



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
TOCANTINS
CAMPUS PALMAS
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA AGRONÔMICA**

JUCELIA DENISE NASCIMENTO PEREIRA

**INFLUÊNCIA DO FÓSFORO DIETÉTICO NA EXPRESSÃO DE GENES
MIOGÊNICOS E OSTEOGÊNICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO
ÓSSEO E MUSCULAR DE ALEVINOS DE TAMBAQUI (*Collossoma macropomum*)**

**PALMAS - TO
2025**

JUCELIA DENISE NASCIMENTO PEREIRA

**INFLUÊNCIA DO FÓSFORO DIETÉTICO NA EXPRESSÃO DE GENES
MIOGÊNICOS E OSTEOGÊNICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO
ÓSSEO E MUSCULAR DE ALEVINOS DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Engenharia Agrônômica da Unidade Palmas, do
Instituto Federal do Tocantins, como exigência à
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Agrônômica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Silveira
Gonçalves

Coorientador: Dr. Eduardo Sousa Varela

**PALMAS - TO
2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas do Instituto Federal do Tocantins

P436i Pereira, Jucelia Denise Nascimento
INFLUÊNCIA DO FÓSFORO DIETÉTICO NA EXPRESSÃO DE
GENES MIOGÊNICOS E OSTEOGÊNICOS ENVOLVIDOS NO
DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E MUSCULAR DE ALEVINOS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) / Jucelia Denise Nascimento
Pereira. – Palmas, TO, 2025.
70 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) –
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Campus
Palmas, Palmas, TO, 2025.

Orientador: Dr. Antônio Carlos Silveira Gonçalves
Coorientador: Dr. Eduardo Sousa Varela

1. Tambaqui. 2. Espinhas intermusculares. 3. Expressão gênica. I.
Gonçalves, Antônio Carlos Silveira. II. Varela, Eduardo Sousa. III. Título.

CDD 630

A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio, deste documento é autorizada para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica do IFTO com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO TOCANTINS
CAMPUS PALMAS - TO
COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR BACHARELADO EM ENGENHARIA AGRONÔMICA

JUCELIA DENISE NASCIMENTO PEREIRA

INFLUÊNCIA DO FÓSFORO DIETÉTICO NA EXPRESSÃO DE GENES MIOGÊNICOS E OSTEOGÊNICOS ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E MUSCULAR DE ALEVINOS DE TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Superior Bacharelado em Engenharia Agrônômica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins - *Campus* Palmas - TO, como exigência à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Agrônômica.

Aprovado em: 04 de agosto de 2025

BANCA AVALIADORA

Prof. Dr. Antônio Carlos Silveira Gonçalves
IFTO - Campus Palmas - TO.

Profa. Dra. Vanessa David Domingos Valença
IFTO - Campus Palmas - TO.

Prof. Dr. Clauber Rosanova
IFTO - Campus Palmas - TO.

Palmas - TO, 04 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa David Domingos Valença, Servidor**, em 04/08/2025, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Silveira Goncalves, Servidor**, em 04/08/2025, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clauber Rosanova, Servidor**, em 04/08/2025, às 15:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ifto.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2852094** e o código CRC **C3C30D44**.



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO TOCANTINS

Campus Palmas 310 Sul, Av. LO 5, s/n, esquina com a Avenida NS 10 - Plano Diretor Sul — CEP 77021-090 Palmas/TO - portal.ifto.edu.br — reitoria@ifto.edu.br

Referência: Processo nº 23236.015753/2025-18

SEI nº 2852094

Dedico este trabalho aos meus pais João e Mauranice, cuja dedicação e o suor do campo foram a semente que floresceu na formação de suas três filhas. A vocês dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido o dom da vida, e por todas as experiências vividas ao longo da minha jornada até a conquista da sonhada graduação. Compreendo que tu que vivi neste período, desde os momentos difíceis e as alegrias faziam parte do seu propósito para minha construção como pessoa. Agradeço pelas pessoas maravilhosas que o Senhor colocou ao meu lado durante essa trajetória, e pela saúde que me concedeu todos os dias para correr atrás dos meus objetivos. Sou grata por ter guardado com carinho a minha família em especial meus pais durante todo esse período que me ausentei em busca dessa realização.

De forma especial agradeço aos meus pais João e Mauranice pelo esforço, dedicação e empenho em prol dos meus estudos. Sou grata a vocês por tudo, pelo amor, carinho e apoio incondicional. Agradeço pelos sacrifícios que fizeram para que pudesse estudar, pois sei que a lida do campo não é fácil. Vi vocês, mesmo que sem poder, levantar às quatro da manhã para trabalhar para que não faltasse nada para nós, e graças ao suor e esforço de vocês, estou realizando meus sonhos. Sem o apoio de vocês em todos os sentidos eu não conseguiria, então do fundo do meu coração, dedico o título de Engenheira Agrônoma à vocês. Não existem palavras neste mundo que consigam expressar a gratidão que sinto por serem meus pais.

Às minhas irmãs Joice e Janice, meu muito obrigado por estarem sempre comigo em todos os momentos que precisei. À minha irmã Joice, obrigado por sempre me auxiliar nos meus trabalhos acadêmicos. Como excelente jornalista, sempre revisou detalhadamente cada trabalho que realizei, e como uma boa designer, ajudou na construção das minhas apresentações sensacionais de seminários. À minha parceira de IFTO nestes cinco anos de caminhada, Janice, meu muito obrigado pelo suporte nos meus trabalhos de campo. Sempre me auxiliando nos trabalhos práticos, molhou horta, tratou de peixe, coletou insetos e plantas comigo. Agradeço por serem minhas irmãs e melhores amigas. Agradeço aos meus avós, tios e tias, que mesmo de longe, sempre acompanharam e torceram por mim ao longo da minha jornada.

Ao meu orientador, professor Antônio Carlos, meu muito obrigada por tudo que fez por mim durante a construção deste trabalho. A sua orientação, cuidado e atenção foi peça primordial nesta reta final. Obrigado pelos ensinamentos e companheirismo durante os projetos que trabalhamos juntos, que sem dúvida, foram primordiais para que o escolhesse como orientador. Agradeço também ao meu coorientador, Dr. Eduardo Varela, por ter confiado a mim a condução deste trabalho. Sou grata por tudo que vocês fizeram por mim!

Agradeço imensamente a meus amigos, José, Celeste, Valdileia, Cleane e em especial, Maria Lina que sempre se fez presente na casa de meus pais fazendo companhia a eles. Agradeço a Dona Isabel e Alice pelo apoio e carinho, vocês são minha segunda família. Aos meus companheiros de curso, Anna Olívia, Francyelma, Francyele, Carolina, Wanderley, Eduardo e Sarah, obrigado por terem sido a melhor equipe de estudos, me proporcionado momentos maravilhosos. Aos meus parceiros de trabalho Fellipe e Samara por alegrarem as minhas manhãs no estágio e terem sido excelentes colegas de curso. À minha companheira fiel de laboratório Maria, muito obrigado pelo apoio e companheirismo durante a realização do TCC. Obrigada Vitoria Andrade por seus conselhos e trocas de experiências nessa reta final.

Aos meus colegas da Embrapa Cherrle, Thallysson, Kércia, Rayllane, Ana Beatriz, obrigado por fazerem parte da construção deste trabalho. Ao Dr. Geice Ribeiro, agradeço imensamente por todo suporte fornecido para construção deste trabalho, desde correção, indicações de leituras, interpretação de dados e principalmente por todo conhecimento transmitido desde que integrei a equipe do laboratório K da Embrapa. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio.

Agradeço imensamente a toda a equipe da Embrapa Pesca e Aquicultura, que me acolheu e proporcionou todo conhecimento e suporte. Aos seus parceiros FAPTO, CNPQ e FAPED pelo financiamento das bolsas de iniciação científica, que foram cruciais para a realização deste trabalho.

Por fim gostaria de agradecer a todos os meus professores, e as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação. Este trabalho é fruto dessa construção coletiva, pois sozinha não se consegue nada nesta vida. A todos vocês que fizeram parte desta jornada, meu muito obrigada!

