\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(03)00019-3).

351 FÜLBER, V. M. et al. Desempenho comparativo de três linhagens de tilápias do nilo
352 *Oreochromis niloticus* em diferentes densidades de estocagem. **Acta Scientiarum - Animal**
353 **Sciences**. v.31, n.2, p.177–182, 2009. Acesso em: Jan, 05, 2021. Doi:
354 10.4025/actascianimsci.v31i2.464.

355 GABILLARD, J. C. et al. Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from
356 fishes. **General and Comparative Endocrinology**. v.194, p.45–54, 2013. Acesso em Nov,
357 18, 2020. doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.012.

358 HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J. M. et al. The myogenic regulatory factors, determinants of
359 muscle development, cell identity and regeneration. **Seminars in Cell and Developmental**
360 **Biology**.v.72, p.10–18, 2017. Acesso em Dez, 10, 2020.
361 doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.010.

- 362 JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **Journal of**
363 **Experimental Biology**. v.209, n.12, p.249–2264, 2006. Acesso em Nov, 20, 2020.
364 doi:10.1242/jeb.02153.
- 365 JOHNSTON, I. A ; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of
366 myotomal muscle mass in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**. v.214, n.10,
367 p.1617–1628, 2011. Acesso em Nov, 21, 2020. doi:10.1242/jeb.038620.
- 368 LANGLEY, B. et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD
369 expression. **Journal of Biological Chemistry**. v.277, n.51, p.49831–49840, 2002. Acesso em
370 Outubro, 25, 2020. doi:10.1074/jbc.m204291200.
- 371 LEE, C. Y. et al. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a
372 double-muscle effect in transgenic zebrafish. **Biochemical and Biophysical Research**
373 **Communications**. v.387, n.4, p.766–771, 2009. Acesso em Nov. 22, 2020.
374 doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.110.
- 375 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-
376 time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**. v.25, n.4, p.402–408, 2001.
377 Acesso em Marc. 15, 2020. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- 378 NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. 2019. Disponível em:
379 <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em Set. 04, 2019.
- 380 NEBO, C. et al. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of
381 muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative**
382 **Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v.164, n.4, p. 268–
383 274, 2013. Acesso em Out. 15, 2020. doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.02.003.
- 384 RESCAN, P. Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower
385 vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular**
386 **Biology**. v.130, n.1, p.1–12, 2001. Acesso em: Dez. 22, 2020. doi:10.1016/s1096-
387 4959(01)00412-2.
- 388 RESENDE, E. K. et al. Melhoramento animal no brasil: uma visão crítica de espécies
389 aquáticas. Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. Palestras. Maringá. **Anais de**
390 **evento SBMA**. 2010, pp.8.
- 391 ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. 5. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle
392 growth in aquaculture species. **Fish Physiology**. v.18, n.C, p.103–140, 2001. Acesso em:
393 Nov. 12, 2020. doi:10.1016/s1546-5098(01)18006-4.
- 394 SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete
395 Samples). **Biometrika**, 1965. v.52, n. 3/4, p.591, 1965. Acesso em Marc. 15, 2020.
396 doi:10.2307/2333709.
- 397 WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in
398 fish. **Journal of Fish Biology**. v.55, n.SUPPL. A, p.1–18, 1999. Acesso em Dez. 09, 2020
399 doi:10.1111/j.1095-8649.1999.tb01042.x.
- 400 WATANABE, W. O. et al. Tilapia Production systems in the Americas: technological
401 advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v.10 n.3-4. pp. 465-498,
402 2002. Acesso em Dez. 10, 2020. doi:10.1080/20026491051758.
- 403 XU, C. et al. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish.
404 **Journal of Experimental Biology**. v.206, n.22, p.4067–4079, 2003. Acesso em Jan. 09,

405 2021. doi:10.1242/jeb.00635.

406 ZHANG, Y. et al. Characterization of muscle-regulatory gene, Myod, from flounder
407 (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis.
408 **Marine Biotechnology**. v.8, n.2, p.139–148, 2006. Acesso em Jan. 09, 2021.
409 doi:10.1007/s10126-005-5042-0.

410

411 **Revista Ciência Rural**

412 **ESCOPO:**

413 **1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade
414 Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à
415 área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

416 **2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados
417 **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos
418 após a 1ª rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor
419 associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados**
420 para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas
421 credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução
422 pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

423 *Empresas credenciadas:*

- 424
425 - American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>)
426 - Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
427 - BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
428 - Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
429 - Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
430 - Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
431 - GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
432 - JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
433 - Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
434 - Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
435 - Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

436 **LIMITE DE PÁGINAS:**

437 Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser
438 digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo,
439 com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e
440 tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica**
441 **e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser
442 disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão
443 ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem**.

