



BRUNO CHAVES FABRINI

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
(FUCOIDAN) EM DIETAS PARA TILÁPIA DO
NILO NA FASE INICIAL DE CRESCIMENTO**

Lavras - MG

2015

BRUNO CHAVES FABRINI

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS (FUCOIDAN) EM DIETAS PARA
TILÁPIA DO NILO NA FASE INICIAL DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas

Coorientadora

Dr^a. Priscila Vieira e Rosa

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Fabrini, Bruno Chaves.

Polissacarídeos sulfatados (Fucoïdan) em dietas para tilápia do
Nilo na fase inicial de crescimento / Bruno Chaves Fabrini. –

Lavras : UFLA, 2015.

84 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Bibliografia.

1. Piscicultura. 2. Oreochromis niloticus. 3. Desempenho. 4.
Fucoïdan. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

BRUNO CHAVES FABRINI

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS (FUCOIDAN) EM DIETAS PARA
TILÁPIA DO NILO NA FASE INICIAL DE CRESCIMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2015.

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dr^a. Priscila Vieira e Rosa UFLA

Dr^a. Estefânia de Souza Andrade UFLA

Dr. Galileu Crovatto Veras UFPA

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Dr^a. Priscila Vieira e Rosa
Coorientadora

LAVRAS - MG

2015

Aos meus pais,

Júlio Cesar Teixeira Fabrini e Mary Vanda Chaves Fabrini.

Aos meus avós,

Maria Rita Teixeira Fabrini e Rinaldo Fabrini (*in memoriam*)

Moacyr Ferreira Chaves e Verônica do Carmo Chaves.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Principalmente aos meus pais, por acreditarem em mim e ajudar na busca pelos meus sonhos.

À minha família pelo apoio.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade.

Ao professor e orientador Luis David Solis Murgas, por me acolher em seu grupo, pela orientação, dedicação e confiança.

À professora Priscila Vieira e Rosa, pela coorientação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À piscicultura Aquaporto, pela disponibilidade e parceria com a doação dos animais.

Ao meu grande amigo Wesley Fernandes Braga, pelos ensinamentos, ajuda, paciência e companheirismo durante esta jornada.

Aos colegas de equipe do Bioterio Central Da UFLA, pelas sugestões, colaboração e ajuda durante a condução do experimento.

Aos meus grandes amigos de Divinópolis, pela amizade e momentos de descontração, que foram essenciais para enfrentar os momentos mais difíceis.

Ao professor Telaviano Dias, pela amizade e por ter influenciado na minha evolução em me tornar um profissional e uma pessoa melhor através dos conselhos e filosofia do Karate Do.

Aos amigos (as): Angelo Dias, Djony Reis, Edson Costa, Fabrício Rezende, Fábio Loures, João Victor, Lucas Carvalho, Melina Nunes, Josiane Santos e Vitor Maldonado, pela amizade e pelo prazer de tê-los conhecido durante esta minha caminhada pela UFLA.

A todos que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista.

RESUMO

A piscicultura, assim como toda a aquicultura, é a cultura que mais cresce no mundo. Para atender à demanda do mercado os piscicultores têm se preocupado ainda mais em aumentar sua produção com menor custo. Uma das maneiras seria aumentar a taxa de crescimento por meio de um programa de nutrição correto e balanceado. O uso de suplementos alimentares pode auxiliar na expressão da máxima capacidade da espécie, aumentando assim o seu potencial de desenvolvimento muscular por meio da expressão de fatores de regulação miogênicos e inibição de reguladores negativos como a miostatina. Trabalhos *in vitro* comprovaram que os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marrons, usados como suplemento alimentar, seriam capazes de se complexar com a molécula de miostatina, inibindo assim o seu efeito no processo da miogênese. Sendo assim objetivou-se avaliar o desempenho da tilápia do Nilo, em fase inicial de crescimento, com a suplementação de diferentes níveis de polissacarídeo sulfatado (fucoïdan) extraído de alga marrom, aos 30 dias de cultivo. O experimento foi conduzido no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras situado no Departamento de Medicina Veterinária, por um período de 30 dias. Foram utilizadas 216 alevinos de tilápia do Nilo (peso médio inicial = $2,73 \pm 0,19$ g), distribuídos em 12 aquários de 60 litros em um delineamento inteiramente casualizado, totalizando quatro tratamentos e três repetições. Os alevinos foram suplementados com extrato de polissacarídeo sulfatado em pó aos níveis de 0%, 0,5%, 1,0% e 1,5%. Durante o período experimental, foram realizadas duas coletas (inicial e final) para medidas de desempenho zootécnico, histologia de músculo e cromatografia do plasma sanguíneo. Os dados foram submetidos à análise de variância com um nível de significância de 5%, com o auxílio do software R versão 3.0.1. As variáveis de desempenho, frequência de diâmetro de fibra e concentração de fucose não foram significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$). Foi possível identificar a fucose no plasma sanguíneo dos animais, comprovando sua eficácia em quebrar as ligações α -(1-3) do polissacarídeo. A histologia mostrou que houve uma maior porcentagem de crescimento hipertrófico das fibras musculares, já que em todos os tratamentos a classe de diâmetro $>50\mu\text{m}$ prevaleceu ($P < 0,05$). Concluiu-se que o polissacarídeo sulfatado fucoïdan usado em dietas para *Oreochromis niloticus* com 30 dias de cultivo, não foi eficaz em aumentar os parâmetros de desempenho e crescimento muscular.

Palavras-chave: Piscicultura. *Oreochromis niloticus*. Desempenho. Fucoïdan

ABSTRACT

Fish farming, as well as all aquaculture, is the fastest growing culture in the world. To meet the market demand, farmers have become even more concerned about increasing their production at lower cost. One way would increase the growth rate by a proper and balanced nutrition program. The use of dietary supplements may help on the expression of the maximum genetic capacity increasing the specie potential for muscle development by the expression of myogenic regulatory factors and inhibition of myostatin as a negative regulator. Recently, *in vitro* studies have shown that sulphated polysaccharides extracted from brown algae (fucoïdan), used as food supplement, would be capable to complex with myostatin molecule inhibiting its effect on the process of myogenesis. The objective of this study was to evaluate the Nile tilapia performance, in early stages of growth, using different levels of sulfated polysaccharide (fucoïdan) extracted from brown seaweed, after 30 days of cultivation. A 30-days feeding trial was conducted with diets containing 0%, 0.5%, 1.0% and 1.5% of Fucoïdan powder extract at the Biotério Central da Universidade Federal de Lavras located in the Medicine Veterinary Department. It was used 216 Nile tilapia fingerlings allocated in 12 aquariums with 60 liters capacity in completely randomized design. It was analyzed fish performance measures, muscle histology and blood plasma chromatography at the beginning and end of the experiment. The data were submitted to a variance analysis with a 5% significance level using the 3.0.1 R software. The performance, fiber diameter and plasma fucose concentration were not significant ($P > 0.05$) among the treatments. It was possible to identify the fucose in the animals' blood plasma, proving their effectiveness in breaking the α - (1-3) polysaccharide chain. Histology showed that there was a higher hypertrophic muscle growth in all treatments, since that the $>50\mu\text{m}$ diameter class prevailed. It was concluded that the sulfated polysaccharide Fucoïdan used in *Oreochromis niloticus* cultivation diets for 30 days was not effective in the performance and muscle growth increase.

Keywords: Fish farming. *Oreochromis niloticus*. Performance. Fucoïdan.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Organização anatômica da musculatura estriada esquelética. Desenho esquemático demonstrando a região da musculatura lateral (A), Formato de um miômero de peixe teleósteo (B) e Visualização em esquema real (C).....21
- Figura 2 Corte transversal da musculatura de peixe demonstrando 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).....22
- Figura 3 (A) Corte transversal da musculatura branca dorsal de alevino de Zebrafish (*Danio rerio*). F: Fibras musculares. M: Mionúcleos periféricos. E: Endomísio HE. (B) Corte longitudinal demonstrando a presença de mionúcleos periféricos (setas) e estriações (bandas claras e escuras) do músculo estriado esquelético de *Gnathonemus petersii* ...23
- Figura 4 (A) Corte transversal da musculatura estriada esquelética de *Danio rerio* demonstrando os compartimentos musculares vermelho (v), intermediário (i) e branco (b). (B) Corte transversal da musculatura estriada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), demonstrando a musculatura distribuída em compartimentos vermelhos (v), intermediários (i) e brancos (b)24
- Figura 5 Origem embrionária dos músculos do tronco e dos membros dos vertebrados26
- Figura 6 Miogênese no embrião de zebrafish (*Danio rerio*). (A) Embrião com 21 somitos, (B) células adaxiais, (CA) adjacentes à notocorda (N), (C) corte transversal do embrião ilustrado em (B). MF: mioblastos rápidos e (D) Células adaxiais alongam-se e migram em direção à superfície do miótomo. (E) Células adaxiais formando o compartimento de músculo vermelho (V). Células pioneiras (CP) mantêm-se conectadas à notocorda, na região do futuro miossepto horizontal (MH). As demais células do miótomo (MF) se diferenciam em fibras musculares brancas (B). (F) Final da miogênese, mostrando uma monocamada

superficial de fibras vermelhas (V) circundando uma grande quantidade de fibras brancas (B)	27
Figura 7 Esquema demonstrativo dos principais eventos que ocorrem durante a embriogênese do músculo estriado esquelético	28
Figura 8 Esquema demonstrando a localização das células satélites, entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular	29
Figura 9 Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia. A população de Células Satélites contribui para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético	30
Figura 10 Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular. A proliferação de células satélites é influenciada pela ação da miostatina inibindo os MRFs, conseqüentemente inibindo o crescimento. Durante a maturação da fibra muscular (hipertrofia) ocorre a ação dos IGF – I e II	31
Figura 11 Processamento da miostatina. O precursor da miostatina passa por dois eventos preteolíticos; um remove a sequência sinalizadora N-terminal, uma segunda gera o fragmento C-terminal, que possui função de ligação ao receptor (a). Seguindo o processamento proteolítico, o pró-peptídeo (azul) e o C-terminal ligado por dissulfureto (amarelo) permanecem ligados de forma não covalente em um complexo latente (b). A ativação da miostatina latente pode ocorrer por clivagem proteolítica do pró-peptídeo (b, c) por membros da família de metaloproteinases de BMP-1/tolloid, o que provoca a dissociação do complexo latente (d)	34
Figura 12 Representação esquemática simplificada das principais proteínas envolvidas na via de sinalização da Miostatina demonstrando seu papel	36
Figura 13 Modelo para o papel da miostatina no crescimento muscular. A) Diferenciação das células precursoras em mioblastos por ação dos fatores Myf-5 e MyoD. Em resposta à sinalização da miostatina, a p21	

é estimulada inibindo a atividade da ciclina –E – Cdk2. A Rb é hipofosforilada resultando na paralização da G1. Assim, o número de mioblastos e, conseqüentemente, o número de fibras seguintes, são regulados (limitados). B) Na ausência de miostatina funcional, o sinal para extimular a proteína p21 é perdido e o Rb permanece numa forma hiperfosforilada, o que resulta em proliferação de mioblastos, o que leva a um aumento no número de fibras.....38

Figura 14 Cladograma representando a organização dos eucariotos. Os seis reinos (Opisthokonta, Amoebozoa, Plantae, Chromalveolata, Rhizaria e Excavata) estão representados por diferentes cores e separados por semicircunferências da mesma cor. Os ramos menores do cladograma representam os filios que constituem os reinos. O filo Stramenopiles que abrange as algas marinhas marrons está destacado por um retângulo tracejado vermelho.....42

Figura 15 Estruturas químicas das unidades oligossacarídicas repetitivas das α -L-fucanassulfatadas da parede do corpo do pepino-do-mar (A) e dos envoltórios gelatinosos que recobrem os óvulos dos ouriços-do-mar (B-G). As estruturas espécie-específicas variam no padrão de sulfatação (mas, exclusivamente nas posições 2-O- e/ou 4-O-), nas ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow3)$ (A-C, E e G) ou $\alpha(1\rightarrow4)$ (D e F) e no número de resíduos contidos nas unidades repetitivas: tetrassacarídeos (A-D), trissacarídeos (E-II) e monossacarídeos (E-I, F e G), mas todos compostos lineares. Os quatro tipos de unidades anoméricas das fucanas de *L. variegatus* (B) e *S. pallidus* (C) estão identificados pelas letras A D para correspondente assinalamento nos espectros de 1H-RMN.....45

Figura 16 Modelo de Patankar et al. (1993) para a estrutura principal do Fucoïdan.....50

Figura 17 Avaliação morfométrica de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo: comprimento padrão (CP, azul); comprimento da cabeça (CC, amarelo); altura do corpo (AC, vermelho); comprimento total (CT, azul + azul tracejado)55

- Figura 18 Cromatograma de ion extraído para a fucose ($m/z = 163,05$) de plasma sanguíneo de *Oreochromis niloticus* suplementadas com extrato de fucoïdan em pó durante 30 dias de cultivo. Exemplo dos aquários 1, 2 e 3 (Coleta final).....61
- Figura 19 Seções transversais do músculo branco de *Oreochromis niloticus* cultivadas em diferentes níveis de Fucoïdan (T1= 0, T2= 0,5, T3= 1,0 e T4= 1,5%), aos 30 dias. Fibra muscular (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento: 20x. Barra: 100 μm 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Nomenclatura comum e científica das principais espécies de importância comercial.....	19
Tabela 2	Açúcares constituintes dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas marrons	44
Tabela 3	Algumas atividades farmacológicas atribuídas a fucanas e fucoidans.	47
Tabela 4	Composição das dietas com os níveis de fucoidan	53
Tabela 5	Valores médios das variáveis de desempenho de <i>Oreochromis niloticus</i> suplementadas com extrato em pó de fucoidan durante 30 dias de cultivo.....	59
Tabela 6	Valores médios das medidas morfométricas de <i>Oreochromis niloticus</i> suplementadas com extrato em pó de fucoidan durante 30 dias de cultivo.....	60
Tabela 7	Distribuição de frequência (%) de diâmetro de fibra muscular branca em classes: < 20 µm, 20-50 µm e > 50 µm de <i>Oreochromis niloticus</i> suplementadas com extrato em pó de fucoidan durante 30 dias de cultivo.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Tilápia do Nilo – <i>Oreochromis niloticus</i>	18
2.2	Tecido muscular em peixes teleósteos	20
2.3	Miogênese em peixes teleósteos.....	25
2.4	Controle da miogênese	31
2.4.1	Miostatina.....	32
2.5	Polissacarídeos sulfatados	39
2.5.1	Polissacarídeos sulfatados de algas marrons	41
2.5.2	Fucoidan	48
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1	Local e tempo experimental	52
3.2	Delineamento experimental.....	52
3.3	Extrato de fucoidan	52
3.4	Dietas experimentais	52
3.5	Material biológico e condição experimental	53
3.6	Variáveis analisadas	54
3.7	Análises estatísticas.....	58
4	RESULTADOS	59
5	DISCUSSÃO.....	64
6	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A produção aquícola vem aumentando significativamente e se apresenta como importante fator de impacto para a economia mundial dentro da atividade agropecuária. Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2011), a produção mundial de pescado (proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura) atingiu aproximadamente 168 milhões de toneladas em 2010, representando um crescimento de 3% em relação a 2009. A china em 2010 produziu 63 milhões de toneladas, sendo o maior produtor de pescado neste ano.

A piscicultura é responsável por 52% do total da produção aquícola e está entre as atividades mais importantes dentro do cenário econômico produzido pela aquicultura. É uma atividade que visa ao cultivo racional de peixes, com planejamento adequado para uma boa produção, e que apresenta grande relevância social e econômica para a ampliação da produção de alimentos, podendo também contribuir com a conservação da diversidade biológica de ambientes naturais.

Dentro da cadeia produtiva de peixes, o aprimoramento de algumas características produtivas, como o crescimento específico, é essencial para o sucesso da atividade. Do ponto de vista econômico, essa característica se destaca como a principal, já que está intrinsecamente ligada à produtividade e à rentabilidade da produção. O aperfeiçoamento e sinergismo das técnicas de melhoramento genético, reprodução e nutrição permitem ao produtor obter um animal maior em menor tempo, evitando assim gastos excessivos com a manutenção desses animais dentro da propriedade.

O crescimento estrutural em teleósteos é mediado por um conjunto de fatores de regulação miogênica (MRF) produzidos nos tecidos musculares. A miostatina, também conhecida como Fator 8 de Crescimento e Diferenciação (GDF - 8), é um membro do fator de crescimento e transformação da família beta (TGF - β) e atua como um regulador negativo do crescimento muscular

esquelético. A sua importância na regulação do crescimento foi inicialmente ilustrada em ratos, em que as mutações no *locus* da miostatina resultaram em aumento de até 30 % do crescimento dos animais.

A grande parte das pesquisas buscando a inativação dessa proteína para fins de aumento em hipertrofia e hiperplasia foram focadas a nível de manipulação genética e trabalho *in vitro*. No entanto, pode ser possível reduzir os seus efeitos inibidores por meio da modificação química existente entre as proteínas celulares, ou da competição pelos locais de ligação celular, utilizando compostos naturais, como por exemplo, polissacarídeos sulfatados extraídos de organismos marinhos.

O fucoidan, um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marrons, tem despertado interesse científico devido às suas diversas funcionalidades biomédicas. Esse composto, por muitos anos, foi considerado apenas como uma potencial fonte de L-fucose e por sua atividade anticoagulante. No entanto, estudos em vertebrados terrestres demonstraram que o fucoidan atua no processo inflamatório, proliferação celular e adesão, infecção viral, fertilização e, mais recentemente, regulação do crescimento muscular. Este último efeito foi comprovado, inicialmente, em 2003 por Ramazanov através de pesquisa *in vitro* com células de humanos e se deve ao fato desse polissacarídeo se complexar com a miostatina, inibindo sua ação. Embora seus efeitos biológicos sobre vertebrados terrestres sejam frequentemente pesquisados, seus efeitos sobre as espécies de peixes ósseos ainda são poucos conhecidos.