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez”

Thomas Edison

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie nativa de importância econômica da piscicultura brasileira, ocupando o segundo lugar na produção nacional de peixes. Entretanto, a presença de espinhas intermusculares (IBs), tem promovido um impacto significativo na expansão da comercialização da espécie. Distribuídas ao longo da musculatura, a ocorrência das IBs reduz o valor comercial do pescado, dificulta o processamento do filé e está associado à rejeição dos consumidores, devido a potenciais complicações de saúde decorrentes de sua ingestão. Recentemente, um plantel de tambaquis foi identificado sem a presença das IBs, sugerindo que variações genéticas podem estar envolvidas na presença do fenótipo mutante. Portanto, o objetivo deste trabalho é investigar o perfil de expressão de genes miogênicos e osteogênicos em alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a diferentes níveis de fósforo na dieta, visando compreender como a restrição do fósforo interfere nos mecanismos genéticos envolvidos na formação e desenvolvimento das espinhas intermusculares. Os animais foram submetidos a três dietas experimentais com níveis crescentes de suplementação de fósforo na ração (0%, 0,35% e 0,70%) durante o período de larvicultura *indoor* em sistema de recirculação de água (RAS) por um período de 29 dias (69 dias após a eclosão). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições por dieta (12 tanques amostrais), dispostos de forma aleatória. Para a visualização das IBs utilizou a técnica de diafanização, e posteriormente foi realizada a contagem das estruturas ósseas. A Expressão relativa dos genes miogênicos *mstna* e *mstnb* e osteogênico *runx2b*, *runx2a*, *sxxa*, *collala*, *collalb*, *l-bmp6*, *xirp2b* e *tnmd* foram avaliados por qRT-PCR a partir da síntese de cDNA do RNA extraído do músculo branco dorsal sem pele contendo músculo, tecido conectivo e osso. Os resultados da diafanização demonstraram que a disponibilidade de P é crucial para a formação das IBs. Os animais alimentados com a dieta 0% apresentaram redução das IBs em comparação com o grupo 0,70%, apresentando diferença significativa na média do número de espinhas entre os grupos ($p < 0,01$). A análise da expressão gênica relativa indicou que os genes *Coll1b* e *Mstna* apresentaram diferença significativa entre os tratamentos 0% e 0,70% ($p < 0,05$). Estes resultados reforçam a importância do fósforo como modulador da biologia óssea em peixes neotropicais.

Palavras-chave: Tambaqui. Espinhas intermusculares. Expressão gênica. Macromineral.

ABSTRACT

The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the main native species of economic importance in Brazilian aquaculture, ranking second in national fish production. However, the presence of intermuscular bones (IBs) has significantly impacted the expansion of the species' commercialization. Distributed throughout the musculature, the occurrence of IBs reduces the commercial value of the fish, complicates the processing of the fillet, and is associated with consumer rejection due to potential health complications arising from their ingestion. Recently, a stock of tambaqui was identified without the presence of IBs, suggesting that genetic variations may be involved in the presence of the mutant phenotype. Therefore, the objective of this work is to investigate the expression profile of myogenic and osteogenic genes in tambaqui fry (*Colossoma macropomum*) subjected to different levels of phosphorus in the diet, aiming to understand how phosphorus restriction interferes with the genetic mechanisms involved in the formation and development of intermuscular bones. The animals were subjected to three experimental diets with increasing levels of phosphorus supplementation in the feed (0%, 0.35%, and 0.70%) during the indoor larviculture period in a recirculating aquaculture system (RAS) for a period of 29 days (69 days after hatching). The experimental design used was completely randomized, with four repetitions per diet (12 sample tanks), arranged randomly. For the visualization of IBs, the technique of clearing was used, and subsequently, the counting of the bone structures was performed. The relative expression of the myogenic genes *mstna* and *mstnb* and the osteogenic genes *runx2b*, *runx2a*, *scxa*, *coll1a1a*, *coll1a1b*, *1-bmp6*, *xirp2b*, and *tnmd* were evaluated by qRT-PCR from the cDNA synthesis of RNA extracted from the skinless dorsal white muscle containing muscle, connective tissue, and bone. The results of the clearing process demonstrated that the availability of P is crucial for the formation of IBs. The animals fed the 0% diet showed a reduction in IBs compared to the 0.70% group, with a significant difference in the average number of spines between the groups ($p < 0.01$). The analysis of relative gene expression indicated that the genes *Cola1b* and *Mstna* showed a significant difference between the 0% and 0.70% treatments ($p < 0.05$). These results reinforce the importance of phosphorus as a modulator of bone biology in neotropical fish.

Keywords: Tambaqui. Intermuscular bones. Gene expression. Macromineral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Gráfico da produção de peixe de cultivo no Brasil.....	18
Figura 2 — Alevino de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	20
Figura 3 — Espinhas intermusculares em Tambaqui.....	21
Figura 4 — (A) - Espécie completamente dissecada com os diferentes ossos organizados de acordo com a ordem de coleta. (B) —Tipos de ossos intermusculares (tipo I = espinho sem bifurcação; tipo II = espinho bifurcado incompleto; tipo III = espinho em forma de Y; tipo IV = espinho tipo dois dentes em uma extremidade; tipo V = espinho tipo dois dentes em duas extremidades; tipo VI = múltiplos espinhos bifurcados em ambas as extremidades.....	25
Figura 5 — Ossos intermusculares (epineurais [en] e epipleurais [ep]) de uma carpa gibel (<i>Carassius gibelio</i>).....	26
Figura 6 — Sistema de produção de tambaqui em caixas de PVC 500L e oxigenação controlada.....	29
Figura 7 — Plano experimental com a distribuição das caixas com as dietas experimentais de fósforo (0%, 0,35% e 0,70%) no sistema de produção.....	30
Figura 8 — Biometria dos alevinos de Tambaqui.....	33
Figura 9 — Região da coleta de músculo para extração de RNA.....	34
Figura 10 — Ilustração das etapas da extração de RNA total.....	35
Figura 11 — Gráfico de regressão da análise do fósforo total e dissolvido na água antes e durante o experimento.....	40
Figura 12 — Espécimes de alevinos de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) com 29 dias de experimentação diafanizados e corados utilizando a metodologia descrita por Taylor e Van Dyke (1985) com os tecidos moles transparentes, corando seletivamente o tecido ósseo com alizarina nos tons de rosa e roxo.....	44
Figura 13 - Gráfico da Média do número IBs em alevinos de tambaqui sob diferentes níveis de suplementação de fósforo.....	45
Figura 14 — Avaliação da pureza e integridade do RNA extraído das amostras de cérebro e músculo.....	47

Figura 15 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes <i>Coll1a1a</i> (A); <i>1-bmp6</i> (B); <i>Runx2a</i> (C); <i>Scxa</i> (D); <i>Xirp2b</i> (E) e <i>Tnmd</i> (F).....	48
Figura 16 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR do gene <i>Coll1a1b</i>	50
Figura 17 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes <i>Mstnb</i> (A) e <i>Mstna</i> (B).....	52
Figura 18 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes <i>1-PLX 1</i> (A) e <i>1-PLX 2</i> (B).....	53
Figura 19 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes <i>Xirp2b</i> (A); <i>Coll1a1a</i> (B); <i>Tnmd</i> (C); <i>Mstna</i> (D); <i>Mstnb</i> (E); <i>Runx2b</i> (F); <i>Scxa</i> (G) e <i>1-PLX 1</i> (H) no cérebro.....	55
Figura 20 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR do gene <i>1-bmp6</i> no cérebro.....	57
Figura 21 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR do gene <i>1 PLX 2</i> no cérebro.....	58
Figura 22 - Heatmap da expressão diferencial entre cérebro e músculo. A intensidade das cores representa o nível de expressão gênica: tons de azul escuro indicam alta expressão, enquanto amarelo claro indica baixa expressão, conforme a escala de cores à direita (variando de -2 a 2).....	59

LISTA TABELAS

Tabela 1 — Formulação e composição química das dietas experimentais (g kg ⁻¹).....	32
Tabela 2 — Sequência de primers utilizados para análise da expressão gênica.....	38
Tabela 3 — Médias de peso e comprimento dos alevinos de tambaqui submetidos a suplementação com diferentes níveis de fósforo, avaliadas aos 14 dias e no período final.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Objetivos.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Aquicultura: conceito e relevância.....	16
2.2	Panorama da produção piscícola no Brasil: Tocantins um estado em ascensão.....	17
2.3	Desafios da comercialização do Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	19
2.4	Papel do fósforo no desenvolvimento de peixes.....	22
2.5	Genes - chaves responsáveis pela formação muscular e óssea.....	23
2.6	Desenvolvimento das espinhas intermusculares (IBs).....	24
2.6.1	Aspectos morfológicos e funcionais das espinhas intermusculares (IBs).....	24
2.6.2	Mecanismos Moleculares envolvidos na Formação de IBs.....	26
3	METODOLOGIA.....	29
3.1	Montagem do experimento.....	29
3.2	Variáveis monitoradas no experimento.....	30
3.3	Coleta das amostras biológicas.....	33
3.4	Isolamento do RNA total e síntese de cDNA.....	34
3.5	Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	36
3.6	Diafanização.....	39
3.7	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
4.1	Avaliação dos parâmetros de qualidade da água.....	40
4.2	Desenvolvimento dos animais.....	41
4.3	Diafanização.....	42
4.4	Avaliação da pureza e integridade do RNA extraído.....	46
4.5	Expressão relativa dos genes osteogênicos e miogênicos.....	47
4.6	Expressão relativa dos genes no cérebro.....	54
4.7	Padrões de expressão diferencial entre cérebro e músculo.....	59
5	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das principais espécies de importância econômica da piscicultura brasileira, ocupando o segundo lugar na produção nacional de peixes, atrás apenas da tilápia (*Oreochromis niloticus*) (PEDROZA FILHO *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2021). No entanto, a presença de espinhas intermusculares (IBs), ou espinha “Y” vem promovendo um impacto negativo no setor. A ocorrência das IBs reduz o valor comercial do pescado, dificulta o processamento e gera rejeição por parte dos consumidores.