444 **Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos**
445 **com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que
446 possuírem páginas **excedentes** terão um custo adicional para a publicação ([vide taxa](#)).

447

448 **ESTRUTURA:**

449 **3. O artigo científico** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título
450 (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de
451 Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão ou resultados/discussão (juntos);

452 Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e
 453 Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética
 454 e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e**
 455 **animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética**
 456 **institucional já na submissão.** Alternativamente, pode ser enviado um dos modelos ao lado
 457 ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

458 **4. A revisão bibliográfica** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título
 459 (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução;
 460 Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses.
 461 Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe
 462 Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa**
 463 **envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de**
 464 **aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser
 465 enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

466 **5. A nota** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e
 467 Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com
 468 Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e Conclusão; podendo conter tabelas ou
 469 figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação;
 470 Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e
 471 Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e**
 472 **animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética**
 473 **institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado
 474 ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

475

476 COVER LETTER:

477 **6.** O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes
 478 informações em inglês, **exceto** para artigos
 479 **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em
 480 inglês).

- 481 a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- 482 b) The question your research answers?
- 483 c) Your major experimental results and overall findings?
- 484 d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- 485 e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

486

487 Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

488 **7.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no
 489 endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

490

491 TÍTULOS:

492 **8.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e
 493 português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser
 494 maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título.
 495 O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem
 496 aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

497 **9.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas
 498 do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os
 499 reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má
 500 formação congênita (MOULTON, 1978).

501 **10.** Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o
 502 EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao

503 escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse [link](#) o **arquivo de estilo** para uso
504 com o software **Mendeley**.
505

506 REFERÊNCIAS:

507 **11.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas
508 próprias da revista.

509 **11.1.** Citação de livro:

510 JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

511 TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros**
512 **herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

513 **11.2.** Capítulo de livro com autoria:

514 GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E.
515 **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

516 **11.3.** Capítulo de livro sem autoria:

517 COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: **Sampling techniques**. 3.ed. New
518 York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90. TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W.

519 Fluidoterapia. In: **Técnicas cirúrgicas em animais de grande**
520 **porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

521 **11.4.** Artigo completo:

522 O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI
523 (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

524 MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of
525 the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor*
526 (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia*
527 *interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam
528 (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)
529 [474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

530 PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes*
531 *ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of
532 diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38,
533 n. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Available from:
534 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)
535 [84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-
536 84782008000800002.

537 SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv.
538 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017 . Available from:
539 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)
540 [84782017000300151&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi:
541 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

542 **11.5.** Resumos:

543 RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de
544 girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa
545 Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p.
546 p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

547 **11.6.** Tese, dissertação:

548 COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos**
549 **(Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/
550 Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade
551 Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

552 **11.7.** Boletim:

553 ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p.
554 (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

555 **11.8.** Informação verbal:
556 Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo:
557 ... são achados descritos por Viêira (1991
558 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço
559 completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi
560 emitida a informação.

561 **11.9.** Documentos eletrônicos:
562 MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do**
563 **tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.:
564 **tentar evitar esse tipo de citação**).

565 GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL
566 VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic.
567 **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from:
568 <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar.
569 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).
570

571 UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available
572 from:
573 <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo
574 **de citação**).

575 ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and
576 conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2,
577 p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available
578 from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

579 MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de
580 úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO
581 LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina.
582 **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de
583 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).
584

585 **DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:**

- 586 **1.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em
587 algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser
588 disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos, as figuras e os gráficos (com largura
589 de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com
590 pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do
591 número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.
- 592 **2.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
- 593 **3.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não
594 tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta
595 prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.
- 596 **4.** Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).
- 597 **5.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
- 598 **6.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma
599 justificativa pelo indeferimento.
- 600 **7.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão
601 Editorial.
- 602 **8.** Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos
603 reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de

604 tramitação novamente. Artigos arquivados por **decorso de prazo** não terão a taxa de
605 tramitação reembolsada.

606 **9.** Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa
607 “Cross Check”.
608

609 **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:**

610 **10. Contribuição dos autores**

611 Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados deveriam ter
612 contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por
613 favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

614 *Exemplo um*

615 RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os
616 experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os
617 experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados
618 experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram
619 criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

620 *Exemplo dois*

621 Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os
622 autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

623 *Exemplo três*

624 Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito
625

626 **ORCID:**

627 **11. O ORCID** (Open Research and Contributors Identification) permite a criação de
628 identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a identificação
629 nacional e internacional do pesquisador e sua produção.
630 Dessa forma **recomendamos** que todos os autores de cada submissão adotem o registro **ORCID** em
631 suas publicações.
632
633



634
635
636 Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais Prédio 42, Sala 3104 97105-900 -
637 Santa Maria, RS, Brasil

638 E-mail: cienciarural@mail.ufsm.br Fone/Fax: (55) 32208698