Apesar da consolidada adaptação de algumas espécies de peixes, como a tilápia do Nilo, ao Brasil e da existência de pacotes tecnológicos avançados e bem estabelecidos para o seu cultivo, piscicultores ainda buscam alternativas e novas tecnologias para aumentarem sua produtividade a fim de atender à demanda do mercado. Esse aumento na produtividade requer a utilização de

programas eficazes de melhoramento genético, técnicas de manejo, reprodução e nutrição necessária para expressar todo o potencial dos animais.

A nutrição adequada é essencial dentro de um sistema de produção já que os gastos com alimentação chegam a atingir 70% do custo total de produção, além de ser um limitante para o crescimento dos animais. Dentro desse panorama, qualquer técnica que melhore as taxas de sobrevivência e crescimento a um custo acessível e de forma prática é vantajosa. Dessa forma, o intuito de obter melhoras na eficiência alimentar e na produtividade com uso de suplementos em rações para peixes tem sido crescente nos últimos anos.

Sendo assim, com este trabalho objetivou-se avaliar o desempenho da tilápia do Nilo, em fase inicial de crescimento, com a suplementação de diferentes níveis de polissacarídeo sulfatado (Fucoïdan) extraído de alga marrom, aos 30 dias de cultivo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tilápia do Nilo – *Oreochromis niloticus*

A tilápia é um peixe teleósteo, da ordem dos Perciformes pertencente à família dos ciclídeos, originário da África e amplamente cultivado em cerca de 100 países (ROMANA-EGUÍA et al., 2004). Cerca de 22 espécies de tilápia são cultivadas pelo mundo, porém a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia mossâmbica (*O. mossambicus*), a tilápia azul (*O. aureus*), além de *O. macrochir*, *O. hornorum*, *O. galilaeus*, *Tilapia zillii* e a *T. rendalli* são as espécies mais criadas comercialmente (EL-SAYED, 2006) (Tabela 1).

Entre essas espécies, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca por ser a espécie mais cultivada não só no Brasil como também no mundo. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) a tilápia e o tambaqui foram as espécies mais cultivadas, as quais somadas representaram 67,0% da produção nacional de pescado dessa modalidade.

Tabela 1 Nomenclatura comum e científica das principais espécies de importância comercial

Adaptado de <http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/27>

Nomenclatura comum	Nomenclatura científica
Tilápia do Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>
Tilápia azul	<i>Oreochromis aureus</i>
Tilápia de Java	<i>Oreochromis mossambicus</i>
Tilápia de Mossambique	<i>Oreochromis mossambicus</i>
Tilápia de Zanzibar	<i>Oreochromis u. hornorum</i>
Tilápia vermelha	<i>Oreochromis spp (1)</i>
Tilápia branca ou pérola	<i>Oreochromis spp (2)</i>
Tilápia da Galiléia	<i>Sarotherodon galilaeus</i>
Tilápia preta chinesa	<i>Sarotherodon melanotheron</i>
	<i>Oreochromis esculenta</i>
	<i>Oreochromis macrochir</i>
Tilápia do Congo	<i>Tilapia rendalli</i>
	<i>Oreochromis andersonii</i>
	<i>Oreochromis spilurus</i>

(1) Desenvolvida a partir de estoque da *O. mossambicus* e/ou *O. hornorum* (para a cor vermelha) e freqüentemente cruzada com *O. niloticus* e/ou *O. aureus* para estimular mais crescimento e outras características para a aqüicultura. (2) Desenvolvida a partir de cruzamentos de *O. niloticus* e *O. aureus*.

Várias são as vantagens que tornam as tilápias um grupo de peixes mundialmente cultivado. Possuem boas características organolépticas, tais como carne saborosa, baixo teor de gordura, ausência de espinhas intramusculares em forma de “Y” (miosseptos), considerável rendimento de filé de, aproximadamente, 35% a 40% e ausência de odor desagradável, tornando-a propícia para a preferência do consumidor e indústria de processamento (HILSDORF, 1995; SOUZA, 2002). Além disso, elas possuem características importantes para o sistema de cultivo, como hábito alimentar onívoro e planctófago, aceitando uma ampla variedade de alimentos, e apresentam

resposta positiva tanto à fertilização dos viveiros quanto ao fornecimento exclusivo de rações, em sistemas intensivos de cultivo. São resistentes a doenças, ao superpovoamento e a baixos níveis de oxigênio dissolvido, embora não apresentem bons índices produtivos nessas condições (HILSDORF, 1995; SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2008).

A alta versatilidade da espécie para a piscicultura, adaptando-se tanto ao cultivo sem qualquer tecnologia empregada, quanto ao sistema de criação com rações balanceadas e tecnologia de produção avançada, aliada às condições favoráveis, reflete no ganho positivo da principal característica produtiva, a taxa de crescimento específico (KUBTIZA, 2000).

2.2 Tecido muscular em peixes teleósteos

O tecido muscular é um dos quatro tecidos básicos responsáveis pelos movimentos corporais. É composto por células alongadas, denominadas células musculares, miofibras ou fibras musculares, que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos altamente organizados e são responsáveis pela contração muscular. Esse tecido pode ser classificado em: liso, estriado esquelético e estriado cardíaco, conforme sua morfologia e função (ONOFRE-OLIVEIRA, 2009).

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

Nos peixes teleósteos a musculatura estriada esquelética compreende uma grande parte da massa corporal (cerca de 60% da massa total do corpo).

Nesses organismos, os músculos axiais, responsáveis por flexionar a coluna vertebral e a região caudal de um lado para o outro, estão organizados em unidades morfofuncionais, os miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal separados por bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos, onde estão inseridas as fibras musculares (Figura 1) (ALEXANDER, 1969).

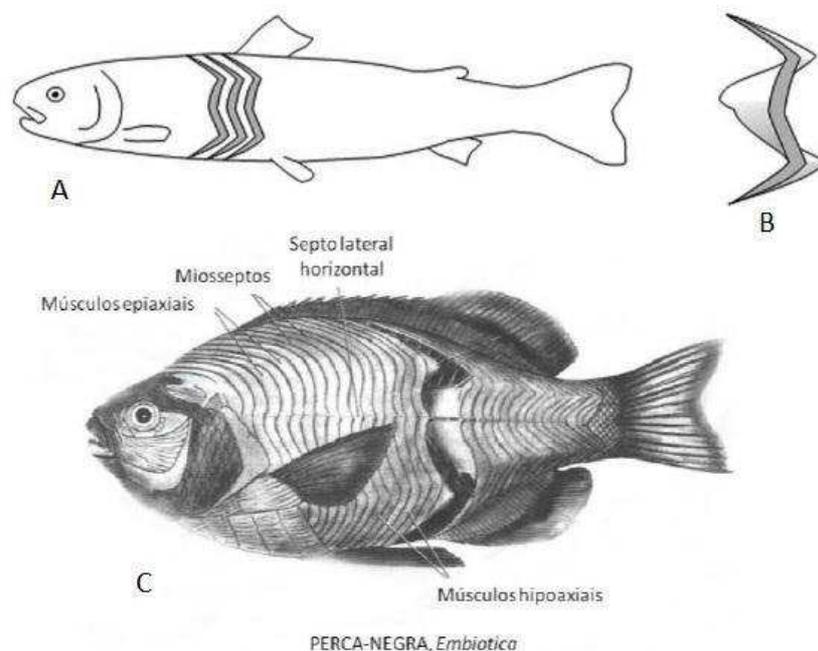


Figura 1 Organização anatômica da musculatura estriada esquelética. Desenho esquemático demonstrando a região da musculatura lateral (A), Formato de um miômero de peixe teleósteo (B) e Visualização em esquema real (C)
 Fonte: Adaptado de Altringham e Ellerby (1999a, 1999b) e Johnston (2001)

Os músculos axiais estão divididos em porção epaxial (dorsal) e hipoaxial (ventral) por meio do septo lateral ou transverso (horizontal), localizado na região do nervo da linha lateral (ALEXANDER, 1969; VIDELER,

2011). Além disso, a coluna vertebral é flexível e suporta um septo medial que divide o corpo em antímeros direito e esquerdo (Figura 2) (VIDELER, 2011).

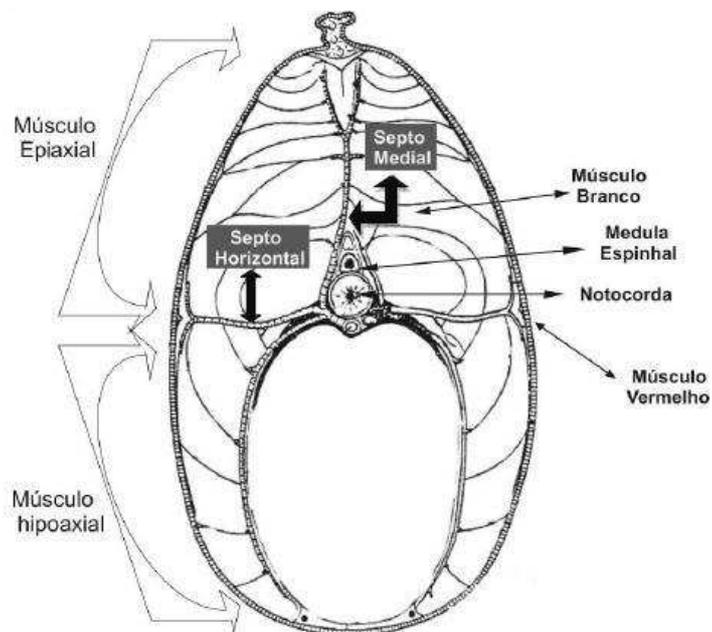


Figura 2 Corte transversal da musculatura de peixe demonstrando a organização anatômica da musculatura estriada. Observa-se o septo horizontal separando a musculatura epiaxial da hipoaxial, o septo medial separando a musculatura em dois antímeros (direito e esquerdo), Músculo vermelho (superficial) e branco (profundo)

Fonte: Adaptado de Mareco (2012) e Videler (2011)

A relevante porcentagem de músculo estriado esquelético nos peixes não é apenas uma adaptação mecânica, específica para a vida aquática, mas serve também como uma importante fonte de proteínas a ser utilizada na alimentação humana (WEATHERLEY; GILL, 1985).

Esse tecido é formado por um conjunto de fibras musculares altamente especializadas alongadas e multinucleadas, com núcleos periféricos, localizados abaixo da membrana plasmática. O sarcoplasma das fibras é constituído em sua

totalidade por miofibrilas, que apresentam estriações transversais, decorrentes da organização das proteínas e filamentos contráteis (actina e miosina) em unidades de contração, denominadas sarcômeros (Figura 3).

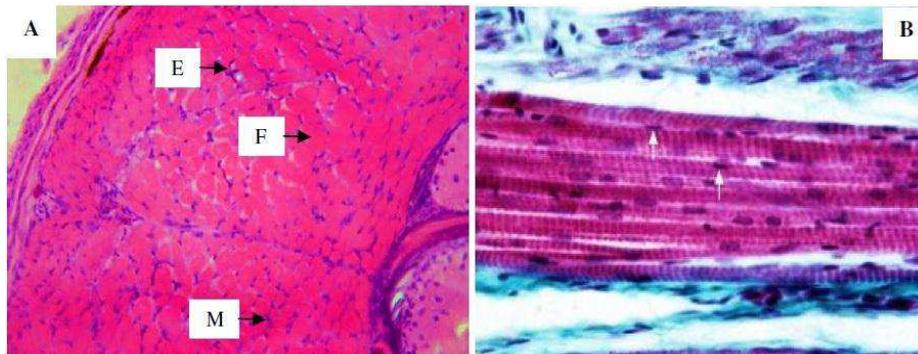


Figura 3 (A) Corte transversal da musculatura branca dorsal de alevino de Zebrafish (*Danio rerio*). F: Fibras musculares. M: Mionúcleos periféricos. E: Endomísio HE. Adaptado de Figueiredo et al. (2011). (B) Corte longitudinal demonstrando a presença de mionúcleos periféricos (setas) e estriações (bandas claras e escuras) do músculo estriado esquelético de *Gnathonemus petersii*

Fonte: Adaptado de Franck, Eddy e André (2009)

Os músculos natatórios de todos os grupos de peixes são altamente especializados para atender à demanda de força que é necessária, tanto durante o movimento de sustentação quanto durante movimentos rápidos. Sendo assim, o sistema locomotor desses animais é dividido em vários compartimentos ou camadas contendo fibras musculares distintas (SÄNGER; STOIBER, 2001).

Assim como nos demais vertebrados, existem três tipos básicos de fibras musculares em peixes, as vermelhas, as brancas e as intermediárias (JOHNSTON, 1981), sendo que nos músculos axiais (que flexionam a coluna vertebral e a cauda de um lado para o outro durante a natação) consistem principalmente fibras brancas-rápidas, cobertas por uma fina camada de fibras musculares vermelhas-lentas, e de uma camada de fibras rosa, ou intermediárias, entre elas (Figura 4) (SANTOS, 2007). Essa organização pode variar de acordo

com a espécie e a fase de crescimento (ALEXANDER, 1969; WEATHERLEY; GILL, 1987).

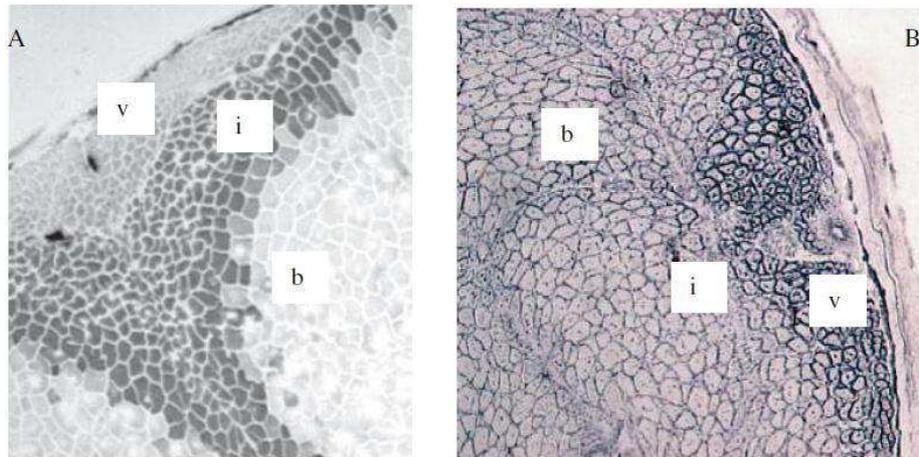


Figura 4 (A) Corte transversal da musculatura estriada esquelética de *Danio rerio*, demonstrando os compartimentos musculares vermelho (v), intermediário (i) e branco (b). (B) Corte transversal da musculatura estriada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), demonstrando a musculatura distribuída em compartimentos vermelhos (v), intermediários (i) e brancos (b).

Fonte: Adaptado de Aguiar et al. (2005) e Biga e Goetz (2006)

A cor do músculo, em parte, indica o grau de vascularização de cada tipo de fibra. As fibras musculares vermelhas (metabolismo oxidativo) normalmente são menores, apresentam alta concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídios e excelente suprimento sanguíneo, sendo utilizada na realização de movimentos lentos e de sustentação, como a natação durante a migração (DRIEDZIC; HOCHACHKA, 1976; JOHNSTON, 1980, 1999; SANTOS, 2007). Essa musculatura é encontrada na região superficial, abaixo da derme, em maior proporção na região da cauda e próxima à região da linha lateral e correspondem de 5 a 15% em relação a toda a musculatura miotomal.

As fibras musculares brancas (metabolismo glicolítico) são maiores, apresentam baixa concentração de mioglobina, poucas mitocôndrias e lipídios

(SÄNGER; CLAASSEN; ADAM, 1990; SÄNGER, 1992; SANTOS, 2007). Essa musculatura corresponde aproximadamente 70 % do volume total do tecido muscular (SÄNGER et al., 2001), sendo que essa proporção varia ao longo do comprimento do peixe, encontrada em maior quantidade na região anterior do animal e um com grande declínio em direção à região caudal (ZHANG; SWANK; ROME, 1996).

Entre as fibras vermelhas e brancas, encontra-se as fibras intermediárias que apresentam propriedades morfofisiológicas intermediárias em relação às das brancas e vermelhas e apresentam contração rápida com metabolismo oxidativo/glicolítico (SÄNGER et al., 2001).

2.3 Miogênese em peixes teleósteos

A miogênese pode ser definida como o processo de diferenciação das células precursoras musculares (mioblastos) em células do músculo esquelético resultando na ativação coordenada de múltiplos mecanismos de sinalização (ENGEL; FRANZINI-ARMSTRONG, 1994). Esse processo ocorre nas fases iniciais da embriogênese e tem a finalidade de formação, crescimento, manutenção e reparo das fibras musculares (PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003).

Nessas fases iniciais, o desenvolvimento dos peixes teleósteos é influenciado por fatores maternos depositados no ovócito durante a ovogênese (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). Após a fertilização os ovócitos tornam-se ativos, iniciando uma cascata de eventos necessários para o desenvolvimento do indivíduo através da tradução de RNAs maternos e a ativação de proteínas maternas presentes no ovócito, os quais são posteriormente degradados (PELEGRI, 2004).

O desenvolvimento muscular ocorre de modo similar na maioria dos peixes e segue um padrão de desenvolvimento semelhante ao de outros vertebrados. Durante o processo de formação muscular ocorre a especificação do

mesoderma paraxial, definindo um modelo para o desenvolvimento muscular (ZHANG; BHATTACHARYA; LI, 2009). Nesse período, ocorrem a formação dos somitos, estruturas epiteliais transitórias que se formam nas primeiras etapas do desenvolvimento.