As IBs são consideradas um risco à saúde e segurança dos consumidores, principalmente de crianças e idosos, pois a ingestão destas estruturas pode resultar em complicações graves que podem ocasionar a morte (MUBANGO *et al.*, 2020). Sua formação envolve a via de ossificação intramembranosa (IO), sendo que várias proteínas e genes regulam a IO em diferentes fases. Componentes bioquímicos críticos como a proteína morfogenética óssea (bmp) e genes como o fator de transcrição 2 relacionados a Runt (*runx2/CBFA1*) e colágeno tipo I alfa 1 (*colla1a*), dentre outros são importantes na formação e manutenção dessas estruturas, incluindo o controle da deposição e cimentação de minerais (MUBANGO *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020).

Buscando elucidar os mecanismos moleculares que regulam a formação das IBs, a nutrigenômica emerge como um campo científico promissor. Esta área do conhecimento busca compreender como os componentes presentes na dieta afetam a expressão dos genes e como eles são induzidos ou reprimidos face a um determinado nutriente. Para os animais, mudanças na alimentação ao decorrer do desenvolvimento inicial podem provocar transformações permanentes no metabolismo, induzindo a modificações adaptativas a nível celular, molecular e bioquímico (FISCHER *et al.*, 2020; OLIVEIRA, 2024).

Para o desenvolvimento ósseo em peixes, a disponibilidade de macronutrientes durante as fases jovens é crucial. Dentre estes, o cálcio e o fósforo desempenham papel fundamental na nutrição e formação do sistema ósseo e muscular, sendo o segundo um componente essencial da hidroxiapatita, principal mineral que forma os ossos (BOGLIONE *et al.*, 2013). Portanto, compreender como a restrição deste macronutrientes na dieta interfere na expressão de genes relacionados à formação das IBs e de outros órgãos em tambaqui, ajuda a desvendar os processos moleculares envolvidos no seu desenvolvimento (HUITEMA *et al.*, 2012).

Diante deste contexto, por meio do presente estudo visa-se responder a seguinte questão de pesquisa: de que maneira as variações nos níveis de fósforo na dieta afetam a expressão de genes miogênicos e osteogênicos envolvidos na formação das espinhas

intermusculares e no desenvolvimento de outros órgãos em tambaqui (*Colossoma macropomum*)?

Perante a importância econômica do tambaqui para a região Norte do Brasil e para a piscicultura nacional, identificar os principais genes responsáveis pela formação das IBs, e como eles se correlacionam no desenvolvimento estrutural do animal, torna-se fundamental para impulsionar o melhoramento genético da espécie, bem como para posterior edição genética (CRISPR/Cas9), visando o desenvolvimento de linhagens de tambaqui com ausência dessa estrutura.

Portanto, compreender a expressão gênica a partir da quantificação relativa de mRNA de genes candidatos que podem estar ligados direta ou indiretamente à cascata de desenvolvimento das IBs é fundamental para elucidar os mecanismos que regulam a formação destas estruturas. Logo os resultados deste estudo poderão abrir caminho para a produção de pescado de alta qualidade, livre de espinhas, impulsionando a competitividade da piscicultura brasileira

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar o perfil de expressão de genes miogênicos e osteogênicos em alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a diferentes níveis de fósforo na dieta, visando compreender como a restrição do fósforo interfere nos mecanismos genéticos envolvidos na formação e desenvolvimento das espinhas intermusculares.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do fósforo na expressão de genes de desenvolvimento muscular;
- Avaliar a expressão gênica dos genes miogênicos e osteogênicos no cérebro de alevinos de tambaqui;
- Avaliar o efeito do fósforo na expressão de genes envolvidos nos processos de mineralização óssea do tambaqui.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aquicultura: conceito e relevância

A aquicultura refere-se ao cultivo de organismos que apresentam ciclo de vida total ou parcial em ambiente aquático, podendo ser subdividida de acordo com a classe dos organismos cultivados. Neste ramo estão incluídas as atividades produtivas da piscicultura (cultivo de peixes), carcinicultura (cultivo de crustáceos, como o camarão), malacocultura (cultivo de ostras, vieiras e mexilhões), ranicultura (cultivo de rãs) e algicultura (cultivo de algas). Todas estas categorias englobam desde a produção de alevinos e outras formas jovens, até as fases de despesca e comercialização da produção (BRASIL, 2015).

Para a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a aquicultura consiste no segmento responsável pelo cultivo de organismos aquáticos em águas continentais ou oceânicas. O setor vem se destacando como um dos mais dinâmicos para a produção de alimentos, sendo que nos últimos 25 anos a produção aquícola ultrapassou as demais *commodities* alimentares, evoluindo para uma indústria mais madura e tecnificada (SEBRAE, 2015; NAYLOR, FANG, FANZO, 2023).

No ano de 2022 a produção aquícola atingiu a marca de 130,9 milhões de toneladas, superando a pesca de captura como principal produtora de organismos aquáticos (FAO, 2024). Além do crescimento da produção, os produtos oriundos da aquicultura no ano de 2019 foram responsáveis pelo fornecimento de 17% da proteína de origem animal consumida no mundo. Em países de renda média e baixa o percentual do consumo chegou a 23% e em partes da Ásia e África esse percentual ultrapassou 50% da proteína animal consumida. O setor também é responsável pelo emprego de cerca de 58,5 milhões de pessoas (FAO, 2022).

Diante do crescimento populacional e da crescente demanda por alimentos, especialmente por proteínas, a aquicultura é considerada crucial para a garantia da segurança alimentar global, sendo capaz de assegurar a disponibilidade de alimentos (SIQUEIRA, 2018). Nessa perspectiva a aquicultura tem papel crucial para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) das Nações Unidas, em aliviar a pobreza (ODS 1) e a fome garantindo o fornecimento de nutrição adequada (ODS 2) e promover o crescimento socioeconômico sustentável (ODS 8) (ARUMUGAM *et al.*, 2023). A atividade apresenta bons índices produtivos, capaz de ampliar a produção de alimentos, a geração de renda e emprego e contribuir diretamente para a redução da pobreza e da fome em diversas regiões do mundo (SIQUEIRA, 2018).

Estimativas apontam que até 2030, a aquicultura superará a pesca de captura em cerca de 6 milhões de toneladas, tornando-se responsável por 52% de toda produção aquática, corroborando para atender a demanda por alimento, visto que até 2050 a população global será de 9 bilhões de pessoas (MAIR *et al.*, 2023). Neste cenário, o crescimento do comércio dos produtos aquáticos será impulsionado pela melhoria nas tecnologias de pós-colheita e canais de distribuição que apoiarão a expansão da comercialização de produtos aquáticos (FAO, 2022).

2.2 Panorama da produção piscícola no Brasil: Tocantins um Estado em ascensão

A piscicultura emergiu como uma das atividades de crescimento mais acelerado no cenário global, impulsionada pela crescente demanda por proteína animal e sua crucial relevância para a segurança alimentar. Dentre os principais países produtores, a China consolidou-se como líder global na produção de peixe, com um volume de 83,9 milhões de toneladas em 2020, o que representou 35% da produção mundial. Completando o grupo dos cinco maiores produtores, destacam-se Indonésia (21,8 milhões de toneladas), Índia (14 milhões de toneladas), Vietnã (8 milhões de toneladas) e Peru (5,8 milhões de toneladas), que em conjunto representam 58% da produção piscícola e aquícola (FAO, 2022; FERREIRA; MUNIZ; OLIVEIRA JUNIOR, 2024).

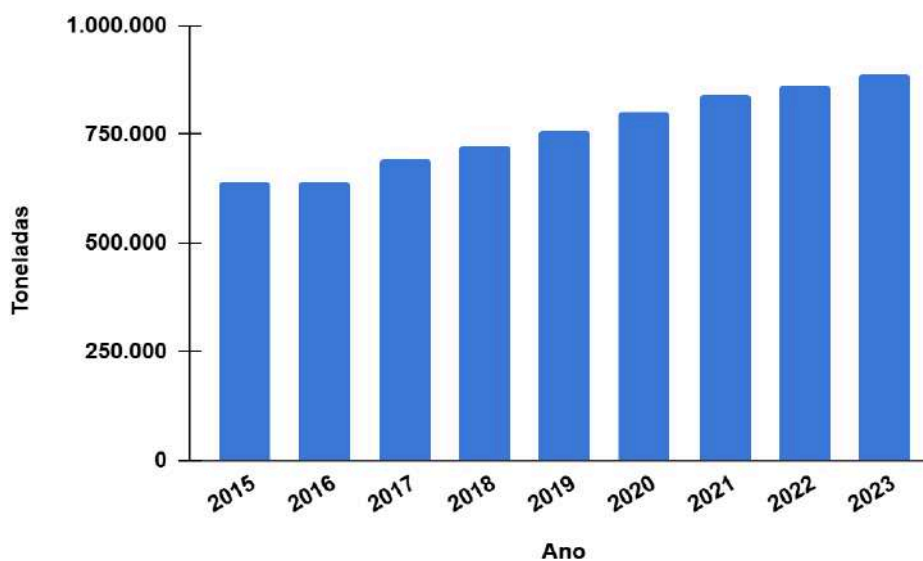
Neste cenário, o Brasil destaca-se entre os quinze maiores produtores mundiais, ocupando a 13ª posição na produção de peixes em cativeiro, e a 8ª posição na produção de peixes em água doce, sendo que em território nacional a piscicultura representa 82% da produção aquícola, com destaque especialmente para o cultivo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) (SIDONIO *et al.*, 2012; PEDROSA FILHO; ROUTLEDGE, 2016; FERREIRA, 2021). Para o agronegócio a atividade constitui-se como uma das mais importantes da cadeia produtiva de alimentos de origem animal, com uma taxa de crescimento constante. Em 2021, o setor cresceu 8,36% e alcançou uma participação significativa no PIB brasileiro, evidenciando sua relevância econômica (FAO, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Impulsionado pela constante demanda mundial por pescado, a piscicultura representa a atividade agropecuária de maior potencial para o mercado brasileiro (PINTO; GALVÃO, 2023). O país apresenta uma riqueza de recursos naturais que favorecem a competitividade do setor, como extensão territorial e diversidade climática que permitem o cultivo de diversas espécies, além da disponibilidade de recursos hídricos. Todos estes fatores posicionam o

Brasil como uma das potências para a produção de pescado, especialmente porque a produção de peixes precisará aumentar significativamente até 2050 para atender a demanda global por proteína de origem animal.

Consolidando sua hegemonia, como um dos principais produtores de peixes da América do Sul, de acordo com a Associação Brasileira da Piscicultura, o Brasil produziu 887.029 toneladas de peixe de cultivo em 2023, com crescimento de 3,1% (Figura 1) em relação ao ano anterior (860.355 toneladas). Quanto à participação das espécies na piscicultura nacional, a tilápia (*Oreochromis niloticus*) representou 65,3% da produção total (579.080 toneladas), seguida pelos peixes nativos que tiveram participação de 29,7% da produção (263.479 toneladas). Outras espécies como carpa, truta e pangásius apresentaram uma participação de 5%, com uma produção de 44.470 toneladas. O faturamento da atividade foi superior a R\$9 bilhões e o país exportou um total de 6.815 toneladas de peixes de cultivo, resultando em uma receita de US\$24,7 milhões, representando aumento de 4% em relação ao ano anterior (FAO, 2022; PEIXE BR, 2024).

Figura 1 — Gráfico da produção de peixe de cultivo no Brasil



Fonte: Adaptado de Peixe BR (2024).

Dentre as principais regiões produtoras, a região Sul, liderada pelo Paraná, concentrou um terço da produção nacional de peixe em 2023 (33,4%), totalizando 269.200 toneladas. As demais regiões contribuíram com percentuais menores: Nordeste (19,3%), Sudeste (18,7%), Norte (16,1%) e Centro-Oeste (12,5%). A região Norte, por sua vez, destacou-se na produção de peixes nativos, com Rondônia liderando o ranking nacional, alcançando 56.500 toneladas

em 2023, impulsionada principalmente pelo cultivo de tambaqui, uma das espécies mais cultivadas na região (PEIXE BR, 2024).

Outro estado que vem obtendo destaque na produção de peixe na região Norte do país é o Tocantins, que se encontra na 18^o posição no *ranking* nacional e ocupa a 3^o posição na região Norte. A principal espécie cultivada é o tambaqui (*Colossoma macropomum*), que representa aproximadamente 48% do volume total produzido, seguido pelos híbridos tambacu e tambatinga com 34% e pintados e seus híbridos com 10,49% (COSTA, 2023; PEIXE BR, 2024).

De acordo com dados da Peixe BR (2024), o estado do Tocantins em 2023 alcançou produção de 17.556 toneladas com crescimento de 1,19% em relação ao ano de 2022. Deste total produzido, a participação dos peixes nativos foi significativa, com uma produção de 17.136 toneladas, seguida pela tilápia que apresentou uma produção de 420 toneladas. No estado, os cinco maiores municípios produtores são Almas, Sítio Novo do Tocantins, Dianópolis, Porto Nacional e Maurilândia do Tocantins.

O clima favorável, a topografia e a disponibilidade de água posicionam o estado do Tocantins como um dos melhores para a piscicultura. Ele possui duas principais bacias hidrográficas, os rios Araguaia e Tocantins, que são fundamentais para o desenvolvimento da atividade. Além disso, abriga grandes reservatórios de usinas hidrelétricas como Lajeado e Peixe Angical, que também contribuem para a disponibilidade de água. A localização geográfica é outro fator que pode contribuir para o desenvolvimento da piscicultura, pois está próximo a grandes centros consumidores como Brasília e Goiânia, facilitando o escoamento da produção e o acesso a mercados (ALMEIDA; MENDES, 2015).

2.3 Desafios da comercialização do Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Entre as espécies de peixes teleósteos de importância comercial, o Tambaqui (*Colossoma macropomum*) descrito por Georges Cuvier em 1818 (Figura 2), destaca-se na piscicultura nacional, consolidando-se como o segundo mais produzido no Brasil, atrás apenas da Tilápia (*Oreochromis niloticus*) (IBGE, 2023). Pertencente à família Characidae e subfamília Serrasalminae a espécie é originária da América do Sul, especialmente das bacias hidrográficas dos rios Amazonas e Orinoco (DAIRIKI; SILVA, 2011; ARIDE *et al.*, 2020).

Figura 2 — Alevino de tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Fonte: Autora (2025).

Considerado o segundo maior peixe de escamas de água doce da América do Sul, atrás apenas do pirarucu (*Arapaima gigas*), o tambaqui pode atingir um metro de comprimento e pesar 30 kg em habitat natural. Sua morfologia é caracterizada por um corpo romboidal, que se torna levemente alongado na fase adulta, apresentando uma coloração parda no dorso e manchas escuras na região ventral, cuja intensidade varia conforme a tonalidade da água. Apresenta hábito alimentar onívoro, com preferência por microalgas na fase larval, zooplâncton e microalgas durante as fases jovens e frutos e sementes quando adultos (MORAIS; ALMEIDA, 2017; BRABO, 2017).

A espécie apresenta boa rusticidade favorecendo o cultivo em diversos sistemas como semi-intensivos (barragens, viveiros e tanques), e intensivos (viveiros e tanques com aeração mecânica e tanques redes). O tempo de produção do tambaqui perdura entre 10 a 12 meses, considerando uma densidade de estocagem de 10 juvenis/m², com uma taxa de sobrevivência de 85% e densidade de engorda de 3,250-4000 peixes/ha. O peso médio de venda é de 1,8 kg após 10 meses de engorda e 3,1 kg após 12 meses, resultando em um rendimento de 10,075 kg/ha/ano (BARÇANTE; SOUSA, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2024).

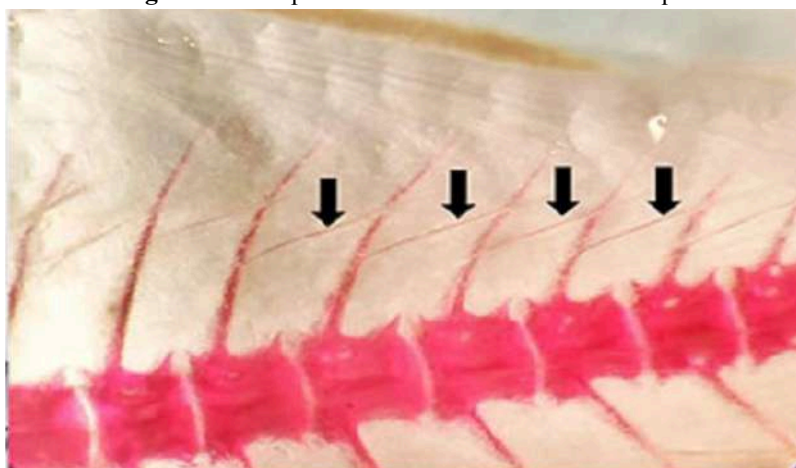
Em 2023, o tambaqui foi responsável pela produção de 113,6 mil toneladas, representando 17% da produção total de peixes. A alta popularidade da espécie está relacionada às suas características zootécnicas favoráveis para o cultivo, tais como facilidade na produção de alevinos, rápido crescimento em cativeiro, boa aceitação a alimentos artificiais, rusticidade, resistência a altas temperaturas da água, facilidade de comercialização e alto valor agregado de sua carne (BARÇANTE; SOUZA, 2015; PEIXE BR, 2024).

A carne do tambaqui é considerada iguaria devido às suas características desejáveis, como sabor, coloração branca, teor de gordura adequado e alto teor de proteína, o que a torna valorizada tanto no mercado nacional quanto internacional. Em 2023, as exportações do peixe totalizaram uma receita de US\$798.594 mil, acréscimo de 809% em relação ao ano anterior. O

volume exportado chegou a 79 toneladas, aumento de 364% em comparação a 2022, com destino principal para o Peru que absorveu 71% das exportações (OLIVEIRA *et al.*, 2024; PEIXE BR, 2024).