Cada somito é formado por uma porção ventral, o esclerótomo, que dará origem a estruturas esqueléticas, e uma dorsal, o dermomiótomo, que formará a derme e a musculatura do tronco e da cauda (CURRIE; INGHAM, 2001) (Figura 5). Posteriormente, o dermomiótomo se divide em dermatomo e miótomo (WOLPERT et al., 2000).

Nos peixes, o esclerótomo é altamente reduzido, pois, no ambiente aquático, o animal apresenta maior facilidade em sustentar o peso do corpo, diminuindo a necessidade de formação de estruturas esqueléticas. Dessa forma, a maior parte do somito é constituída pelo miótomo (BONE, 1966).

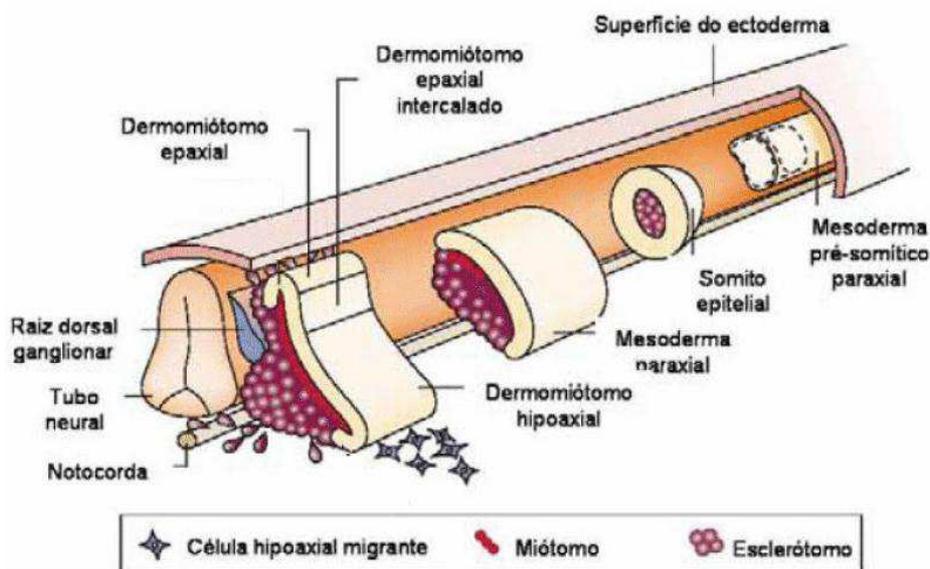


Figura 5 Origem embrionária dos músculos do tronco e dos membros dos vertebrados
 Fonte: Adaptado de Parker, Seale e Rudnicki (2003)

A especificação de células progenitoras musculares no somito depende de sinais indutivos dos tecidos adjacentes, como o tubo neural, a notocorda e o ectoderma dorsal e lateral. Essas células se diferenciam das demais pela morfologia e padrão de expressão gênica, sendo denominadas células adaxiais, precursoras das células musculares ou mioblastos lentos. Sob o estímulo de glicoproteínas secretadas pela notocorda e pelo tubo neural (BLAGDEN et al., 1997), essas células sofrem alongamento e migram em direção à superfície do miótomo (Figura 6) (CURRIE; INGHAM, 2001; JOHNSTON, 2004).

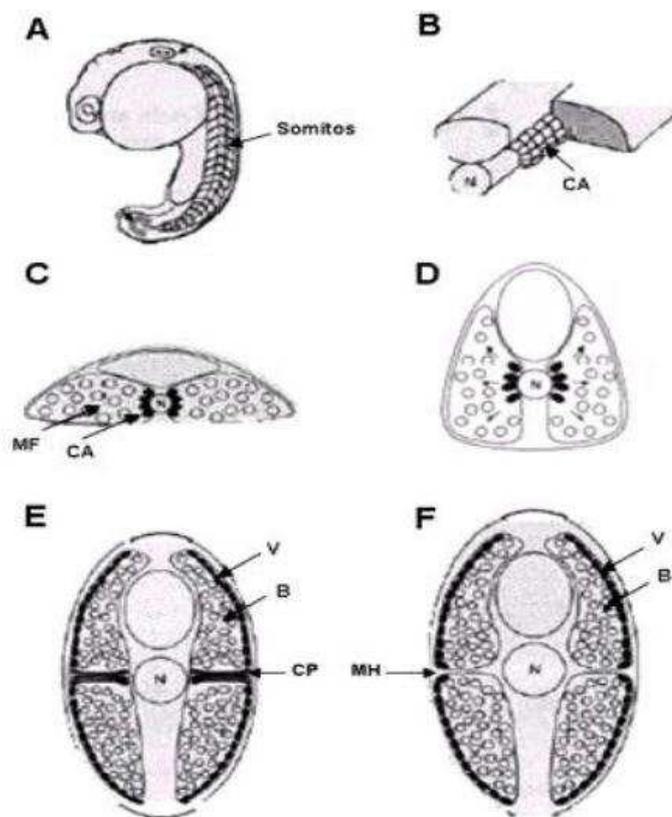


Figura 6 Miogênese no embrião de zebrafish (*Danio rerio*). (A) Embrião com 21 somitos, (B) células adaxiais, (CA) adjacentes à notocorda (N), (C) corte

transversal do embrião ilustrado em (B). MF: mioblastos rápidos e (D) Células adaxiais alongam-se e migram em direção à superfície do miótomo. (E) Células adaxiais formando o compartimento de músculo vermelho (V). Células pioneiras (CP) mantêm-se conectadas à notocorda, na região do futuro miossepto horizontal (MH). As demais células do miótomo (MF) se diferenciam em fibras musculares brancas (B). (F) Final da miogênese, mostrando uma monocamada superficial de fibras vermelhas (V) circundando uma grande quantidade de fibras brancas (B)

Fonte: Adaptado de Johnston (2004)

Após a migração, as células adaxiais (mioblastos lentos) fundem-se umas às outras dando origem aos miotubos que se diferenciam em fibras musculares vermelhas. Uma subpopulação de células se mantém conectada à notocorda onde, além de dividir o miótomo nas regiões ventral (hipoaxial) e dorsal (epaxial) dando origem ao miossepto horizontal, vão orientar a migração das demais células adaxiais em direção à superfície do miótomo. A união dos mioblastos rápidos também acontece originando os miotubos multinucleados onde os núcleos estão localizados na região central (Figura 7) (RESCAN, 2001).

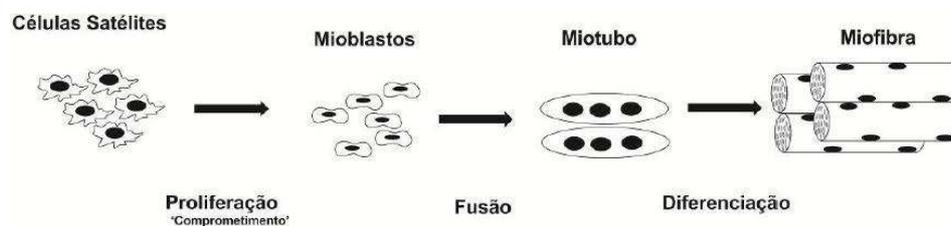


Figura 7 Esquema demonstrativo dos principais eventos que ocorrem durante a embriogênese do músculo estriado esquelético

Fonte: Adaptado de Watabe (1999)

O crescimento muscular pós-embrionário na maioria dos peixes ocorre através da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites. Essas células são derivadas do processo de desenvolvimento embrionário, que permaneceram como células indiferenciadas no músculo. Elas possuem a capacidade de se proliferar, e também têm o potencial de se diferenciar e se

fundir com as fibras musculares existentes, sendo denominadas de células satélites ou mioblastos adultos (VASYUTINA; LENHARD; BIRCHMEIER, 2007). Elas podem ser vistas na periferia das fibras musculares sob a lâmina basal, separada das fibras musculares pela membrana celular, e constituem a principal fonte celular para a regeneração e para o processo de crescimento muscular pós-natal (BUCKINGHAM, 2007; JOHNSTON et al., 2000; MAURO, 1961) (Figura 8).

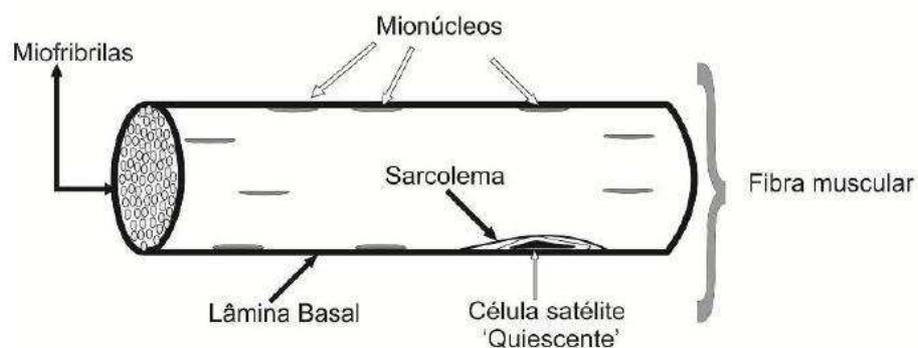


Figura 8 Esquema demonstrando a localização das células satélites, entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular
Fonte: Mareco (2012), adaptado de Mauro (1961)

As células permanecem relativamente indiferenciadas (SNOW, 1986), mas quando ativadas, passam a expressar vários hormônios e fatores de crescimento entre eles, os fatores reguladores miogênicos MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005) que utilizam diversas vias de sinalização, controlando a proliferação e a diferenciação celular (MARECO, 2012).

Após o período embrionário, algumas espécies de peixes apresentam um crescimento contínuo ao longo da vida. Nesses animais o crescimento muscular ocorre através de dois processos: hiperplasia e hipertrofia, os quais contribuem

por todo o período de crescimento pós-embriônico da musculatura estriada (GREER-WALTER; PULL, 1970; MARECO, 2012).

A hipertrofia consiste no aumento do diâmetro ou área da fibra muscular. Nesse processo, comum aos mamíferos e peixes pós-período embrionário, as células mio-satélites fundem-se com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos e a síntese de miofibrilas. Diferente da hipertrofia, a hiperplasia consiste no aumento do número de fibras musculares, devido à formação de novas fibras. Nesse processo acontece a fusão das células satélites ativadas, que resultam na formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em fibras musculares (Figura 9) (STELLABOTTE; DEVOTO, 2007).

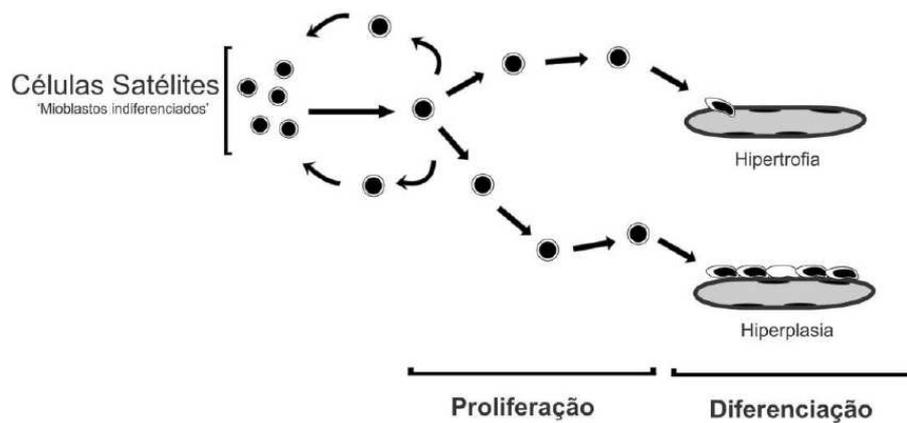


Figura 9 Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de crescimento muscular pós-natal nos peixes: hipertrofia e hiperplasia. A população de Células Satélites contribui para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético
Fonte: Adaptado de Johnston (1999)

O balanço entre os crescimentos hipertrófico e hiperplásico irá determinar a taxa de crescimento e o tamanho final da espécie. Contudo, esse processo é dependente de vários fatores como, temperatura, fotoperíodo, regime alimentar e composição da dieta, tipo de músculo, espécie e fase de crescimento

(AGUIAR et al., 2005; ASSIS et al., 2004; DAL PAI-SILVA et al., 2003a, 2003b; JOHNSTON, 2001).

2.4 Controle da miogênese

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

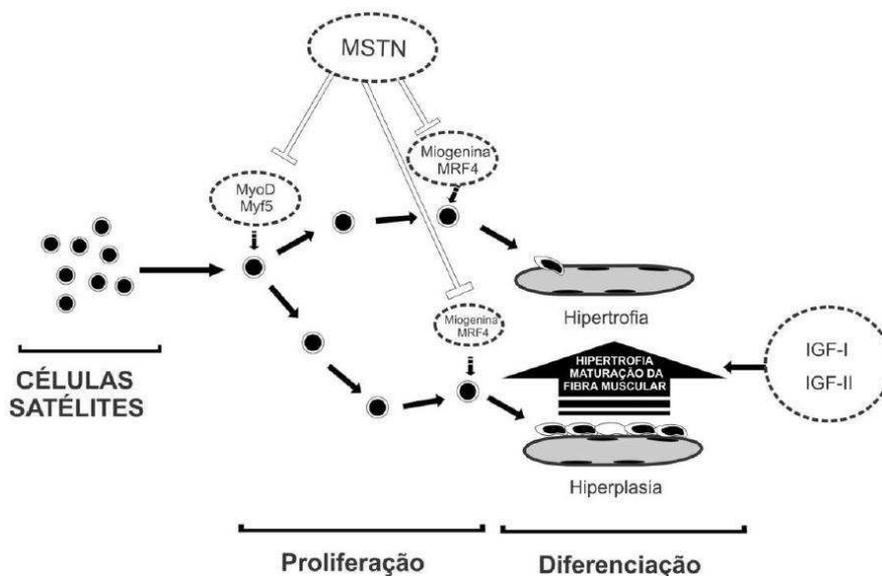


Figura 10 Esquema demonstrativo dos principais mecanismos de regulação do crescimento muscular. A proliferação de células satélites é influenciada pela ação da miostatina inibindo os MRFs, conseqüentemente inibindo o crescimento. Durante a maturação da fibra muscular (hipertrofia) ocorre a ação dos IGF – I e II

Fonte: Adaptado de Johnston (2006)

Em resposta aos sinais de diferenciação, a miogenina (gene, membro da família myoD) e o fator regulatório muscular (também pertencentes à família bHLH, ou hélice-alça-hélice) executam um sistema de diferenciação que leva à expressão de proteínas específicas do tecido muscular e à fusão dos miócitos (células contráteis maduras que formam um dos três tipos de músculo) em miotubos multinucleados (componente da fibra muscular e da lâmina basal) (KARP, 2005).

Durante o crescimento muscular, mais células devem ser constantemente geradas para manter o mesmo ritmo de acordo com o crescimento embrionário, a fim de que o crescimento muscular resulte de um equilíbrio entre a proliferação das células precursoras e a sua subsequente diferenciação em fibras musculares. Esse processo é regulado *in vivo* através de mecanismos que envolvem interações entre célula-célula e célula-matriz, assim como fatores extracelulares secretados.

Entre os últimos, diversos membros dos fatores de transformação do crescimento, TGF- β (superfamília de fatores de crescimento e transformação) mostraram-se potentes reguladores do crescimento muscular (MCPHERRON; LEE; LAWLER, 1997). O GDF-8 é um gene dessa superfamília sendo responsável pela codificação de uma proteína que controla negativamente (promoção do catabolismo) a manutenção da massa muscular esquelética, denominada Miostatina (MCPHERRON; LEE; LAWLER, 1997; ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MEN - OMIM, 2009).

2.4.1 Miostatina

A miostatina, também conhecida como GDF-8 (Fator 8 de Crescimento e Diferenciação ou Growth and Differentiation Factor-8), é um membro da superfamília dos fatores de crescimento TGF- β (Fator β de Crescimento e Transformação ou Transforming Growth Factor- β) e está envolvida com a regulação do crescimento do músculo estriado esquelético nos vertebrados

(MCPHERRON; LEE; LAWLER, 1997). Sua principal função é regular negativamente o crescimento muscular, controlando a formação de novas fibras musculares e inibindo a hipertrofia das fibras existentes, através da diminuição da expressão dos MRFs (LANGLEY et al., 2002; LEE et al., 2009).

O papel de inibidor do crescimento muscular exercido pela Miostatina foi comprovado somente no final da década de 90, quando foi demonstrado que mutações no gene que codifica essa proteína eram capazes de promover um ganho significativo de massa muscular em bovinos, o que também foi observado em cães da raça Whippet (SHELTON; ENGVALL, 2007; SUTTER et al., 2007).

Estudos mostram que a expressão da Miostatina é regulada em situações, nas quais, são evidenciadas alterações na massa muscular (LEE et al., 2004; PATEL; AMTHOR, 2005). Sabe-se que doenças como o câncer e a Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida promovem intenso catabolismo e estão positivamente relacionadas ao aumento dessa expressão (GONZALEZ-CADAVID et al., 1998; ZIMMERS et al., 2002).

Nos peixes o gene da miostatina tem sido descrito e caracterizado em diversas espécies como zebrafish (*Danio rerio*), salmão do atlântico (*Salmo salar*) e truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (OSTBYE et al., 2007; RESCAN, 2001; RODGERS et al., 2001). Nessas espécies foram descritos dois genes, denominados MSTN-1 e MSTN-2 (BIGA et al., 2004; GARIKIPATI et al., 2007). A MSTN-1 apresenta os maiores níveis de expressão no músculo esquelético e MSTN-2 é limitada ao sistema nervoso central (RODGERS et al., 2007) porém, essas duas formas da miostatina, assim como em mamíferos, se expressam em níveis diferentes com o decorrer do desenvolvimento do indivíduo.

Os níveis de expressão da miostatina são baixos no início do desenvolvimento embrionário e predominantemente caracterizado pela

hiperplasia. Esses níveis aumentam à medida que o peixe atinge estágios finais de desenvolvimento, quando a hiperplasia torna-se menos intensa (PATRUNO et al., 2008).