Entretanto, um dos principais entraves da expansão do consumo e industrialização do tambaqui é a presença de espinhas intermusculares ou ossos intermusculares em “Y” (IBs) (Figura 3), fator que limita seu consumo, especialmente em mercados mais exigentes, onde a preferência é por produtos sem espinhas (LIMA *et al.*, 2018). A presença das IBs, dificulta a diversificação de cortes, como tira, costela, lombo e filé. Assim como ocorre com o Tambaqui, outras espécies de peixes como o rohu (*Labeo rohita*) e a hilsa (*Tenulosailisha*), requerem processamento antes da comercialização, em virtude da presença dessas estruturas, o que dificulta a comercialização. (OLIVEIRA *et al.*, 2023; CIRNE *et al.*, 2019).

Figura 3 — Espinhas intermusculares em Tambaqui



Fonte: Panorama da Aquicultura (2019).

As IBs presentes em peixes teleósteos, como o tambaqui, são pequenos ossos localizados no miosepto estendendo-se horizontalmente. Esses ossos impactam negativamente o valor econômico desta espécie, pois limitam as opções de processamento e estão associadas ao risco de ferimentos. A presença dessas estruturas no músculo torna o peixe menos palatável e conseqüentemente, menos desejável no mercado. Isso acarreta impactos econômicos, uma vez que a agregação de valor está associada à possibilidade de diferentes cortes, como filé sem espinhas, costela e lombo sem espinhas, que são mais atrativos para os consumidores (OLIVEIRA *et al.*, 2024).

Nessa perspectiva, a presença das IBs na musculatura dos peixes torna-se um desafio para os piscicultores, visto que a eliminação total ou parcial destas estruturas pode potencialmente aumentar o consumo e a comercialização. Recentemente, foi identificado em

tambaquis um plantel sem a presença de ossos intermusculares, sugerindo a existência de variações fenotípicas. Essa descoberta representa um avanço para os programas de melhoramento da espécie, pois permite a seleção de indivíduos e a possibilidade da produção de linhagens com as características de ausência da espinha “Y” (XU *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

2.4 Papel do fósforo no desenvolvimento de peixes

O pleno desenvolvimento das espécies está associado à assimilação e metabolização de compostos que constituem as dietas fornecidas, sendo que a quantidade e qualidade dos nutrientes são determinados pelo ambiente em que vivem. Para a manutenção e desenvolvimento da vida animal, alguns minerais como o fósforo e o cálcio são requeridos em maiores quantidades (ROTTA, 2003; RODRIGUES, 2013; SOUZA, 2017; VALENTE, 2018).

Para os peixes em sistemas de produção, a dieta fornecida é a principal fonte de minerais, embora estes animais também sejam capazes de assimilar alguns minerais presente no ambiente, como o cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co) e selênio (Se), que podem atender às suas exigências nutricionais (LALL, 2022). Entretanto, a absorção de minerais como o fósforo (P), cloro (Cl), enxofre (S), manganês (Mn) e iodo (I), ocorre principalmente da dieta, uma vez que a quantidade disponível na água não é suficiente para atender sua exigência e sua utilização é limitada (SOUSA, 2017).

Considerado um dos macronutrientes de destaque na nutrição animal, o fósforo é fundamental para crescimento e reprodução dos peixes, estando amplamente distribuído por todas as células do organismo, nos quais desempenha funções importantes em diversos processos metabólicos. Este elemento químico encontra-se presente nos ácidos nucleicos, fosfolípidios, enzimas e compostos glicólicos, com participação na regulação de inúmeros processos metabólicos sendo um dos principais ânions da estrutura cristalina dos ossos (SOUSA, 2017; MENEZES *et al.*, 2021).

O processo de formação da matriz óssea e mineralização são processos interligados, mas ocorrem separadamente. A formação da matriz ocorre primeiro e em seguida a mineralização, que depende estritamente da ingestão alimentar de cálcio e fósforo (COTTI *et al.*, 2024). Nos vertebrados, grande parte do fósforo absorvido pelo corpo está presente como fosfato inorgânico (Pi), que cristaliza junto com o cálcio e outros micronutrientes formando a

hidroxiapatita, que endurece a matriz óssea extracelular atuando como estoque mineral interno (SUAREZ-BREGUA *et al.*, 2021).

O fósforo tem sido considerado o terceiro nutriente mais caro das rações e um dos mais poluentes, pois quando em altos teores contribui para a eutrofização do ambiente. Em contrapartida, a deficiência do fósforo na dieta pode resultar na redução da mineralização óssea, deformidades esqueléticas e baixo desempenho zootécnico dos animais. Logo, há a necessidade de elaborar rações que sejam mais completas com quantidades específicas de nutrientes, sobretudo de minerais como o fósforo que atendam às exigências dos animais (SOUZA *et al.*, 2020; SUAREZ-BREGUA *et al.*, 2021; MENEZES *et al.*, 2021).

2.5 Genes - chaves responsáveis pela formação muscular e óssea

Músculo e osso encontram-se intimamente conectados, embora sejam tecidos distintos atuam em conjunto na garantia da locomoção, bem como na manutenção da integridade estrutural e homeostase do corpo. Essa interação é mediada pela atuação de moléculas de sinalização, vias metabólicas e forças mecânicas que atuam na manutenção do sistema músculo esquelético, podendo dar indícios de uma possível correlação genética e molecular entre o sistema ósseo e muscular (BEBER, 2021; DALLE CARBONARE *et al.*, 2024).

A miostatina (MSTN), membro da superfamília TGF- β , bem como suas isoformas podem ser secretadas pelo músculo, mas também pelo osso. Este gene atua na inibição do crescimento muscular, desempenhando papel crucial na regulação de genes chaves para a formação óssea, como *sost*, *dkk1* e *rankl* (HUE *et al.*, 2023; GROBET *et al.*, 1997; KAMBADUR *et al.*, 1997; QIN *et al.*, 2017). Camundongos com ausência de miostatina apresentaram além de hipertrofia muscular, um aumento significativo na densidade óssea, reforçando as evidências sobre a existência de uma relação direta na interação bioquímica entre músculo e osso (HUE *et al.*, 2023).

Reconhecidas como indutores da formação óssea, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) também desempenham papéis importantes para manutenção e formação de diversos órgãos, como cartilagem, músculo, vasos sanguíneos e rins. Pertencente aos membros da família do fator de crescimento transformador β (TGF- β), atuam em inúmeros processos ao decorrer do desenvolvimento embrionário e homeostase (KATAGIRI; WATABE, 2016).

Embora as BMPs sejam amplamente estudadas devido ao papel na regulação do desenvolvimento ósseo, o papel no crescimento muscular gradualmente vem sendo investigado, devido a sinalização de BMPs ser fundamental para o aumento da produção de

células satélites do músculo esquelético (CHEN et al., 2021). Os autores ainda destacam que a hipertrofia muscular provocada pela inibição da miostatina ativa a via de BMP, indicando que a sinalização destas proteínas atua no controle da manutenção, crescimento e atrofia muscular. Logo, a atuação das BMPs vai além da regulação do crescimento ósseo e do desenvolvimento muscular, atuando também na formação do eixo embrionário e desenvolvimento dos ossos do crânio.

Dentre os genes envolvidos no processo de formação óssea, o Runx2 (Fator de Transcrição da Família RUNX 2) desempenha papel crucial na diferenciação dos osteoblastos, atuando também na regulação de genes chaves da matriz óssea, como *Spp1*, *Ibsp* e *Bglap2*. Este gene também atua na maturação dos condrócitos e na regulação de genes responsável pela formação da cartilagem como *Coll10a1* (KOMORI, 2017).

O colágeno é uma das proteínas mais abundantes do corpo. O gene *coll1a1* codifica a cadeia alfa-1 do colágeno tipo I, que atua na manutenção da integridade de diversos tecidos, como pele, ossos, tendões e ligamentos (DURÁN et al., 2011). Na literatura há um consenso que os ossos intermusculares (IBs) são tendões miosseptais ossificados (NIE et al., 2019). Desta forma, há uma complexa interação entre genes miogênicos e osteogênicos na sinalização de proteínas responsáveis pela manutenção e desenvolvimento de tecidos ósseos e musculares.

2.6 Desenvolvimento das espinhas intermusculares (IBs)

2.6.1 Aspectos morfológicos e funcionais das espinhas intermusculares (IBs)

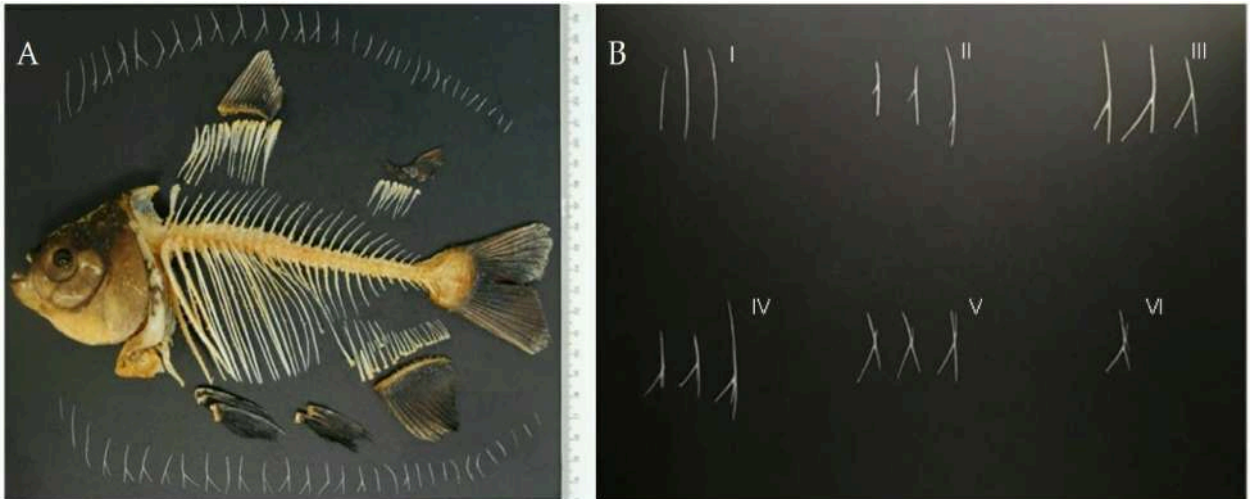
A arquitetura óssea dos peixes é adaptada para proporcionar sua sobrevivência em ambiente aquático. Composto por ossos e cartilagem, possuem diversas funções fisiológicas, relacionada a sustentação do corpo, desenvolvimento e locomoção, além de fornecer substrato para a fixação muscular e proteção dos órgãos. Metabolicamente ativo e complexo, o sistema ósseo destes animais está sempre em constante remodelação, conferindo-lhes a capacidade de responder às necessidades adaptativas (OWEN, 1866; OFER et al., 2019; BRONZE, 2020).

A locomoção é uma das principais funções do sistema musculoesquelético dos peixes. Em teleósteos a musculatura esquelética é sustentada pela coluna vertebral, e os mioseptos fortalecidos pelas espinhas intermusculares (IBs), que estão em contato com as fibras musculares. Estas estruturas, comumente denominadas na literatura de costelas falsas, ossos de alfinetes, ossos de filé, ossos intramiosseptais, espículas mineralizadas, espinhos

miosseptos ou espinhas de peixe, estão presentes apenas nos miosseptos dos teleósteos inferiores, formados a partir de tendões miosseptais ossificados (LYALL *et al.*, 2024).

Morfologicamente os IBs apresentam diferentes formas, como não bifurcados, bifurcados com extremidades desigual e bifurcados com extremidade equivalente (Figura 4) (LI *et al.*, 2013). Adicionalmente, a presença ou ausência da ossificação dos tendões em peixes teleósteos estão relacionados a métricas morfológicas, como posição das nadadeiras medianas, proporção do corpo e o número de vértebras (YAO *et al.*, 2015).

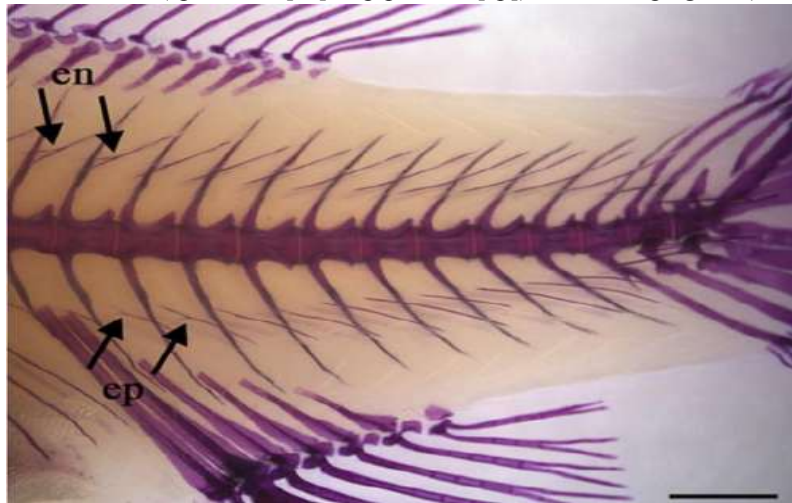
Figura 4 — (A) - Espécie completamente dissecada com os diferentes ossos organizados de acordo com a ordem de coleta. (B) —Tipos de ossos intermusculares (tipo I = espinho sem bifurcação; tipo II = espinho bifurcado incompleto; tipo III = espinho em forma de Y; tipo IV = espinho tipo dois dentes em uma extremidade; tipo V = espinho tipo dois dentes em duas extremidades; tipo VI = múltiplos espinhos bifurcados em ambas as extremidades)



Fonte: Oliveira *et al.* (2023).

São reconhecidas três categorias de IBs: (I) epineural, localizados acima do septo horizontal, região onde são fixados os arcos neurais; (II) epicentral encontrados no septo horizontal; e (III) epipleural, que são fixados na região da costela, abaixo do septo horizontal. Contudo, o tipo de IBs variam de acordo com a espécie. Em teleósteos como a enguia japonesa (*Anguilla japonica*), são encontrados os três tipos de IBs, enquanto nos ciprinídeos, como a carpa gibel (*Carassius gibelio*) e o peixe-zebra (*Danio rerio*) apresenta apenas epineural e epipleural (Figura 5) a mesma formação encontrada em characiformes como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (LYALL *et al.*, 2024).

Figura 5 — Ossos intermusculares (epineurais [en] e epipleurais [ep]) de uma carpa gibel (*Carassius gibelio*)



Fonte: Gan *et al.* (2023).

Diferente do esqueleto axial, como a coluna vertebral que se desenvolve a partir de uma população de células mesenquimais derivadas do somito vertebral, os IBs são tendões mioseptais ossificados, formados por condensação mesenquimal através da ossificação intramembranosa do tecido conjuntivo. Neste processo as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos e começam a mineralizar, de forma que ocorre após a fixação do esqueleto axial (WAN *et al.*, 2016; MUBANGO *et al.*, 2022; PATTERSON; JOHNSON, 1995; BRONZE, 2020; XU *et al.*, 2022).

2.6.2 Mecanismos Moleculares envolvidos na Formação de IBs

Desde a década de 1960 diversos estudos foram conduzidos para compreender a homologia e origem das IBs, entretanto as pesquisas concentraram-se apenas na morfologia. A partir dos anos 2000, começou-se a utilizar tecnologias avançadas voltadas ao sequenciamento da expressão de genes, bem como outras técnicas moleculares para a identificação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas estruturas. Atualmente, vários trabalhos têm se concentrado na identificação dos genes e proteínas relacionados com o desenvolvimento das espinhas intermusculares (WAN *et al.*, 2016; LYALL *et al.*, 2024).

De acordo com Mubango *et al.* (2022), há um consenso na comunidade científica que a formação das IBs ocorre via ossificação intramembranosa (IO) ao invés da ossificação endocondral (EO) responsável pela formação óssea comum. A IO inicia-se com a especialização das células mesenquimais, que se unem e diferenciam. O mesênquima indiferenciado agrupa-se na membrana fibrosa, formando capilares, enquanto o mesênquima

diferenciado transforma-se em células osteogênicas que posteriormente viram osteoblastos. A membrana fibrosa que constitui o mesênquima indiferenciado atua como modelo para a formação das IBs, direcionando onde a ossificação irá ocorrer nos mioseptos (MUBANGO *et al.*, 2022).

Análises ômicas mostraram que o desenvolvimento das IBs está associado a inúmeras vias de sinalização, tais como via *Wnt*, *TGF- β* (Fator de Crescimento Transformador beta), *MAPK* (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno), sinalização de cálcio, sinalização de hormônio tireoidiano, sinalização TNF (Fator de Necrose Tumoral), via NF-Kappa B, sinalização hedgehog e diferenciação dos osteoclastos. Além disso, genes como o *sxca* (proteína de ligação ao domínio SH3 e anquirina repetida 2) *msxC* (segmento muscular homeobox), *sost* (esclerostina) e *bmps* (proteínas morfogenéticas ósseas) podem desempenhar papéis cruciais no desenvolvimento das IBs (XU *et al.*, 2022).

Assumindo que os IBs provavelmente são ossificados a partir dos tendões, os principais fatores que atuam no desenvolvimento dos tendões podem estar associados a formação das IBs, tais como *scx* (escleraxia), *MsxC* (segmento muscular homeobox C) e *runx2* (fator de transcrição 2 relacionado ao runt). O *scx* é um fator de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH), que atua na diferenciação das células do tendão, enquanto o *MsxC* é um fator importante na formação óssea e induz interação epitelial-mesenquimal na organogênese de vertebrados. Já o *runx2* é primordial para as primeiras etapas da formação das células ósseas, atuando como um fator de transcrição que ativa outros genes envolvidos nesse processo (LI, *et al.*, 2021; LYALL *et al.*, 2024).