A via de sinalização da miostatina, assim como de outros genes músculo específicos, tem importância significativa para a manutenção do fenótipo muscular. O gene da miostatina codifica uma pequena sequência de aminoácidos hidrofóbicos próximos ao N-terminal (sequência sinalizadora para secreção) seguido por uma região pró-peptídeo (região latente), que regula a atividade biológica da miostatina, e uma pequena região para o C-terminal (região madura), que se liga aos receptores de activina tipo II (MCPHERRON; LEE; LAWLER, 1997) (Figura 11). O receptor de activina tipo II, um receptor transmembrana da família das serina/treonina quinase (LEE; MCPHERRON 2001), fosforila o receptor de activina tipo I que inicia a cascata de sinalização intracelular pela fosforilação de proteínas reguladoras Smad2 e Smad 3.

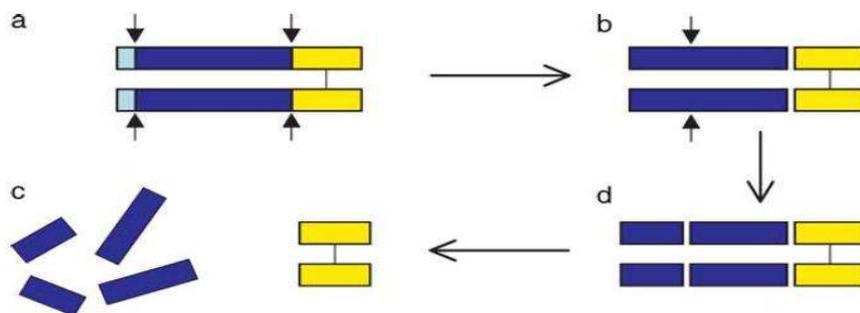


Figura 11 Processamento da miostatina. O precursor da miostatina passa por dois eventos preteolíticos; um remove a sequência sinalizadora N-terminal, uma segunda gera o fragmento C-terminal, que possui função de ligação ao receptor (a). Seguindo o processamento proteolítico, o pró-peptídeo (azul) e o C-terminal ligado por dissulfureto (amarelo) permanecem ligados de forma não covalente em um complexo latente (b). A ativação da miostatina latente pode ocorrer por clivagem proteolítica do pró-peptídeo (b, c) por membros da família de metaloproteinases de BMP-1/tolloid, o que provoca a dissociação do complexo latente (d)

Fonte: Lee (2004)

O complexo de proteínas Smad é translocado para o núcleo, onde interage com proteínas que regulam a transcrição de genes-específicos, inibindo dessa forma a ação da via IGF/Akt que atua na síntese proteica, fusão e diferenciação dos mioblastos. Dessa forma, proteínas responsáveis pela degradação proteica deixam de ser inibidas e passam a atuar tornando-se ativas (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011; OTTO; PATEL, 2010).

Embora os mecanismos de ativação ainda não sejam bem conhecidos, fatores específicos podem ser responsáveis pela geração de espécies ativas e subsequente atividade inibitória da miostatina (LEE, 2004; WALSH; CELESTE, 2005). Entre esses fatores estão a folistatina, a FLRG (genes relacionados à folistatina) e a GASP-1 (fator de crescimento e diferenciação associado à proteína plasmática 1), que têm sido mostrados por existirem em conjunto com a miostatina sérica.

A folistatina atua como um antagonista de diferentes membros da família TGF-Beta (AMTHOR et al., 1996). Um estudo em camundongos *knockout's* para o gene da folistatina, observou perda excessiva de massa muscular (MATZUK et al., 1995), por outro lado, camundongos que superexpressavam o gene da folistatina apresentaram aumento de 327% da massa muscular, quando comparado ao grupo controle (LEE; MCPHERRON, 2001). O aumento excessivo de massa muscular observado nesses camundongos resultou da combinação da hipertrofia muscular (27%) e da hiperplasia (66%). Estudos recentes mostram uma grande afinidade e direta interação da folistatina com a miostatina (AMTHOR et al., 2004), sugerindo sua ação direta no controle da atividade da miostatina.

Apresentando uma estrutura homóloga a folistatina, o FLRG, também pode ter importante papel na regulação da miostatina (HILL et al., 2002), ligando-se a sua região madura e inibindo sua atividade biológica.

Um terceiro possível inibidor da miostatina é a GASP-1, que contém domínios que são inibidores de proteases. A GASP-1 interage com ambas as regiões da miostatina regulando sua atividade negativamente por inibir a atividade das proteases sobre a miostatina impedindo a liberação da região madura (HILL et al., 2003) (Figura 12).

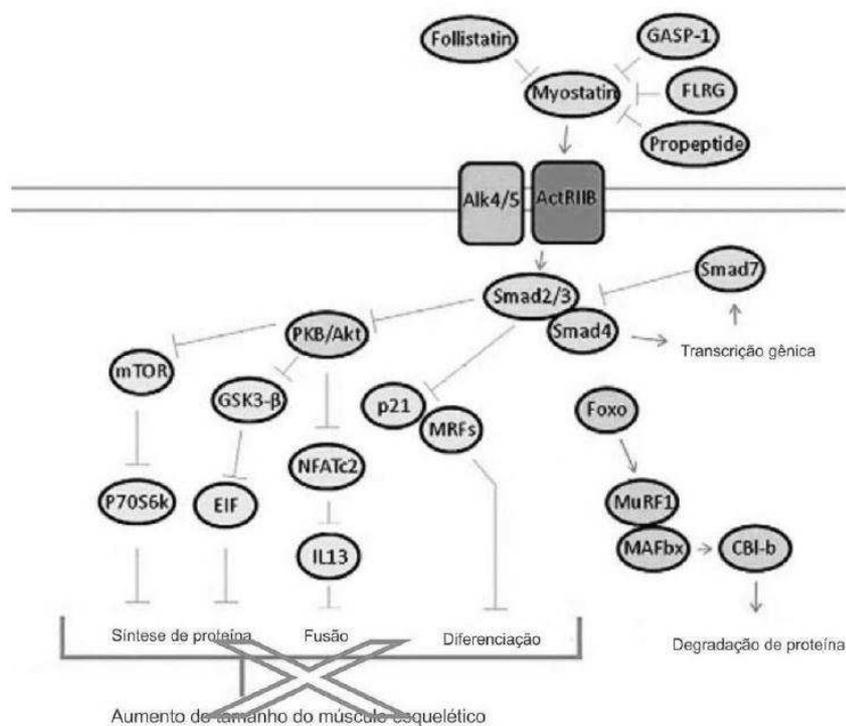


Figura 12 Representação esquemática simplificada das principais proteínas envolvidas na via de sinalização da Miostatina demonstrando seu papel
 Fonte: Adaptado de Otto e Patel (2010)

A miostatina exerce, também, um papel fundamental na modulação do crescimento tecidual através de sua relação com as células satélites. As células musculares são cercadas por células satélites imaturas que se encontram em estado latente até que o músculo seja lesado perante um esforço, essa situação

serve como estímulo, para que essas células-satélites sejam ativadas, se proliferem, se diferenciem e migrem para o músculo, otimizando a síntese proteica e promovendo, desse modo, o reparo tecidual.

A Miostatina é encontrada inativa no plasma, tornando-se ativa pela ação de proteases que clivam a região pró-peptídeo liberando a região madura (WOLFMAN et al., 2003). Em sua forma ativa, ela atua como estimuladora da expressão de genes relacionados com a proliferação e diferenciação celular, como o p21cip1 (LANGLEY et al., 2002; RIOS et al., 2001; TAYLOR; BHASIN; GONZALEZ-CADAVID, 2001; THOMAS et al., 2000) e inibidora da Cdk2 inativando o complexo Cyclin/CDK que faz a progressão da fase G1 para a S (Figura 13) e assim inibindo o processo de diferenciação e replicação das células satélites (THOMAS et al., 2000).

Sem a miostatina, a reconstituição do tecido músculo esquelético através das células-satélite poderia se manifestar de uma forma tão ativa (como um mecanismo de retroalimentação positiva, por exemplo) que estas poderiam se esgotar no início de sua função (FRIEDMANN, 2005; KRIVICKAS, 2009).

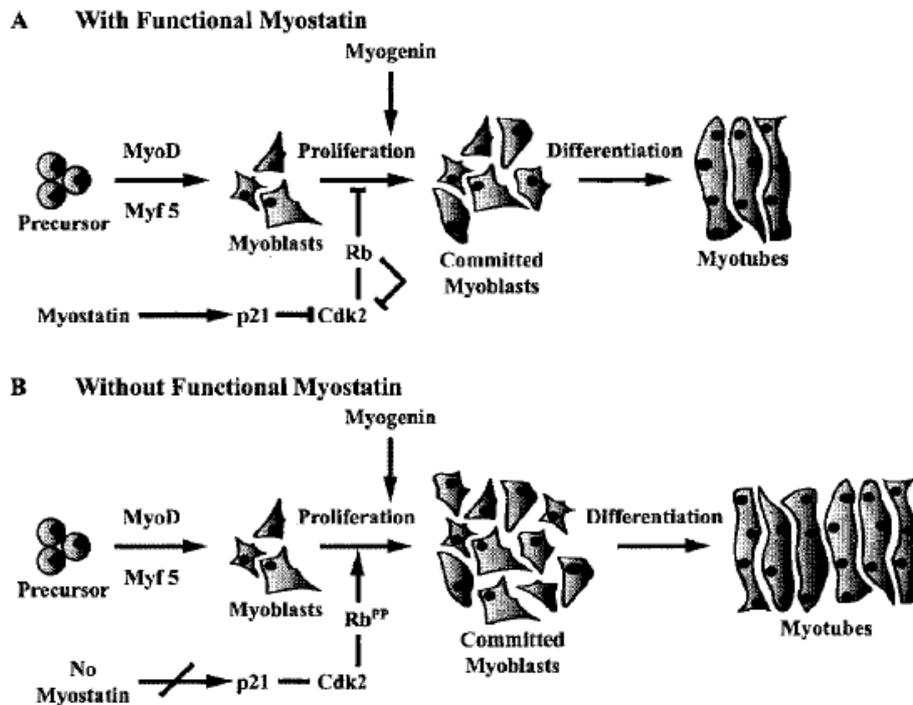


Figura 13 Modelo para o papel da miostatina no crescimento muscular. A) Diferenciação das células precursoras em mioblastos por ação dos fatores Myf-5 e MyoD. Em resposta à sinalização da miostatina, a p21 é estimulada inibindo a atividade da ciclina –E – Cdk2. A Rb é hipofosforilada resultando na paralização da G1. Assim, o número de mioblastos e, conseqüentemente, o número de fibras seguintes, são regulados (limitados). B) Na ausência de miostatina funcional, o sinal para estimular a proteína p21 é perdido e o Rb permanece numa forma hiperfosforilada, o que resulta em proliferação de mioblastos, o que leva a um aumento no número de fibras

Fonte: Adaptado de Thomas et al. (2000)

Cientistas acreditam que a descoberta do bloqueio da miostatina pode levar ao desenvolvimento de uma droga para o tratamento de indivíduos com distrofias musculares e outras doenças crônico-degenerativas, além de aumentar o desempenho animal em termos de crescimento. As universidades e empresas farmacêuticas já estão tentando encontrar uma maneira de limitar a quantidade, a atividade e a expressão sistêmica da miostatina no organismo, porém a maioria

das pesquisas tem dado foco à manipulação genética e à utilização de anticorpos geneticamente projetados para neutralizar a ação da miostatina (KRIVICKAS et al., 2009).

Pesquisas mostram que a utilização de alguns compostos como polissacarídeos sulfatados na alimentação animal, podem inibir os efeitos da miostatina, sendo visto como um método mais simples e prático para esse fim comparado aos citados anteriormente (TULLER; DE SANTIS; JERRY, 2014).

2.5 Polissacarídeos sulfatados

Os carboidratos, também conhecidos como glicídios ou açúcares, são moléculas constituintes dos seres vivos, assim como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Além de suas funções mais conhecidas como estrutural e energética, eles atuam em processos biológicos essenciais para a vida como sinalização entre células e interação entre outras moléculas. A combinação das diferentes funções bioquímicas de cada uma dessas moléculas permite a integridade da célula e de todos os processos metabólicos, fisiológicos e genéticos dos organismos vivos (VOET; VOET; PRATT, 2000).

Estruturalmente, os carboidratos podem ser divididos em classes dependendo da complexidade de sua estrutura. Os mais simples chamados de monossacarídeos podem ter de três a sete átomos de carbono, sendo que os mais conhecidos (glicose, frutose e galactose) têm seis carbonos. A fórmula desses principais açúcares é a mesma, $C_6H_{12}O_6$, mas eles diferem no arranjo dos átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio em suas moléculas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Os monossacarídeos, principalmente as hexoses, podem se unir em cadeia, formando desde dissacarídeos (com duas unidades, como a sacarose, que une uma frutose e uma glicose) até polissacarídeos (com grande número de unidades, como o amido, que tem cerca de 1.400 moléculas de glicose, e a celulose, formada por entre 10 mil e 15 mil moléculas de glicose). Embora

muitos polissacarídeos sejam formados pela mesma unidade (glicose, no caso do amido e da celulose), as diferenças em suas estruturas, como presença ou não de ramificações e variedade nas ligações entre as unidades, conferem a eles propriedades físico-químicas muito diversas (VOET; VOET; PRATT, 2000).

A utilização dos polissacarídeos sulfatados surgiu a partir da necessidade de uma fonte alternativa ao uso da heparina. Esse glicosaminoglicano tem sido usado como anticoagulante e antitrombótico, sendo o segundo composto natural mais usado na medicina, perdendo apenas para a insulina. Sua utilização é frequente por causa da incidência de doenças cardiovasculares (MOURÃO, 2004).

O uso clínico da heparina, no entanto, apresenta efeitos colaterais, como redução da quantidade de plaquetas (trombocitopenia) e propensão a hemorragias. Além disso, a dose necessária para obter o resultado adequado varia de paciente para paciente e a heparina precisa ser extraída de tecidos de mamíferos (como intestino de porco e pulmão bovino), onde ocorre em baixa concentração e ainda apresenta risco de contaminação por vírus e bactérias. Os efeitos indesejados desse composto, associados ao aumento da incidência de doenças tromboembólicas no mundo, motivam a pesquisa de novos agentes anticoagulantes e antitrombóticos (MOURÃO, 2004).

Muitos compostos têm sido testados, em todo o mundo, em busca de novas drogas que evitem ou combatam a trombose. Estudos com ouriços do mar e algas marrons revelaram um polissacarídeo específico capaz de substituir a heparina pelo seu efeito similar de anticoagulante. As análises desses polissacarídeos revelaram que são polímeros constituídos exclusivamente pelo monossacarídeo fucose. Esses compostos têm ainda, ligados à estrutura básica de carboidrato (CH_2O), grupamentos sulfatos idênticos aos encontrados nos glicosaminoglicanos, que conferem carga negativa ao polímero. Por isso, são conhecidos como fucanas sulfatadas e galactanas sulfatadas. Outra observação

curiosa é que esses compostos exibem grande variedade estrutural, em função do tipo de ligação entre os monossacarídeos e do padrão de sulfatação (MOURÃO, 2004).

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, localizados em sua parede celular (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967), têm sido amplamente estudados pela indústria farmacêutica e biomédica pelos seus diversos benefícios, além do efeito anticoagulante, como antitumorais, imunomoduladores, anti-inflamatórios (ROCHA et al., 2006) e, mais recentemente, como moduladores do crescimento muscular.

2.5.1 Polissacarídeos sulfatados de algas marrons

As macroalgas marinhas são classificadas conforme a predominância pigmentar acessória ou fotossintética presente no organismo, sendo assim divididas em: *Chlorophyceae* (algas verdes), que possuem as clorofilas a e b como principais pigmentos; *Rhodophyceae* (algas vermelhas), cujo principal pigmento é a ficoeritrina; e *Phaeophyceae* (algas marrons ou pardas) que apresentam como principal pigmento o carotenoide fucoxantina (O'SULLIVAN et al., 2010). As macroalgas vermelhas estão inseridas no reino *Plantae*, junto às verdes, enquanto que as marrons encontram-se no reino *Chromalveolata* (Filo *Stramenopiles*) (Figura 14).

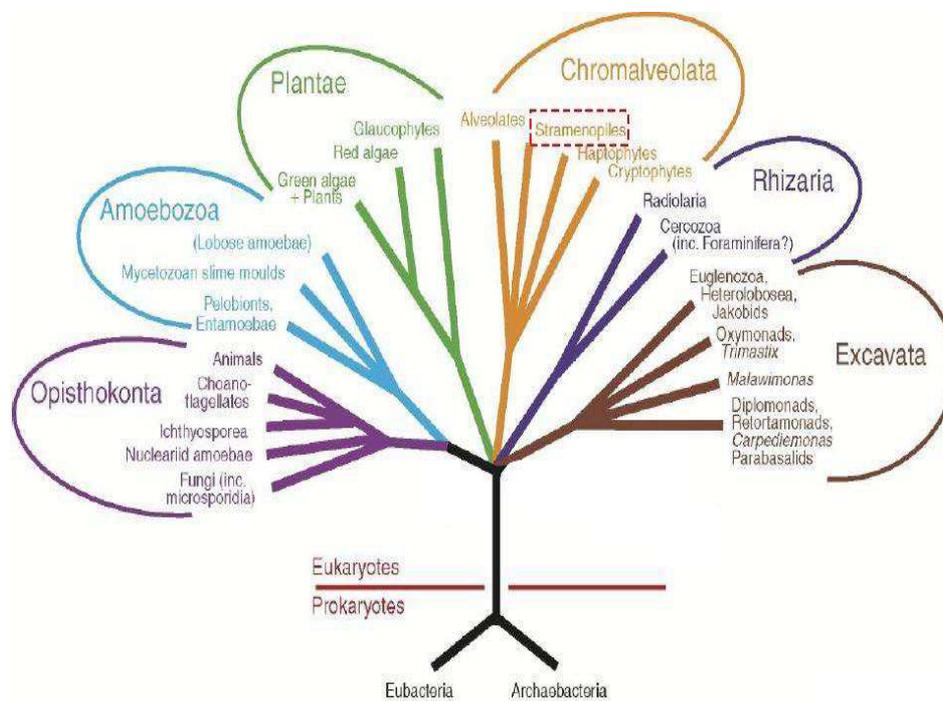


Figura 14 Cladograma representando a organização dos eucariotos. Os seis reinos (Opisthokonta, Amoebozoa, Plantae, Chromalveolata, Rhizaria e Excavata) estão representados por diferentes cores e separados por semicircunferências da mesma cor. Os ramos menores do cladograma representam os filios que constituem os reinos. O filo Stramenopiles que abrange as algas marinhas marrons está destacado por um retângulo tracejado vermelho

Fonte: Adaptada de Simpson e Roger (2004)

Com relação ao seu uso, as algas apresentam um alto valor nutritivo, sendo ricas em carotenoides, proteínas, fibras dietéticas, ácidos graxos essenciais, vitaminas (C, D, E, K e do complexo B) e minerais (cálcio, fósforo, sódio, magnésio, ferro, cobre, manganês, potássio, iodo, dentre outros) (BURTIN, 2003; MACARTAIN et al., 2007; ORTIZ et al., 2009).