Estudo realizado por Nie *et al.* (2021), com peixes-zebra gerados por meio de tecnologia CRISPR-Cas9, buscou compreender o papel do gene *scx* no desenvolvimento das IBs. A pesquisa identificou diferenciação funcional entre dois ortólogos do *scx*, *scxa* e *scxb*, sendo que o gene *scxa* mostrou-se crucial para o desenvolvimento dos ossos intermusculares. Os peixes mutantes que não possuíam o gene *scxa* (*scxa-1* *-/-*) apresentaram uma redução significativa de 70% do número de ossos intermusculares, em comparação com o selvagem. Especificamente, os adultos *scxa-1* *-/-* tinham apenas 15–25, enquanto os do tipo selvagem tinham 76–80.

Análises transcriptômicas em peixes sargos de focinho rombudo (*Megalobrama amblycephala*) revelaram um padrão de expressão diferencial de genes da família BMPs (Proteínas morfogenéticas ósseas) durante o desenvolvimento dos ossículos basais, com um aumento significativo de *bmp3*, *bmp4*, *bmp5* e *bmp8a* nos estágios iniciais de ossificação (XU *et al.*, 2022). Esses resultados, corroborados por estudos em peixe-zebra, sugerem que a

sinalização dessas proteínas desempenha papel fundamental na diferenciação dos osteoblastos e na maturação dos IBs (XU *et al.*, 2022).

Pesquisas em mutantes de peixe-zebra e carpa cruciana (*Carassius auratus*) revelaram que o gene *bmp6* (Proteína morfogenética óssea 6) desempenha papel fundamental no desenvolvimento dos IBs (LYALL *et al.*, 2024). A deleção em ambas as espécies levou à ausência completa dessas estruturas, sem comprometer o crescimento, a musculatura ou o desenvolvimento esquelético em geral. Em um estudo mais recente conduzido pela equipe de Kuang *et al.* (2023), a eliminação simultânea dos genes *bmp6a* e *bmp6b* em carpa cruciana resultou em uma nova linhagem de carpa cruciana sem IBs, enquanto a deleção individual de cada gene causou apenas uma redução parcial no número. Esses achados corroboram com *insights* valiosos sobre os mecanismos moleculares da formação dessas estruturas.

Nos últimos 10 anos, os avanços tecnológicos proporcionaram um avanço nos estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de formação dos IBs, especialmente em ciprinídeos. Estas informações contribuem para uma melhor compreensão da formação destas estruturas, porém há a necessidade de mais estudos com espécies regionais que são voltadas ao sistema produtivo que adquiriram diferentes padrões de adaptação, de forma a viabilizar uma possível remoção por meio do melhoramento genético. (LYALL *et al.*, 2024).

3 METODOLOGIA

3.1 Montagem do experimento

O experimento foi conduzido na Embrapa Pesca e Aquicultura localizada em Palmas Tocantins, com as coordenadas geográficas latitude 10°08'41"S e longitude 48°18'51"W, estando dividido em duas etapas. A primeira etapa foi realizada no Campo Experimental de Aquicultura (Ceaq) (Figura 6) localizado na instituição, onde os peixes foram manejados nas fases de larva, pós-larva e alevinagem *indoor*, submetidos a três dietas experimentais com diferentes níveis de suplementação de fósforo. A condução do experimento foi submetida e autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pesca e Aquicultura (protocolo nº 05/2023).

Figura 6 — Sistema de produção de tambaqui em caixas de PVC 500L e oxigenação controlada



Fonte: Autora (2025).

Após a coleta dos exemplares de alevinos de tambaqui com 29 dias (69 dias após a eclosão) em experimentação, realizou-se a segunda etapa, que consistiu no processamento das amostras de tecido muscular e cerebral no laboratório de Biotecnologia da unidade. O experimento apresentou um delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repetições por dieta em 12 tanques de cultivo, dispostos de forma aleatória, como demonstrado no esquema experimental (Figura 7).

Figura 7 — Plano experimental com a distribuição das caixas com as dietas experimentais de fósforo (P) (0%, 0,35% e 0,70%) no sistema de produção



Fonte: Autora (2025).

Ao decorrer do experimento, os alevinos de tambaqui foram alimentados com dietas suplementadas com 0%, 0,35% e 0,70% de fósforo isonitrogenadas e isocalóricas. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia, até a saciedade aparente dos animais, nos seguintes horários: 8:00, 11:00, 14:00, 17:00h. Chegeni (2016), destaca que garantir que as dietas formuladas contenham a mesmas densidades calórica (isocalóricas) e mesmo nível de proteína (isonitrogenada), possibilita observar se os efeitos sobre o crescimento que estão sendo medidos sejam devido a fonte de proteínas e não ao nível de proteína.

3.2 Variáveis monitoradas no experimento

Para garantir a qualidade dos dados e a confiabilidade dos resultados, foi realizado o monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água, do manejo alimentar e do crescimento dos organismos. Parâmetros da água, como oxigênio dissolvido e temperatura foram monitorados regularmente para assegurar que estivessem dentro dos limites adequados para a larvicultura, condição essencial para a saúde do sistema aquático. O crescimento de todos os grupos experimentais foi avaliado por meio de biometria periódica, que incluiu a determinação de peso e comprimento.

Com o auxílio de uma sonda multiparâmetro (Hanna HI9829), o oxigênio e a temperatura foram aferidos diariamente. O monitoramento dos teores de amônia tóxica presente na água foi realizado semanalmente por meio do kit produtor básico de água doce (Alfakit). Para determinar o fósforo total dissolvido, foram realizadas coletas de água, duas vezes por semana em dois pontos diferentes dos tanques, que posteriormente foram encaminhados ao laboratório de qualidade de água da unidade, que utilizou o Método Persulfato APHA (2017) 400-P B.5 e D para determinação do fósforo dissolvido. Além do monitoramento dos parâmetros de qualidade da água, todos os tanques experimentais foram limpos diariamente para garantir condições ideais para os alevinos.

Os alevinos de tambaqui utilizados no experimento foram adquiridos com a equipe de reprodução de peixes da Embrapa Pesca e Aquicultura, oriundos de reprodutores dos sistemas de produção. Na fase de pós-larva, a alimentação exógena foi realizada com náuplios de artêmia seis vezes ao dia, durante uma semana. Após o oitavo dia, iniciou-se a introdução da ração comercial microextrusada com 60% de proteína bruta e granulometria de 300 a 500 μm , por um período de seis dias que gradualmente substituiu o alimento vivo, nas proporções de 25, 50 e 75%.

Aos 40 dias de vida, antes de serem distribuídos nas unidades experimentais, ou seja, após período de alimentação em condições iguais foi realizada a biometria inicial com amostragem de 300 alevinos para determinação do peso (0.32 ± 0.12 g) e comprimento padrão (1.98 ± 0.23 cm) iniciais e posteriormente foram transferidos para as unidades experimentais aleatoriamente. Os tanques com 150 L de volume útil, em sistema de recirculação de água (RAS) receberam 300 animais que foram alimentados pelas dietas experimentais preparadas pela equipe de nutrição de peixes da Embrapa (Tabela 1).

Tabela 1 — Formulação e composição química das dietas experimentais (g kg⁻¹)

Ingredientes	Dieta 0%	Dieta 0,35%	Dieta 0,70%
Caseína	326	326	326
Albumina	213	213	213
Amido de milho	168	168	168
Celulose	48	48	48
Caulino	38	26	0
Concentrado de proteína de soja	21	21	21
Lecitina de soja	9	9	9
Óleo de peixe	111	111	111
Pré-mistura de vitaminas e microminerais	23	23	23
Óleo de soja	19	19	19
K ₂ SO ₄	12	0	0
NaCl	3	3	3
MgSO ₄	4	4	4
CaCO ₃	3	13	23
Hidroxitolueno butilado (BHT)	2	2	2
KH ₂ PO ₄	0	15	30
Composição química (matéria seca básica)			
Extrato de éter	10.4	11.2	11.1
Proteína bruta	-	-	-
Cinzas	9.1	8.7	8.2
Fósforo total ²	0.3	0.6	0.9
Fósforo disponível ³	0.2	0.4	0.7
Cálcio	0.3	0.7	1.2
Ca: P disponível	1.3	1.6	1.6

Fonte: Rodrigues (2025).

Por um período de 29 dias, os animais foram alimentados com dietas experimentais, sendo o desenvolvimento acompanhado por biometria (Figura 8) realizada aos 14 dias (54 dias após a eclosão) após início do experimento e biometria final aos 29 dias (69 dias após a eclosão). Vale ressaltar que antes dos animais serem distribuídos nas unidades experimentais foi realizada uma biometria inicial de uma amostragem para avaliar o peso e comprimento dos animais que estavam em condições iguais de alimentação, período de treinamento alimentar antes de serem submetidos às dietas experimentais.

Figura 8 — Biometria dos alevinos de Tambaqui



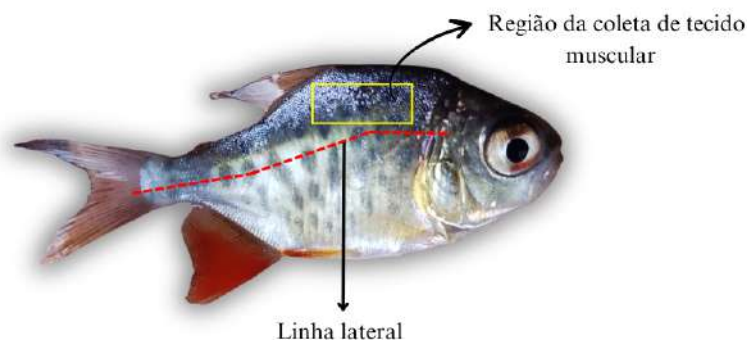
Fonte: Autora (2025).