Além disso, ainda produzem outros metabólitos com potencial econômico, inclusive farmacológico, como lecitinas, aminoácidos tipo-micosporinas, compostos halogenados, e principalmente polissacarídeos

sulfatados, com destaque para as macroalgas marrons, fazendo desses organismos foco de pesquisas biomédicas (CARDOZO et al., 2007; MAYER et al., 2009; O'SULLIVAN et al., 2010).

As algas marrons possuem na constituição de suas paredes celulares um grupo de polissacarídeos ácidos. Dentre esses açúcares, destacam-se àqueles com a presença de grupo sulfato denominados de fucanas sulfatadas, que têm como característica marcante a presença de α -L-fucopiranosose em sua estrutura (ROCHA et al., 2001). Acredita-se que por possuir um caráter altamente higroscópico, as fucanas estariam relacionadas com a proteção da alga contra a desidratação, quando esta é submetida a longos períodos de exposição ao sol durante marés baixas. Além disso, a natureza mucilaginosa das fucanas parece tornar a alga flexível o bastante para crescer em ambiente líquido e rígida o suficiente para permanecer estendida, de forma a melhor captar a luz e os nutrientes existentes (PERCIVAL; MAC DOWELL, 1967).

Esses polissacarídeos apresentam uma grande variabilidade estrutural e podem se apresentar na forma de homopolímeros (homofucanas) ou heteropolímeros (fucoidans ou heterofucanas) (BERTEAU; MULLOY, 2003) podendo variar de espécie para espécie, em relação ao tipo de ligação glicosídica, ao padrão de sulfatação e a presença de ramificação.

Existem algumas contradições relacionadas à estrutura das fucanas sulfatadas de certas espécies de algas pardas, devido às dificuldades tanto para a purificação quanto para a análise estrutural desses polímeros (CHEVOLOT et al., 1999; PERCIVAL; ROSS, 1950; PEREIRA; MULLOY; MOURÃO, 1999). A estrutura das fucanas sulfatadas de algas pardas apresenta extrema complexidade, devido à presença e posições aleatórias de ramificações, posições aleatórias de sulfatação, além de ser em polímeros muitas vezes heterogêneos (com presença de outros açúcares como galactose, glicose, manose e xilose) (ROCHA et al., 2005) e, ocasionalmente, com outros grupamentos químicos

como acetil, metil e piruvato (BILAN et al., 2007; CHIZHOV et al., 1999) (Tabela 2).

Tabela 2 Açúcares constituintes dos polissacarídeos sulfatados des algas marinhas marrons

Constituintes	Algas Marrons
D-Galactose	+
D-glicose	++
D-Manose	+
L-Galactose	n.d.
D-Frutose	n.d.
D-Xilose	+
L-Arabinose	n.d.
L-Glucurônico	+
L-Galacturônico	n.d.
D-Manurônico	+
L-Gulurônico	++
L-Fucose	++
L-Ramnose	(traços)
Manitol	+
Éster Sulfato	++

Legenda: ++ (frequentemente encontrado)

+ (raramente encontrado)

n.d. (não detectado)

Fonte: Adaptado de Percival e Mc Dowell (1967)

Em geral, essa alta complexidade estrutural impossibilita o desenho preciso de uma molécula de fucana sulfatada das espécies de algas marrons, sendo necessária a visualização através da estrutura dos equinodermas, como pepinos e ouriço do mar, já que suas estruturas são mais simples, lineares e compostas de unidades repetitivas de oligossacarídeos (mono, tri, ou tetrassacarídeos), que diferem de espécie para espécie no padrão de sulfatação

e/ou no tipo de ligação glicosídica (Figura 16) (MOURÃO, 1999; PEREIRA; MULLOY; MOURÃO, 1999).

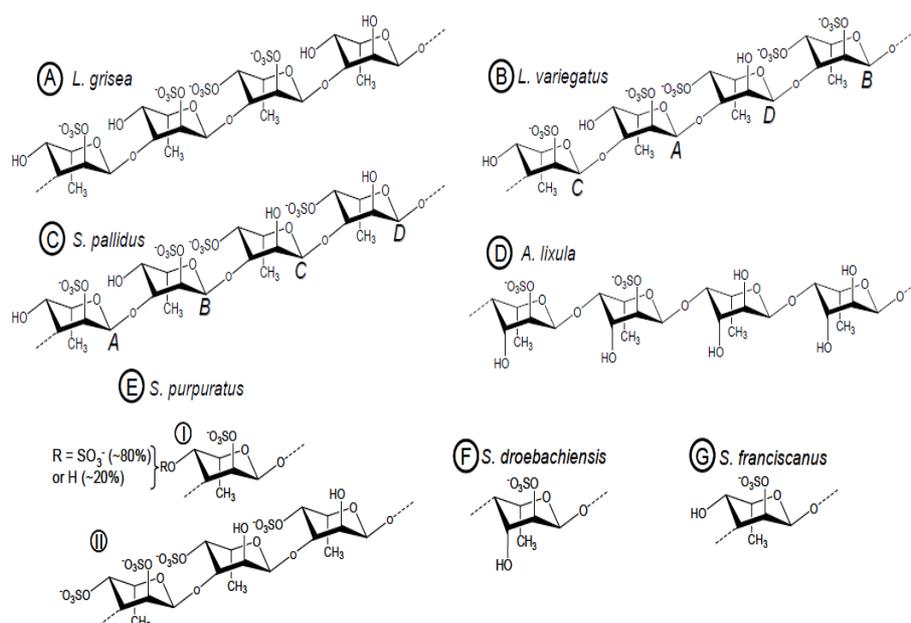


Figura 15 Estruturas químicas das unidades oligossacarídicas repetitivas das α -L-fucanas sulfatadas da parede do corpo do pepino-do-mar (A) e dos envoltórios gelatinosos que recobrem os óvulos dos ouriços-do-mar (B-G). As estruturas espécie-específicas variam no padrão de sulfatação (mas, exclusivamente nas posições 2-O- e/ou 4-O-), nas ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow3)$ (A-C, E e G) ou $\alpha(1\rightarrow4)$ (D e F) e no número de resíduos contidos nas unidades repetitivas: tetrassacarídeos (A-D), trissacarídeos (E-II) e monossacarídeos (E-I, F e G), mas todos compostos lineares. Os quatro tipos de unidades anoméricas das fucanas de *L. variegatus* (B) e *S. pallidus* (C) estão identificados pelas letras A D para correspondente assinalamento nos espectros de 1H-RMN.

Fonte: Pomin (2008)

Kloreg e Quatrano em 1988, levando em consideração a heterogeneidade e complexidade estrutural das fucanas, como já citado anteriormente, resolveram classificá-las com base nos seus açúcares constituintes em homofucanas e heterofucanas. As primeiras são polímeros

formados apenas por L-fucose sulfatada e as do segundo grupo seus polímeros são constituídos de fucose e outros açúcares. Aqueles que possuem mais de 90% desse monossacarídeo na sua estrutura são chamados de fucanas e os demais são denominados de fucoïdans (BERTEAU; MULLOY, 2003).

Alguns relatos de estruturas propostas para esses polissacarídeos sulfatados são encontrados nos estudos realizados por Patankar et al. (1993), que em estudos com fucoïdan extraído da alga *Fucus vesiculosus* propuseram uma estrutura na qual resíduos de fucopiranosose estariam unidos por ligações α 1-3, com a presença de ramificações localizadas nas posições C2 ou C4, ficando determinado também alguns resíduos sulfatados em C4, assemelhando-se assim com a estrutura de algumas fucanas de ouriços do mar.

Estudos têm sido realizados na tentativa de determinar a estrutura fina dessas fucanas, uma vez que, tamanho molecular, tipo de ligação, monossacarídeos constituintes e posição do sulfato, são características que parecem estar relacionadas com suas atividades biológicas. Esses estudos proporcionariam conhecer o mecanismo pelo qual as fucanas exercem a sua atividade biológica e farmacológica (MELO et al., 2002). A Tabela 3 resume algumas dessas atividades.

Tabela 3 Algumas atividades farmacológicas atribuídas a fucanas e fucoidans

Atividade	Alga
Angiogênico	<i>F. vesiculosus</i>
Anti complemento	<i>Laminaria cichorioides, L.japonica, Fucus evanescens, Ascophyllum nodosum</i>
Anticoagulante	<i>F. Nodosum, Ecklonia kurome, Eisenia bicyclis</i>
Antioxidante	<i>F. vesiculosus</i>
Antitrombótico	<i>A.nodosum</i>
Antitumoral	<i>A.nodosum, Sargassum thumbergii, E. bicyclis</i>
Anti-úlceras	<i>C. okamuranus</i>
Antiviral	<i>Sargassum horneri, F. vesiculosus</i>
Antimetastático	<i>F. vesiculosus</i>
Estímulo de síntese de heparan antitrombótico por células endoteliais	<i>S. shröderi</i>
Fibrinolítica	<i>E. kurome, F. vesiculosus</i>
Impedir a rolagem de leucócitos	<i>F. vesiculosus</i>
Veículo para dispensação de fármacos	<i>S. shröderi</i>

Apesar de serem as principais atividades relacionadas às fucanas e fucoidans de algas marinhas, diversas outras têm sido estudadas. Algumas dessas funcionalidades despertam interesse, tendo como referência àquelas já estabelecidas aos polissacarídeos sulfatados dos animais, chamados de glicosaminoglicanos (GAGs).

Esses polissacarídeos, quando ligados covalentemente a proteínas desempenham uma grande variedade de funções biológicas, tais como: organização de tecido; crescimento celular; maturação de tecidos especializados (KOLSET; SALMIVIRTA, 1999); modulação da atividade de determinados fatores de crescimento (GALLAGHER, 2001); regulação da hidrólise de

colágeno; crescimento e invasão tumoral (SANDERSON, 2001); adesão, proliferação, diferenciação e migração celular; alterações morfológicas durante o desenvolvimento, remodelagem e mudanças ocorridas durante o ciclo celular (DIETRICH, 1984; PORCIONATO; NADER; DIETRICH, 1999); transparência da córnea; crescimento de neuritos; bem como em patologias cardiovasculares, diabetes, doenças amiloides, mucopolissacaridoses e interações com patógenos (TOMA; DIETRICH; NADER, 1996); entre outras funções (BERNFIELD et al., 1999).

Dentre essas funcionalidades, ganha destaque àquelas relacionadas com o processo de crescimento e desenvolvimento muscular. Estudos recentes têm atribuído essa característica aos polissacarídeos fucoidans, comprovando que estes podem se complexar com a miostatina e assim auxiliar na regulação desse processo (TULLER; DE SANTIS; JERRY, 2014).

2.5.2 Fucoïdan

Os Fucoïdanos são polissacarídeos constituintes de algas marrons e de alguns invertebrados marinhos (como os ouriços do mar e pepinos do mar), que contêm percentagens significativas de L- fucose e grupos de éster sulfato em sua estrutura. Esse polissacarídeo foi isolado pela primeira vez por KYLIN (1913) a partir de algas marinhas marrons e foi nomeado como "fucoidina". Essa denominação foi alterada para "fucoïdan" por exigências das regras da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada). Esse composto também é chamado de fucana, fucosan ou fucana sulfatada (BILAN; GRACHEV; USTUZHANINA, 2002; CHIZHOV, 1999).

Nas últimas décadas, o fucoïdan, isolado de diferentes espécies de algas marrom, tem sido intensivamente estudado devido às suas diversas funcionalidades biológicas, incluindo: anticoagulante e antitrombótica; antiviral; antitumoral e imunomoduladora; anti-inflamatória; redução de lipídios no sangue; propriedades antioxidantes e anticomplementares; prevenção contra

hepatopatia; uropatia; e efeitos de proteção gástricas. Em comparação com outros polissacarídeos sulfatados, o fucoidan está amplamente disponível em várias espécies de algas marrons, de modo que mais fucoidans estão sendo investigados para o desenvolvimento de medicamentos ou para a utilização como alimento funcional (LI, 2008).

Desde que o fucoidan foi isolado pela primeira vez, a sua estrutura e funcionalidade tem sido amplamente investigada. Alguns compostos, como o extraído de *Fucus vesiculosus*, por exemplo, possuem estruturas simples, sendo compostos apenas de fucose e sulfato, porém a grande maioria dos fucoidans apresentam estruturas complexas que dificultam a sua definição. Além da fucose e do sulfato, também aparecem outros monossacáridos (manose, galactose, glicose, xilose, etc.) e ácidos urônicos, até mesmo grupos acetila e proteínas. Além disso, as estruturas do fucoidan de algas marrons variam de espécie para espécie (LI, 2008).

Conchie e Percival (1950) e O'Neill (1954) propuseram um modelo baseado no fucoidan extraído da *Fucus vesiculosus* que foi utilizado até 1993. Segundo esses autores, o principal componente estrutural era a 1,2- α -fucose e a grande parte dos grupos sulfatos estava localizada nas posições C-4 das unidades de fucose.

Patankar et al. (1993), após revisarem a estrutura proposta anteriormente, chegaram à conclusão que a estrutura principal da molécula de fucoidan era um polímero de ligações α -(1-3) com grupos sulfatos ligados na posição C-4 em alguns resíduos de fucose. Foi sugerido também que a cada um a três resíduos de fucose, havia ramificações compostas por outras moléculas de fucose, diferente do primeiro modelo onde esse intervalo era a cada cinco resíduos de fucose (Fig. 17). Essa diferença observada pelos dois autores ocorreu devido ao método de extração, sendo que o utilizado por Patankar et al. (1993) é aquele proposto nos dias atuais.

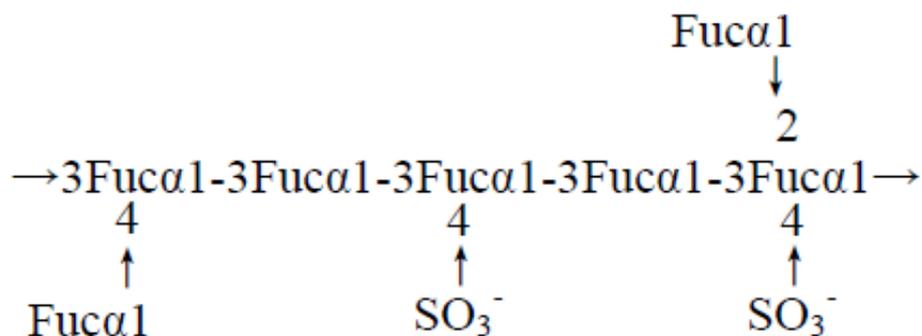


Figura 16 Modelo de Patankar et al. (1993) para a estrutura principal do Fucoidan

Apesar da estrutura proposta por esses autores ser utilizada como base para exemplificar a estrutura geral da molécula de fucoidan, a grande parte das estruturas existentes apresentam composições mais complexas. Em 1962 Schweiger isolou o polissacarídeo da espécie *Macrocystis pyrifera* e verificou que a proporção de fucose e galactose eram de 18:1. Essa observação o levou à conclusão de que o fucoidan não é uma molécula composta apenas por fucana sulfatada, mas um heteropolímero de fucose, galactose e xylose. Daí em diante, outros açúcares, tais como manose, glicose, xilose e ácido glucurônico (GlcA) foram encontradas em diferentes fucoidans extraídos de algas marrons (Tabela 4), o que aumentou a dificuldade da análise estrutural (JI, 1997).

Além dos diferentes açúcares encontrados nas estruturas de fucoidan, as ligações das fucanas podem variar, diferente daquela estrutura básica em que eram unidas por ligações α - (1-3). Essas ligações podem variar em (1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc, (1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc e (1 \rightarrow 4)- α -L-Fuc, sendo que as posições das ramificações e dos grupamentos sulfatos também podem variar entre as posições C-2, C-3 e C-4 da fucose. Todas essas diferenças estruturais ocorrem dependendo da espécie de onde o fucoidan é extraído e são elas que definem as diversas funcionalidades e características da substância, fazendo com que o fucoidan seja

responsável pelos seus diversos benefícios (CHEVOLOT; MULLOY; RACQUELINE, 2001; HUSSEIN; ABDEL; SALEM, 1980a, 1980b; MIAN; PERCIVAL, 1973; NISHINO; NAGUMO; KIYOHARA, 1991).

Um estudo realizado em 2003 demonstrou outra funcionalidade atribuída a esse composto, diferente daquelas já citadas anteriormente. Ramazanov, Jimenez e Del Rio Ziegenfuss (2003) propôs que o extrato de fucoïdan poderia ser usado para aprimorar o crescimento e desenvolvimento muscular por hiperplasia e hipertrofia. Esses autores, através de estudo *in vitro* com células humanas, mostraram que a miostatina possui uma afinidade por polissacarídeos sulfatados extraídos de alga marrom da espécie *Cystoseira canariensis*.

Apesar dos estudos mostrarem que os polissacarídeos sulfatados, em geral, podem regular diretamente a bioatividade de fatores de crescimento e citocinas, tais como, fatores de crescimento de fibroblastos, enzimas e fator de crescimento transformante beta (RAMAZANOV; JIMENEZ DEL RIO; ZIEGENFUSS, 2003; SALEK-ARDAKANI et al., 2000), os seus efeitos em peixes teleósteos ainda são desconhecidos.

Estudos comprovando a eficácia dos polissacarídeos sulfatados de algas marrons para a melhora na velocidade de crescimento desses animais seriam muito significativos do ponto de vista comercial, já que essa é a característica de maior importância para o produtor, dentro do mercado piscícola.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e tempo experimental

O experimento foi conduzido no Biotério Central da Universidade Federal de Lavras situado no Departamento de Medicina Veterinária do dia 27/08/2014 ao dia 25/09/2014, totalizando um período de 30 dias. As análises de músculo e cromatografia foram realizadas no setor de histologia do Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, respectivamente.

3.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e três repetições. A parcela experimental foi um aquário de 60 litros composto por 18 alevinos de tilápia do Nilo inicialmente.

3.3 Extrato de fucoidan

O extrato de fucoidan (produto comercial em pó) utilizado foi derivado da espécie de alga marrom *Undaria pinnatifida* com pureza de 70%. O produto foi extraído de suas respectivas cápsulas e adicionado, posteriormente, à mistura de ingredientes durante a confecção das dietas experimentais.

3.4 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas e balanceadas de acordo com as exigências da espécie para fase de alevino. O extrato de fucoidan (pó) foi incrementado à dieta basal aos níveis de 0 (T1), 5 (T2), 10 (T3) e 15 g/kg (T4). Após a homogeneização do produto com os ingredientes da ração (a seco), as dietas receberam um tratamento com água a 60°. Após a aglutinação, as rações passaram por uma peletizadora e os peletes formados passaram por um processo de secagem em uma estufa (45⁰C) sob ventilação forçada por um período de 24 horas. As quatro dietas experimentais podem ser visualizadas na tabela 4.

Tabela 4 Composição das dietas com os níveis de fucoidan

Ingredientes (%)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
	0,0	0,5	1,0	1,5
Farelo de Soja	40,00	40,00	40,00	40,00
Farinha de Peixe	15,00	15,00	15,00	15,00
Fubá de Milho	15,00	15,00	15,00	15,00
Farelo de Trigo	12,93	12,93	12,93	12,93
Glúten de Milho	5,00	5,00	5,00	5,00
Gelatina	1,00	1,00	1,00	1,00
Óleo de Soja	3,50	3,50	3,50	3,50
Fosfato bicálcico	1,00	1,00	1,00	1,00
Cloreto de sódio	0,10	0,10	0,10	0,10
Fucoidan	0,00	0,71	1,43	2,14
Celulose	2,15	1,43	0,72	0,00
Inerte	3,80	2,54	1,27	0,00
Vit/Premix Min ¹	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100	100	100	100
Valores Calculados (%)	0,0	0,5	1,0	1,5
Proteína Bruta	35,77	35,77	35,77	35,77
Proteína Digestível	31,98	31,98	31,98	31,98
Lípídeo total	6,77	6,77	6,77	6,77
Energia Digestível (kcal/kg)	3288,65	3288,65	3288,65	3288,65
Fibra total	2,07	2,07	2,07	2,07

¹Níveis de Garantia PREMIX kg⁻¹ do produto: Fe 19621 mg, Cu 2800 mg, Zn 28000 mg, Mn 5200 mg, Se 119 mg, Co 40 mg, iodo 120 mg, vitA 1995 KUI, vitD3 798 KUI, vitE 19950 mg, vitK3 997 mg, tiamina 4987 mg, riboflavina 4987 mg, piridoxina 4987 mg, cianocobalamina 5985 mcg, niacina 19950 mg, ácido Pantotênico 9975 mg, ácido fólico 997 mg, biotina 159600 mcg, inositol 10000 mg, vitC 70000 mg, etoxiquina 24775 mg.

²Butil-Hidroxi-tolueno (Antioxidante)

3.5 Material biológico e condição experimental

Foram utilizados 216 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT, revertidos e com peso médio inicial de 2,73±0,19g. Os alevinos, doados pela piscicultura Aquaporto, foram mantidos por duas semanas em duas caixas de recirculação de água com capacidade para 500 litros a 26 °C

para adaptação. Durante esse período, os animais foram alimentados *ad libitum* com uma ração comercial (45% PB), específica para a espécie e fase de vida, três vezes ao dia (08h00min, 12h00min e às 17h00min).

Após o período de adaptação, os peixes foram distribuídos aleatoriamente nos 12 aquários experimentais com capacidade para 60 litros. Cada grupo era composto por 18 animais, os quais foram mantidos em condições experimentais, com ração comercial, por um período de uma semana. Deu-se início ao experimento com a primeira coleta das medidas morfométricas, peso e plasma sanguíneo.

Por um período de 30 dias, os animais foram alimentados *ad libitum* com as dietas experimentais diariamente nos horários de 08h00min, 12h00min e às 17h00min. O período de iluminação adotado foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Durante o período experimental, os valores médios de temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram mantidos a 26,5 °C; 7,5 e 9,0 mg L⁻¹, respectivamente, permanecendo dentro dos limites recomendados para o cultivo da espécie (EL-SAYED, 2006), com o auxílio de termômetros, termostatos e kits comerciais. Os aquários foram mantidos em sistema de recirculação de água, em que a água era filtrada com uso de filtro biológico, físico, carvão aditivado e luz ultravioleta. Todos os aquários foram mantidos com vazão constante de água.

Diariamente, no período da manhã (09h00min) e no período da tarde (16h00min), os aquários passavam por limpeza através de sifonamento das fezes e duas vezes por semana era realizada a limpeza dos filtros.

3.6 Variáveis analisadas

Foram realizadas duas coletas (inicial e final) para acompanhamento dos índices zootécnicos, nível de fucose no plasma sanguíneo e extração do músculo

para análise histológica. Foram abatidos nove animais por aquário em cada coleta.

Índices zootécnicos

Em cada amostragem, após serem anestesiados com óleo de cravo a 80 mg/L (DELBON, 2006), os animais foram pesados e aferidas as medidas morfométricas (Figura 19), com auxílio de balança de precisão e régua graduada em milímetros (mm).

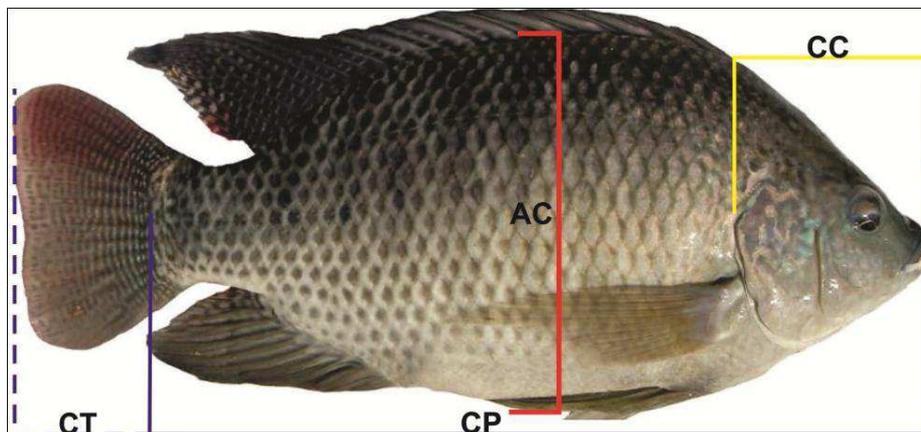


Figura 17 Avaliação morfométrica de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sendo: comprimento padrão (CP, azul); comprimento da cabeça (CC, amarelo); altura do corpo (AC, vermelho); comprimento total (CT, azul + azul tracejado)

- Comprimento Total (CT): compreendido entre o início da boca até o final da nadadeira caudal;
- Comprimento da Cabeça (CC): compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e a borda caudal do opérculo;
- Comprimento Padrão (CP): compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e o menor perímetro do pedúnculo (inserção da nadadeira caudal);

- Altura do Corpo (AC): altura do corpo medida à frente do 1º raio da nadadeira dorsal.

Através do peso, das medidas morfométricas e mortalidade foram avaliados: taxa de sobrevivência (S%) = (número de peixes final/número de peixes inicial) x 100; ganho de peso médio final (GP) = peso final – peso inicial; conversão alimentar aparente (CAA) = quantidade de alimento consumido/ganho de peso; consumo médio de ração (CR) = quantidade de ração final – quantidade de ração inicial.

Avaliação Histológica

Feita as medidas dos índices zootécnicos, fragmentos de músculo branco foram retirados da região dorsal esquerda dos peixes e imediatamente criopreservadas em talco neutro. Após a criopreservação as amostras foram previamente resfriadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C.

Foram obtidas secções transversais de 10 µm de espessura em criostato a -20°C (Leica, Alemanha) e os cortes foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina para estudos morfológicos.

As lâminas histológicas foram fotografadas usando microscópio Olympus CX31 (Olympus, Japão) acoplado à câmera digital Altra SC30 (Olympus, Japão) e, usando o programa AxioVision (Carl Zeiss, Alemanha), foi mensurado o diâmetro de 200 fibras musculares por lâmina (animal) (DUBOWITZ; BROOKE, 1973).

Os dados relacionados aos diâmetros das fibras musculares foram distribuídos em classes de diâmetros (<25µm, 25-50µm e >50µm), conforme a metodologia adotada por Almeida et al. (2008), e as médias foram plotadas em um histograma de frequência (%) para cada tratamento aos 30 dias.

Análise de cromatografia

Após a coleta do plasma sanguíneo, foi feita uma leitura em cromatografia líquida associada à cromatografia de massa para identificar e diferenciar o nível de fucose nas amostras.

As amostras de plasma dos animais foram preparadas através da diluição na proporção 1:100 e filtragem através de membrana de PES, com diâmetro de poro de 0,22 μ m. Um volume de 10 μ L dessas amostras foi injetado em um sistema UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) composto por duas bombas, (LC-20AD) e um degaseificador (DGU-20A₃), através de um injetor automático (SIL-20A HT) equipado com um *loop* de 100 μ L. O sistema foi operado através do software Hystar (BrukerDaltonik, v. 3.2.44.0).

Uma pré-coluna de cinco mm e uma coluna analítica de 150 mm \times 75 μ m preenchida com fase estacionária C18, 2.7 μ m (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, Estados Unidos) foram utilizadas para a separação dos metabólitos, que foram analisados em um espectrômetro de massa (microTOF Q-II, BrukerDaltonik, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de ionização por *eletrospray*. As amostras foram carregadas por um fluxo de 200 μ Lmin⁻¹ de uma solução a 2 % (v/v) acetonitrila e 0.1 % (v/v) AF em água (Fluka, Buchs, Suíça).

A fase móvel utilizada para separação foi preparada com um gradiente entre água contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv (Fluka) – solução A, e acetonitrila contendo 0.1% (v/v) AF LC-MS Chromasolv (Fluka) – solução B. O programa utilizado para a eluição foi configurado com as seguintes proporções: 0–2 min isocrático 2% B; 2–12 min gradiente linear até 10 % B; 12–17 gradiente linear até 98% B; 17–23min isocrático 98%B; 23–25 min isocrático 2% B. As configurações utilizadas na espectrometria de massa foram: intervalo de massa: 50–1000 m/z; voltagem do spray: 3500 V; gás de secagem (N₂)

temperatura: 190 °C; fluxo: 9Lmin⁻¹; funnel 1 RF 200.0 Vpp; funnel 2 RF 200.0 Vpp; Hexapolo RF 96.0 Vpp; energia do quadripolo -3.0 eV; menor massa do quadripolo 100.00 m/z; energia de colisão -8.0 eV; RF da colisão 150.0 Vpp; tempo de transferência 70 us; armazenamento pré-pulso 5.0 us.

Os dados cromatográficos obtidos via LC-MS foram analisados com o software Bruker Data Analysis, version 4.0 (Build 253), sendo gerado o EIC para m/z 163.05, correspondente a fucose. Foram, ainda, coletados os valores de área sob o pico para comparação entre as amostras.

3.7 Análises estatísticas

Atendidas as hipóteses fundamentais para a análise de variância, os dados de desempenho zootécnico e cromatografia foram submetidos à análise de variância com um nível de significância de 5%. As frequências de diâmetros foram submetidas à análise pelo teste de Goodman. Todas as análises foram realizadas com o auxílio programa computacional R versão 3.1.0 (R CORE TEAM, 2014).

4 RESULTADOS

Não foi observado comportamento de canibalismo visto que os aquários continham lotes uniformes (2,73g). Foi observado efeito de dominância e, conseqüentemente, mortalidade em alguns aquários. Esse fato ocorreu devido à baixa densidade (TACHIBANA, 2008) que ao final do experimento ficou em torno de 0,18 peixes L⁻¹.

Índices zootécnicos

Com relação às variáveis de desempenho, peso final (PF), consumo médio de ração (CR), ganho de peso médio final (GPD), conversão alimentar aparente (CAA), sobrevivência (S) e medidas morfométricas, comprimento padrão (CP), comprimento da cabeça (CC) e altura do tronco (AT), não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$) (Tabelas 6 e 7).

Tabela 5 Valores médios das variáveis de desempenho de *Oreochromis niloticus* suplementadas com extrato em pó de fucoïdan durante 30 dias de cultivo

Níveis de fucoïdan (g/kg)	PF ¹	CR ²	GP ³	CAA ⁴	S ⁵
0,0	14,25±0,72	12,66±0,76	11,36±0,75	1,12±0,06	86±0,09
0,5	12,56±0,10	12,94±0,68	10,01±0,22	1,29±0,09	93±0,06
1,0	11,38±1,25	12,90±0,46	8,57±1,24	1,58±0,27	96±0,03
1,5	13,29±1,63	12,72±0,32	10,62±1,60	1,25±0,19	96±0,03
CV	14,68	7,91	9,99	23,10	11,15

¹PF= Peso médio final (g); ²CR=consumo médio de ração/animal (g); ³GP=ganho de peso médio final (g); ⁴CAA= conversão alimentar aparente; ⁵S= sobrevivência (%)

Tabela 6 Valores médios das medidas morfométricas de *Oreochromis niloticus* suplementadas com extrato em pó de fucoidan durante 30 dias de cultivo

Níveis de fucoidan (g/kg)	CP ¹	CC ²	AT ³
0,0	7,22±0,11	2,40±0,02	2,88±0,07
0,5	6,84±0,04	2,34±0,03	2,63±0,03
1,0	6,68±0,28	2,31±0,13	2,53±0,09
1,5	7,01±0,34	2,46±0,11	2,68±0,13
CV	5,70	6,42	5,63

¹CP= comprimento padrão (cm); ²CC= comprimento da cabeça (cm); ³AT= altura do tronco(cm)

Análise de cromatografia

A análise de cromatografia não foi capaz de identificar a presença do monossacarídeo fucose no plasma sanguíneo dos animais na coleta inicial. Ao final do experimento, sua presença foi identificada em todos os tratamentos (Figura 18), porém os diferentes níveis encontrados não foram significativos ($P > 0,05$). Houve uma tendência de aumento dos níveis de fucose à medida que se aumentou os níveis de fucoidan fornecido. Os valores médios da área dos picos de fucose em unidades arbitrárias foram 841,87±420,99 (T1), 2533,60±189,32 (T2), 4606,23±2202,63 (T3) e 2176,85±833,89 (T4).

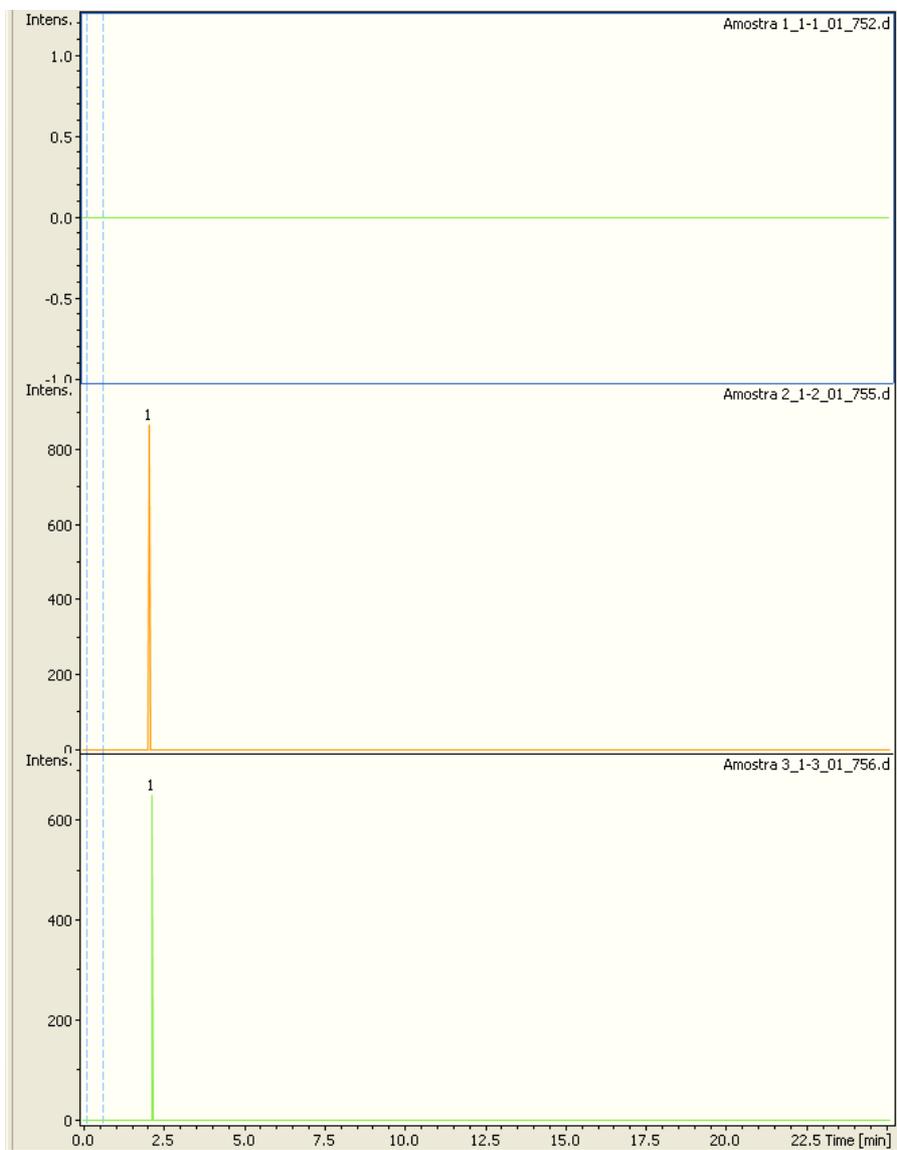


Figura 18 Cromatograma de ion extraído para a fucose ($m/z = 163,05$) de plasma sanguíneo de *Oreochromis niloticus* suplementadas com extrato de fucoidan em pó durante 30 dias de cultivo. Exemplo dos aquários 1, 2 e 3 (Coleta final)

Avaliação Histológica

A Tabela 8 demonstra os dados referentes à distribuição dos diâmetros das fibras musculares nas classes estudadas, aos 30 dias de cultivo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que em todos, a frequência de fibras na classe >50µm foi maior seguida das classes de 20-50 µm e <20µm (P<0,05). Esse resultado mostra que houve uma maior porcentagem de crescimento hipertrófico das fibras musculares (Figura 21).

Tabela 7 Distribuição de frequência (%) de diâmetro de fibra muscular branca em classes: < 20 µm, 20-50 µm e > 50 µm de *Oreochromis niloticus* suplementadas com extrato em pó de fucoidan durante 30 dias de cultivo

Níveis de fucoidan (g/kg)	< 20	20 - 50	> 50
0,0	5 ^c	36 ^b	59 ^a
0,5	4 ^c	33 ^b	63 ^a
1,0	6 ^c	34 ^b	60 ^a
1,5	5 ^c	32 ^b	63 ^a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Goodman a 5% de probabilidade

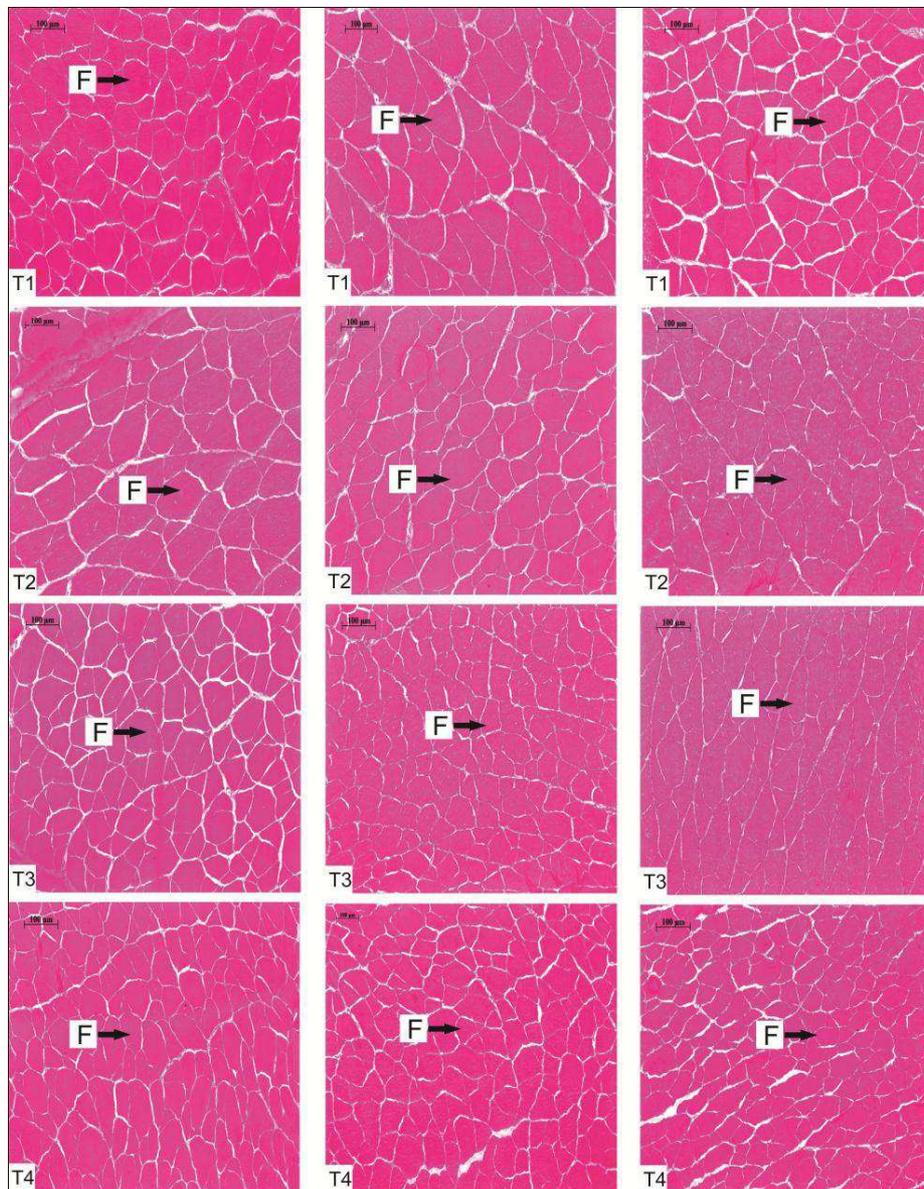


Figura 19 Seções transversais do músculo branco de *Oreochromis niloticus* cultivadas em diferentes níveis de Fucoidan (T1= 0, T2= 0,5, T3= 1,0 e T4= 1,5%), aos 30 dias. Fibra muscular (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento: 20x. Barra: 100 µm

5 DISCUSSÃO

O polissacarídeo sulfatado Fucoidan não demonstrou ser capaz de aumentar as taxas de desempenho e crescimento muscular, tanto hiperplásico quanto hipertrófico, já que nenhuma das variáveis apresentara diferenças significativas ($P > 0,05$) à medida que aumentaram os níveis do produto.

O crescimento muscular nos peixes envolve uma população de células miogênicas (células satélites) que quando ativadas, proliferam e fornecem núcleos que são responsáveis pelo crescimento muscular que ocorre por dois mecanismos: a hiperplasia (recrutamento de novas fibras musculares) e hipertrofia (aumento do diâmetro/área das fibras musculares) (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011; KOUMANS; SKER, 1995; ZIMMERMAN; LOWERY, 1999). No presente estudo podemos inferir que a maior porcentagem de fibras na classe $>50 \mu\text{m}$ é um indicativo de ter acelerado o crescimento muscular pelo mecanismo de hipertrofia das fibras (ROWLERSON, 2001; VALENTE et al., 1999). Esse resultado é condizente com a fase de vida em que os animais se encontravam, já que apenas na fase embrionária e fase larval, têm-se um maior recrutamento de novas fibras musculares (ROWLERSON, 2001).

Alfei (1994) e Almeida et al. (2008, 2010) observaram que a contribuição da hiperplasia para o crescimento muscular diminui com o tamanho corporal do peixe. Valente et al. (1999) verificaram que as fibras brancas de trutas (*Oncorhynchus mykiss*), com diâmetros inferiores a $25 \mu\text{m}$ estão inversamente correlacionadas ao comprimento corporal, sugerindo o mesmo efeito.

Lima (2009), que trabalhou com juvenis de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, também não encontrou diferenças significativas entre os níveis de polissacarídeos e desempenho dos animais. Esses autores testaram o efeito da administração do polissacarídeo sulfatado, aos níveis de 0,0, 0,5, 1,0 e

2,0 mg L⁻¹, na sobrevivência e crescimento dos animais submetidos a condições de estresse por hipóxia.

As primeiras comprovações de que os polissacarídeos tinham a capacidade efetiva de inibir a ação da miostatina, promovendo assim uma taxa de hiperplasia e hipertrofia elevada nas células musculares foram demonstradas por Ramazanov, Jimenez e Del Rio Ziegenfuss (2003). Em seu trabalho uma análise de immuno-eletroforese em Western Blot foi feita em proteínas extraídas de soro sanguíneo humano, onde foram encubadas com o polissacarídeo sulfatado. Os resultados mostraram uma reatividade cruzada positiva com o anticorpo da miostatina. Essa reatividade foi aumentando à medida que se aumentava a concentração dos polissacarídeos nas amostras, o que indicou que os polissacarídeos sulfatados ligam-se preferencialmente ao complexo da miostatina e, potencialmente, interferem com a capacidade de ligação dessa proteína nas células inibindo sua ação. A partir deste estudo surgiu a ideia de se testar esse polissacarídeo como parte de um programa alimentar a fim de se conseguir os mesmos resultados.

Tuller, De Santis e Jerry (2014) testaram níveis de inclusão de 0%, 0,5% e 1% em dietas para perca gigante (*Lates calcarifer*) (76.1 ± 1.1 g) por 52 dias e avaliaram taxa de crescimento e tamanho de fibra muscular. À medida que se aumentou o nível de Fucoïdan, houve um aumento no crescimento dos animais e tamanho de fibra muscular. Resultados semelhantes também foram encontrados por Cruz-Suárez (2000) e Traifalgar (2010), porém esses autores trabalharam com espécies de camarão, sendo *L. vannamei* (camarão branco) e *Marsupenaeus japonicus* (kuruma) respectivamente. Era esperado que esse mesmo efeito fosse observado nos animais do presente estudo, porém o mesmo não aconteceu. Esse fato pode ser explicado por diferenças nas condições experimentais, como citado adiante.

Devido à escassez de trabalhos existentes com este produto para fins de desempenho, principalmente com espécies de peixe, não são conhecidas as suas exigências e o comportamento desse polissacarídeo dentro do organismo do animal. Sendo assim, os níveis utilizados podem não ter sido suficientes para suprir as exigências da tilápia do Nilo quanto ao efeito do produto, já que, comparado com a perca gigante (TULLER; SANTIS; JERRY, 2014), por exemplo, além de ser uma espécie diferente, possui hábito alimentar diferente e distingue quanto à região de origem à da tilápia do Nilo. A perca gigante é um animal de hábito carnívoro, de águas frias e de origem asiática (CATACUTAN, 1995) enquanto a tilápia do Nilo é uma espécie onívora, de clima tropical e origem africana (ROMANA-EGUÍA et al., 2004).

Além disso, deve ser levado em consideração o tempo utilizado no presente estudo, que pode não ter sido o suficiente para a resposta ao produto, e a forma como esse produto foi incorporado nas dietas experimentais. Ramazanov, Jimenez Del Rio e Ziegenfuss (2003), em seu estudo, utilizaram a molécula do polissacarídeo intacta, porém os animais não possuem a capacidade de absorver essa molécula no trato gastrointestinal, diretamente, devido ao seu tamanho, sugerindo que o efeito positivo do polissacarídeo poderia ser causado por algum monossacarídeo presente na estrutura, como por exemplo, a fucose, que corresponde a mais de 90% de sua estrutura. No entanto, por se tratar de um polissacarídeo com ligações α -(1-3), os animais poderiam não ser capazes de produzir enzimas específicas capazes de quebrarem essas ligações.

Nesse sentido, apesar dos dados de cromatografia terem detectado a presença da fucose no sangue, comprovando que os animais são capazes de degradar a molécula, no presente estudo, o fucoidan foi adicionado à dieta como um ingrediente fibroso. Essa mesma suposição foi adotada por Traifalgar (2010). Cruz-Suárez (2000), Lima (2009) e Tuller, De Santis e Jerry (2014) fizeram apenas a inclusão do produto sem se preocuparem com o balanceamento das

dietas quanto aos níveis de fibra ou até mesmo energia, caso fosse considerado como ingrediente energético e este fizesse alguma diferença nos níveis de energia das dietas. Nesse caso, com exceção de Lima (2009), que também não encontrou diferenças significativas entre os tratamentos, o efeito positivo do polissacarídeo sobre o crescimento, não poderia ser atribuído apenas ao fato de sua ação inibitória sobre a miostatina, já que em nenhum trabalho foi feita alguma análise molecular com o objetivo de detectar essa interação.

Existem diversas suposições que podem ser feitas considerando o efeito benéfico dos polissacarídeos sulfatados, ou seus constituintes, ao desempenho dos animais, descartando a hipótese de sua ação sobre a molécula da miostatina. Uma possível explicação está no fato da fucose desempenhar um importante papel na manutenção do sistema imune dos animais e saúde da flora intestinal.

A fucose, sendo ela dietética ou do próprio organismo, pode ser encontrada como um importante componente estrutural de glicanos. Modificações terminais específicas em glicanos, incluindo fucosilação, mediados por fucosiltransferases (FUT), podem conferir propriedades funcionais exclusivas para alguns oligossacarídeos e muitas vezes são regulados durante a ontogenia e diferenciação celular (BECKER; LOWE, 2003).

Foi descrita a descoberta de treze genes capazes de sintetizar fucosiltransferases no genoma humano (BECKER; LOWE, 2003). A expressão desses genes é responsável por diversas funções dentro do organismo como: síntese do antígeno do grupo sanguíneo H (KELLY et al., 1995; LARSEN et al., 1990); síntese dos antígenos Lewis x e sialyl-Lewis x (KANEKO et al., 1999; NATSUKA; LOWE, 1994); adição de fucose a asparagina GlcNAc (MIYOSHI et al., 1999); e adição de fucose diretamente a cadeias polipeptídicas (WANG et al., 2001). Sendo assim, essa propriedade funcional, dentro da composição dos oligossacarídeos, conferem à fucose um importante papel na saúde do sistema imune.

A expressão dessas fucosiltransferases pode ser regulada também pela flora bacteriana como descrito por Hooper (2014). Camundongos estéreis microbiologicamente, ao serem colonizados por bactérias, foram capazes de aumentar a expressão da FUT2. Conseqüentemente, houve uma modificação da cadeia de carboidratos presentes nas células epiteliais, que tiveram como componente terminal a fucose.

Nesse sentido, a saúde da flora intestinal pode ser vista como um importante componente da manutenção do desenvolvimento normal do animal, e o fornecimento da fucose via dieta pode auxiliar nesse sentido. Foi comprovado que as bactérias são capazes de crescer com a fucose como única fonte de esqueleto de carbono e energia (HOOPER, 2014). As etapas para essa via incluem a entrada da fucose livre para na célula através de uma permease bacteriana, a isomerização da fucose (aldose) para formar uma fuculose (cetose), a fosforilação da fuculose para formar uma fuculose-1-fosfato, e uma reação de aldolase para formar a lactaldeído e di-hidroxicetona fosfato (CHEN et al., 1987; HOOPER et al., 1999; ZHU; LIN, 1988). Foi proposto que a fucose também pode ser sintetizada a partir de duas unidades de três carbonos por uma via operando no sentido inverso de sua via catabólica (HUANG et al., 1958a, 1958b), porém essa síntese não seria necessária, caso a fucose fosse fornecida pela dieta, economizando assim um gasto energético para a sua biossíntese.

Considerando que esse monossacarídeo foi absorvido, como mostram os dados de cromatografia, além de sua utilização como estrutura fundamental de glicanos específicos como já citado anteriormente, pode-se supor que ele poderia ser utilizado como fonte de energia para o próprio animal, assim como a glicose. Uma via catabólica para utilização de fucose livre como uma fonte de energia não foi totalmente comprovada em células de mamífero. Em um estudo envolvendo a administração intravenosa de fucose (1-14C) a pacientes humanos, foi relatado que 39% da radioatividade injetada foi excretada na forma de

$^{14}\text{CO}_2$ (SEGAL; TOPPER, 1960), sugerindo que a fucose poderia ser metabolizada a unidades metabólicas menores. Em um trabalho *in vitro*, foi identificada uma via catabólica, em extratos de hepatócitos suínos, que pode converter 1 mol de fucose a 2 moles de L-lactato (CHAN et al., 1979).

Apesar dessas suposições, ainda não se tem conhecimento científico o suficiente para extrapolar para outras espécies e ainda não é clara as suas contribuições para o metabolismo *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que o polissacarídeo sulfatado Fucoïdan, usado em dietas para *Oreochromis niloticus* com 30 dias de cultivo, não foi eficaz em aumentar os parâmetros de desempenho e crescimento muscular. Os animais foram eficientes em quebrar as ligações α -(1-3) do polissacarídeo e assim absorverem o principal componente estrutural da molécula, o monossacarídeo fucose. O estudo foi capaz de direcionar as futuras pesquisas para o uso do fucoïdan como alimento funcional, não descartando, porém, a hipótese da sua ação inibitória à molécula da miostatina. São necessárias novas pesquisas a fim de se conhecer as exigências dos polissacarídeos sulfatados e seus efeitos no organismo em diferentes espécies de peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, J. et al. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 119, n. 4, p. 324-331, 2005.
- AGUIAR, D. H. et al. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal of fish Biology**, London, v. 67, p. 1-12, 2005.
- ALEXANDER, R. The orientation of muscle in the myomers of fishes. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 49, p. 263-290, 1969.
- ALFEI, L. et al. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L.). **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 38, p. 151-162, 1994.
- ALMEIDA, F. L. A. 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**, New York, v. 39, p. 1306-1311, 2008.
- ALMEIDA, F. L. A. et al. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**, New York, v. 41, p. 997-1004, 2010.
- AMTHOR, H. et al. Follistatin complexes Myostatin and antagonizes Myostatin mediated inhibition of myogenesis. **Developmental Biology**, San Diego, v. 270, p. 19-30, 2004.
- AMTHOR, H. et al. The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis. **Developmental Biology**, San Diego, v. 178, p. 343-362, 1996.
- ASSIS, J. M. F. et al. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 251-267, 2004.
- BECKER, D. J.; LOWE, J. B. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 41-53, 2003.

BERNFELD, M. et al. Functions of cell surface heparan sulfato proteoglycans. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 68, p. 729-777, 1999.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 29-40, 2003.

BIGA, F. W. ; GOETZ, P.R. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 291, n. 5, p. 1327-1337, 2006.

BIGA, P. R. et al. Growth hormone differentially regulates muscle myostatin1 and -2 and increases circulating cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 138, n. 1, p. 32-41, 2004.

BILAN, M. I. et al. Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium jezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 342, p. 586-596, 2007.

BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; USTUZHANINA, N. E. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, p. 719-730, 2002.

BLAGDEN, C. S. et al. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. **Genes Development**, Cold Spring Harbor, v. 11, p. 2163-2175, 1997.

BONE, Q. On the function of the two types of myotomal muscle fibre in elasmobranch fish. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 46, p. 321-349, 1966.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**: Brasil. Brasília, 2011.

BUCKINGHAM, M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 330, n. 6/7, p. 530-533, 2007.

- BURTIN, P. Nutritional value of seaweeds. **Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 2, n. 4, p. 498-503, 2003.
- CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 146, p. 60-78, 2007.
- CATACUTAN, M. R.; COLOSO, R. M. Effect of dietary protein to energy ratios on growth, survival, and body composition of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 131, p. 125-133, 1995.
- CHAN, J. Y.; NWOKORO, N. A.; SCHACHTER, H. L. Fucose metabolism in mammals. The conversion of L-fucose to two moles of L-lactate, of L-galactose to L-lactate and glycerate, and of D-arabinose to L-lactate and glycolate. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 254, p. 7060-7068, 1979.
- CHEN, Y. M.; ZHU, Y.; LIN, E. C. The organization of the fuc regulon specifying L-fucose dissimilation in *Escherichia coli* K12 as determined by gene cloning. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 210, p. 331-337, 1987.
- CHEVOLOT, L. et al. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 319, p. 154-165, 1999.
- CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RACQUELINE, J. A disaccharide repeat unit is the structure structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 330, p. 529-535, 2001.
- CHIZHOV, A. O. et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 320, p. 108-119, 1999.
- CONCHIE, J.; PERCIVAL, E. G. V. Fucoidin. Part II : The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*. **Journal of the Chemical Society**, London, p. 827-833, 1950.
- CRUZ-SUÁREZ, L. E. et al. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. . In: _____. Avances en nutrición acuícola. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Memórias...** Mérida: [s. n.], 2000. p. 19-22.

- CURRIE, P. D.; INGHAM, P. W. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: JOHNSTON, I. A. **Muscle development growth**. San Diego: Academic, 2001. p. 1-17.
- DAL PAI-SILVA, M. et al. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. **Archive of Fish Marine Research**, Praha, v. 50, n. 2, p. 149-160, 2003b.
- DAL PAI-SILVA, M. et al. Muscle fiber types in tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) from larval to adult: histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue and Cell**, Essex, v. 35, n. 3, p. 179-187, 2003a.
- DELBON, M. C. **Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus***. 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- DIETRICH, C. P. A model of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, London, v. 17, p. 5-15, 1984.
- DRIEDZIC, W. R. HOCHACHKA, P. W. Control of energy metabolism in fish white muscle. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 230, p. 579-582, 1976.
- DUBOWITZ, V.; BROOKE, M. H. **Muscle biopsy: a modern approach**. London: WB Saunders, 1973.
- ENGEL, A.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology: basic and clinical**. New York: McGraw-Hill, 1994. v. 1.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia culture**. Massachusetts: CABI, 2006.
- FIGUEIREDO, M. A. et al. Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. **Transgenic Research**, London, v. 21, n. 3, p. 457-469, 2011.
- FRANCK, G.; EDDY, T.; ANDRÉ, D. An atlas of fish histology: normal and pathological features. **Annals of Physics**, Brussels, v. 54, p. 1-219, 2009.

FRIEDMANN, T. Lessons for the stem cell discourse from the gene therapy experience. **Perspectives in Biology and Medicine**. Chicago, v. 48, n. 4, p. 585-591, 2005.

GALLAGHER, J. T. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 108, p. 357-361, 2001.

GARIKIPATI, D. K. et al. Characterization of Rainbow Trout Myostatin-2 Genes expression, and pseudogenization. **Endocrinology**, Baltimore, v. 148, n. 5, p. 2106–2115, 2007.

GONZALEZ-CADAVID, N. F. et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and hiv-infected men with muscle wasting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 14938-14943, 1998.

GOODMAN, L. A. **On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions**. 7th ed. Washington: Technometrics, 1965.

GREER-WALKER, M.; PULL, G. A. A survey of red and white muscle in marine fish. **Journal of fish Biology**, London, v. 7, p. 295–300, 1970.

HILL, J. J. et al. Regulation of Myostatin in vivo by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v. 20, p. 20, 2003.

HILL, J. J. et al. The Myostatin propeptide and the Follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of Myostatin in normal serum. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 40735–40741, 2002.

HILSDORF, A. W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 73-84, jan./jun. 1995.

HOLTERMAN, C. E.; RUDNICKI, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, Oxford, v. 16, p. 575-584, 2005.

HOOPER, L. V. Immune cells prompt gut epithelial cells to produce carbohydrate nutrients for resident bacteria. **Science**, Washington, v. 345, n. 6202, p. 1248 - 1249, Sept. 2014.

HOOPER, L. V. et al. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 9833-9838, 1999.

HUANG, P. C.; MILLER, O. N. Studies on the metabolism of lactaldehyde. IV. The metabolism of D-rhamnulose-1-phosphate and 6-deoxy-L-sorbose-1-phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 230, p. 805-815, 1958a.

HUANG, P. C.; MILLER, O. N. The metabolism of lactaldehyde. V. Metabolism of L-fucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 231, p. 201-205, 1958b.

HUSSEIN, M. M.; ABDEL, A.; SALEM, H. M. Some structural features of a new sulfated heteropolysaccharide from *Padina pavoia*. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 2133-2135, 1980b.

HUSSEIN, M. M.; ABDEL, A.; SALEM, H. M. Sulfated heteropolysaccharides from *Padina pavoia*. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 2131-2132, 1980a.

Jl, M. H. **Algae chemistry**. Beijing: Science, 1997.

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

JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, n. 12, p. 2249-2264, 2006.

JOHNSTON, I. A. et al. Phenotypic plasticity of early myogenesis and satellite cell numbers in Atlantic salmon spawning in upland and lowland tributaries of a river system. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 203, p. 2539-2552, 2000.

JOHNSTON, I. A. Mechanisms of Muscle Development and Responses to Temperature Change in Fish Larvae. **American Fisheries Society Symposium**, New York, v. 40, p. 85-116, 2004.

JOHNSTON, I. A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. **Atlantic**, Boston, v. 99, p. 115, 1999.

JOHNSTON, I. A. **Muscle development growth**. San Diego: Academic, 2001. p. 1-17.

JOHNSTON, I. A. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. **Cell Tissue Research**, New York, v. 214, p. 369-379, 1981.

JOHNSTON, I. A. Specialization of fish muscle. In: GOLDSPIK, D. F. (Ed.). **Development and specializations of muscle**. Cambridge: Cambridge University, 1980. p. 123-148.

KANEKO, M. et al. Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 452, p. 237-242, 1999.

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3. ed. . São Paulo: Manole, 2005.

KELLY, R. J. et al. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2) fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non- secretor phenotype. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 4640-4649, 1995.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology**, Aberdeen, v. 26, p. 259-315, 1988.

KOLSET, S. O.; SALMIVIRTA, M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 56, p. 856-870, 1999.

KOUMANS, J. T. M.; SKER, H. A. Myogenic cells in development and growth of fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 110, p. 3-20, 1995.

KRIVICKAS, L. S. et al. Single muscle fiber contractile properties in adults with muscular dystrophy treated with MYO-029. **Muscle Nerve**. New York, v. 39, n. 1, p. 3-9, 2009.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias. **Panorama da Aquicultura**, São Paulo, v. 9, n. 52, p. 42-50, abr. 2000.

LANGLEY, B. et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 49831–49840, 2002.

LARSEN, R. D. et al. Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-Dgalactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 87, p. 6674-6678, 1990.

LEE, C. Y. et al. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a doublemuscle effect in transgenic zebrafish. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 387, n. 4, p. 766-771, 2009.

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. C.; Regulation of Myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, 9306–9311, 2001.

LEE, S. J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Baltimore, v. 20, p. 61–86, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LI, B. et al. Fucoïdan: structure and bioactivity. **Molecules**, Basel, v. 13, p. 1671-1695, 2008.

LIMA, P. C. R. et al. Effect of sulfated polysaccharides from the marine brown alga *Spatoglossum schroederi* in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 40, n. 1, p. 79-85, Jan./Mar. 2009.

MACARTAIN, P. et al. Nutritional value of edible seaweeds. **Nutrition Reviews**, New York, v. 65, n. 12, p. 535-543, 2007.

MARECO, E. A. **Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT**. 2012. 63 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, v. 9, p. 493-495, 1961.

MAYER, A. M. S. et al. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1790, p. 283-308, 2009.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J.; LAWLER, A. M. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, London, v. 387, p. 83-90, 1997.

MELO, M. R. S. et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 49, p. 491-498, 2002.

MIAN, J.; PERCIVAL, E. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea* and *Bifurcaria bifurcata* Part II. structural studies of the “fucans”. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 26, p. 147-161, 1973.

MIYOSHI, E. et al. The alpha1-6- fucosyltransferase gene and its biological significance. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1473, p. 9-20, 1999.

MOURÃO, P. A. S. ‘Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives’. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 10 n. 9, p. 967, 2004.

NATSUKA, S.; LOWE, J. B. Enzymes involved in mammalian oligosaccharide biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 4, p. 683-691, 1994.

NISHINO, T.; NAGUMO, T.; KIYOHARA, H. Structure characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 211, p. 77-90, 1991.

O'NEILL, A. N. Degradative studies on fucoidan. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 76, p. 5074-5076, 1954.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MEN. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>>. Acesso em: 17 out. 2009.

ONOFRE-OLIVEIRA, P. C. G. **Avaliação do padrão de degeneração e regeneração muscular em diferentes modelos murinos para distrofinas musculares progressivas**. 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ORTIZ, J. et al. Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystic pyrifera*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Berlin, v. 111, p. 320-327, 2009.

OSTBYE, T. K. K. et al. Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. **Gene**, Amsterdam, v. 403, n. 1/2, p. 159-69, 2007.

O'SULLIVAN, L. et al. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, p. 2038-2064, 2010.

OTTO, A.; PATEL, K. Signalling and the control of skeletal muscle size. **Experimental Cell Research**, New York, v. 316, n. 18, p. 3059-3066, 2010.

PATANKAR, M. S. et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 21770- 21776, 1993.

PATEL, K.; AMTHOR, H. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade – new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 117-126, 2005.

PATRUNO, M. et al. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor- I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 331, n. 3, p. 643-658, 2008.

PARKER, M. H.; SEALE, P.; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. **Nature Reviews - Genetics**, London, v. 4, n. 7, p. 497-507, 2003.

PELEGRI, F. The role of maternal factors in Early Zebrafish development. In: KORZH, V.; GONG, Z. (Ed.). **Fish development and genetics the Zebrafish and medaka models**. 2nd ed. Singapore: World Scientific, 2004. p. 1-38.

PERCIVAL, E. G. V.; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. London: Academic, 1967. p. 219.

PERCIVAL, E.; ROSS, A. G. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 145, p. 717-720, 1950.

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: comparison between the regular repetitive and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, p. 7656-7667, 1999.

POMIN, V. H. **Fucanas e galactanas sulfatadas: estrutura, biologia e filogenia**. Rio de Janeiro: UFRJ, IBqM, 2008. 231 p.

RAMAZANOV, Z.; JIMENEZ DEL RIO, M.; ZIEGENFUSS, T. Sulfated polysaccharides of brown seaweed *Cystoseira canariensis* bind to serum myostatin protein. **Acta Physiologica and Pharmacologica**, Bulgarica, v. 27, p. 101–106, 2003.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

RESCAN, P. Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, p.130, 2001. Part B.

RIOS, R. I. et al. Myostatin regulates cell survival during c2c12 myogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 280, p. 561-566, 2001.

ROCHA, H. A. O. et al. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröederi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, London, v. 34, p. 621-626, 2001.

ROCHA, H. A. O. et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the Brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, p. 41278–41288, 2005.

ROCHA, H. A. O. et al. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In: VERLI, H. (Ed.). **Carbohydrate structure and biological function**. Kerala: Transworld Research Network, 2006.

RODGERS, B. D. et al. A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. American journal of physiology. **Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 292, n. 2, p. 371-372, 2007.

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**, Baltimore, v. 142, n. 4, p. 1412-1418, 2001.

ROMANA-EGUIA, M. R. R. et al. Genetic diversity in farmed Asian, Nile, and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, p.131-150, 2004.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). **Muscle development and growth**. London: Academic, 2001. p. 103–140.

SALEK-ARDAKANI, S. et al. Heparin and heparan sulphate bind interleukin-10 and modulate its activity. **Blood**, Edinburg, v. 96, p. 1879-1888, 2000.

SANDERSON, R. D. Heparan sulfato proteoglycan in invasion and metastasis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 12, p. 89-98, 2001.

SÄNGER, A. M.; CLAASSEN, H.; ADAM, H. The arrangement of muscle fiber types in the axial muscle of various cyprinids (Teleostei). **Zoologischer Anzeiger**, Jena, v. 221, p. 44-49, 1990.

SÄNGER, A. M. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 33, p. 97-104, 1992.

SÄNGER, A. M. STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). **Muscle developmental and growth**. San Diego: Academic, 2001. p.141-184. (Fish Physiology, 18).

SANTOS, V. B. Aspectos morfológicos da musculatura lateral dos peixes. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 1, p. 127-135, 2007.

SEGAL, S.; TOPPER, Y. J. On the biosynthesis of L-fucose and Lfucose metabolism in man. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 42, p. 147-151, 1960.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Aquicultura e pesca: tilápias**. São Paulo, 2008. 160 p.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Cross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. **Neuromuscular Disorders**, Oxford, v. 17, p. 9, p. 721-722, 2007.

SIMPSON, A. G. B.; ROGER, A. J. The real, kingdoms" of eukaryotes. **Current Biology**, London, v. 14, n. 17, p. 693-696, 2004.

SOUZA, M. R. L. Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de filé e de subprodutos do processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 1076-1084, 2002.

STELLABOTTE, F.; DEVOTO, S. H. The teleost dermomyotome. **Developmental Dynamics**, New York, v. 236, n. 9, p. 2432-2443, 2007.

SUTTER, N. B. et al. A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. **Science**, Washington, v. 316. n. 5821, p. 112-115, 2007.

TASHIBANA, L. et al. Densidade de estocagem de pós-larvas de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 483-488, 2008.

TAYLOR, W. E.; BHASIN, S.; GONZALEZ-CADAVID, N. Myostatin regulates expression of genes involved in proliferation and differentiation of skeletal muscle cells. **Endocrinology Annual Meeting**, 2001.

THOMAS, M. et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, 40235–40243, 2000.

TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Differences in the non-reducing ends of heparan sulfatos excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: new tool for structural studies and differential dianosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes. **Laboratory Investigations**, London, v. 75, p. 771-781, 1996.

TRAIKALGAR, R. F. et al. Influence of dietary fucoidan supplementation on growth and immunological response of juvenile *Marsupenaeus japonicas*. **Journal of the World Aquaculture Society**. Baton Rouge, v. 41, n.2, May 2010.

TULLER, J.; DE SANTIS, C.; JERRY, D. R. Dietary influence of Fucoidan supplementation on growth of *Lates calcarifer* (Bloch). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 45, p. 749–754, 2014.

VALENTE, L. M. P. et al. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of Rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 55, p. 675–691, 1999.

VASYUTINA, E.; LENHARD, D. C.; BIRCHMEIER, C. Notch function in Myogenesis ND SC RIB. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 6, p. 1451-1454, 2007.

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

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WALSH, F. S.; CELESTE, A. J. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 1513-1517, 2005.

WANG, Y. et al. Modification of epidermal growth factorlike repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, p. 40338-40345, 2001.

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

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. Dynamics of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth. **Experientia**, Basel, v. 41, n. 3, p. 353-354, 1985.

WEATHERLEY, A. H.; GILL, H. S. **The biology of fish growth**. London: Academic, 1987.

WOLFMAN, N. M. et al. Activation of latent Myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 15842–15846, 2003.

WOLPERT, L. et al. **Principios da biologia do desenvolvimento**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 484 p.

ZHANG, G.; SWANK, D. M.; ROME, L. C. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenotomus chrysops*. **Journal of Morphology**, New York, v. 229, n. 1, p. 71-81, 1996.

ZHANG, S.; BHATTACHARYA, H.; LI, H. Embryogenesis and Development. In: JAMIESON, B. G. M. (Ed.). **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and bony fishes)**. Enfield: Science, 2009. v. 8, p. 485- 511.

ZHU, Y.; LIN, E.C. A mutant crp allele that differentially activates the operons of the fuc regulon in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 2352-2358, 1988.

ZIMMERMAN, A. M.; LOWERY, M. S. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 284, p. 299–308, 1999.

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