As medidas de comprimento total e peso foram registradas após a eutanásia de 40 peixes realizada com eugenol a uma concentração de 20 mg/L, seguindo as diretrizes éticas para o manejo de animais em pesquisa.

3.3 Coleta das amostras biológicas

A coleta dos tecidos foi realizada quando os alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) estavam com 29 dias em experimentação. Os animais destinados à extração de RNA foram eutanasiados e imediatamente acondicionados em sacos plásticos e armazenados em nitrogênio líquido para preservação da integridade do RNA. Posteriormente, foi realizada a dissecação, coletando-se amostras de cérebro e músculo branco dorsal sem a pele, acima da linha lateral (Figura 9) de modo que fosse possível capturar músculo, tecido conectivo e osso. Os tecidos foram novamente armazenados em nitrogênio líquido até a extração do RNA. Os alevinos utilizados na diafanização foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%, por um período de 24 horas para conservar os elementos teciduais.

Figura 9 — Região da coleta de músculo para extração de RNA



Fonte: Autora (2025).

3.4 Isolamento do RNA total e síntese de cDNA

Para a extração de RNA total das amostras de tecido muscular e cerebral dos alevinos de tambaqui, submetidos aos três tratamentos com dietas suplementadas com diferentes níveis de fósforo (0%, 0,35% e 0,70%), utilizou-se o protocolo do *Trizol reagent* (Invitrogen), otimizado para os tecidos de *C. macropomum*. Para cada tratamento, foram utilizadas 36 amostras de cérebro e 36 de músculo no mesmo indivíduo, totalizando 72 amostras.

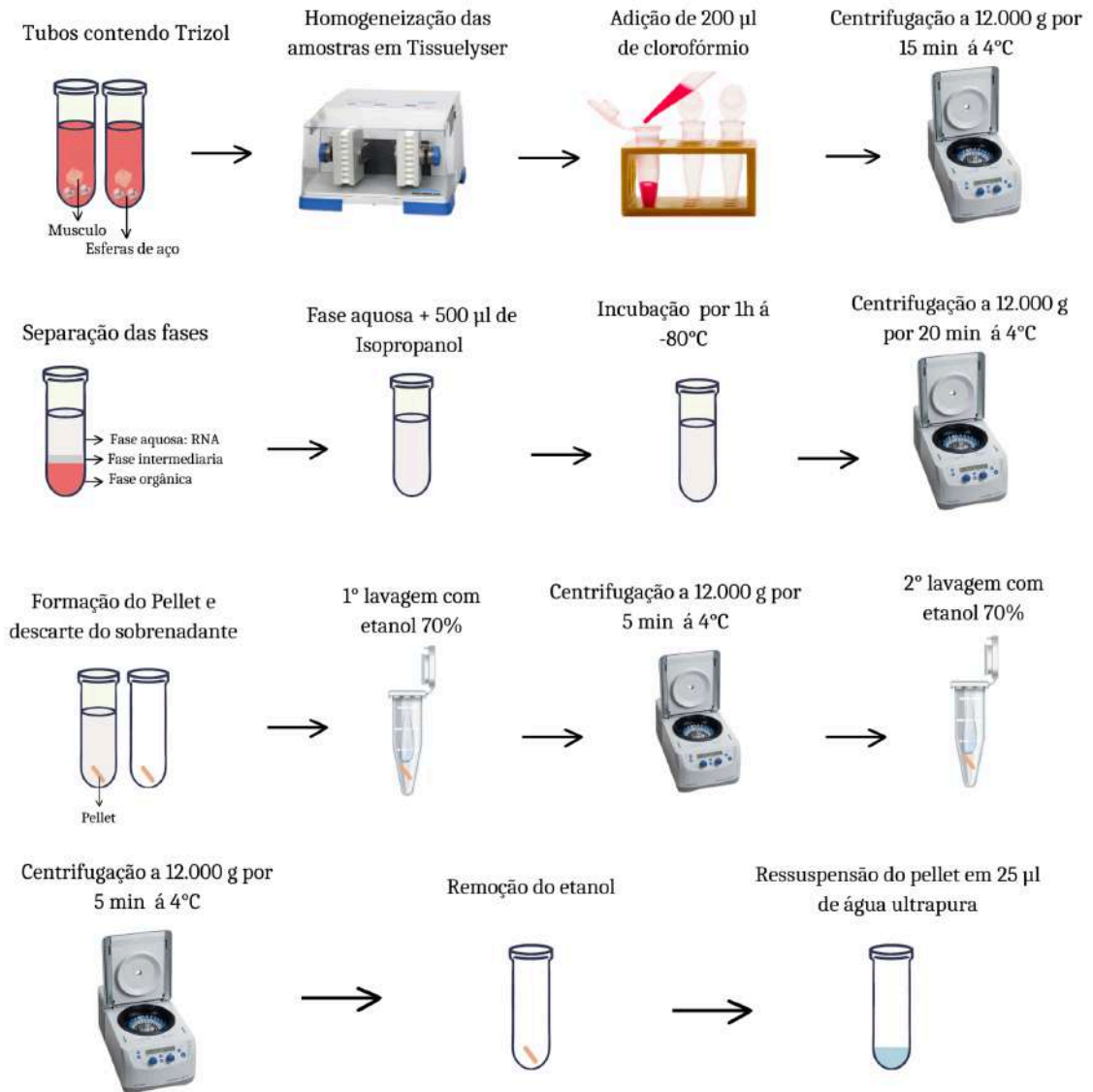
A fim de garantir a qualidade e integridade do RNA, medidas de biossegurança foram adotadas. Todos os materiais utilizados (como tubos e ponteiros) estavam livres de DNases e RNases, autoclavados para uso exclusivo em extrações de RNA. Além disso, todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo de exaustão, higienizada com álcool 70% e RNazap. Para evitar a ativação das RNases e consequente degradação do RNA, todas as manipulações foram realizadas em caixa de gelo.

As amostras de músculo (50 a 100 mg) foram homogeneizadas em tubos microcentrífuga de 2 ml de fundo em “U”, contendo 1000 microlitros de Trizol gelado e duas esferas de aço no homogeneizador automático Tissuelyser II (Qiagen) programado na condição de 30 Hz por 1 minuto, até todos os fragmentos estarem completamente dissolvidos. Quanto às amostras de cérebro, devido ao menor tamanho, foram adicionadas diretamente ao *Trizol* após retiradas do nitrogênio líquido. Após a adição de 200 microlitros de clorofórmio gelado e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, observou-se a formação de três fases: uma fase aquosa superior contendo RNA, uma interface e uma fase orgânica inferior. A fase aquosa (aproximadamente 400 microlitros) foi retirada para novos tubos e precipitada com 500 microlitros de isopropanol gelado por 1 hora a -80°C no ultrafreezer.

Após 20 minutos de centrifugação houve a formação do pellet (aglomerado esbranquiçado na parte inferior do tubo). Assim, realizou-se o descarte do sobrenadante e o

pellet de RNA foi lavado duas vezes com 1mL de etanol 75% gelado para remover o excesso de guanidina. Durante cada lavagem, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. O etanol residual foi cuidadosamente removido e o pellet foi ressuspensionado em 25 microlitros de água ultrapura livre de RNase (Figura 10).

Figura 10 — Ilustração das etapas da extração de RNA total



Fonte: Autora (2025).

A qualidade e quantidade do RNA total extraído foram avaliados por espectrofotometria em *Nanodrop Thermoscientific*. As razões A260/A280 e A260/A230 foram utilizadas para verificar a pureza do RNA, com valores ideais entre 1,8 e 2,2. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (1% de agarose e 100 ml de TAE 0,5X) corado com *Sybr Safe Invitrogen*. Para permitir a identificação das

bandas de RNAs ribossomais 18S e 28S utilizou-se para a comparação o *Ladder* de 100 bp (*Ludwig*) visualizado em fotodocumentador (*Loccus*).

Para obtenção de um RNA de alta qualidade, livre de contaminação por DNA genômico, o RNA total foi purificado utilizando o kit Turbo DNase-free™ (*Invitrogen*), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram ajustadas para uma concentração de 4 µg e o volume total ajustado para 22 microlitros com água ultrapura. Posteriormente, foi adicionado o mix da reação da DNase, contendo Turbo Dnase e 10x turbo *DNase Reaction Buffer*, e incubado a 37°C por 30 minutos. A DNase foi inativada pela adição do *Inactivation Reagent* à temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação a 14000 rpm por 4 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo o RNA purificado foi armazenado a -80°C.

Para realizar a quantificação da expressão relativa dos genes de interesse, previamente o RNA mensageiro (mRNA) foi convertido em DNA complementar (cDNA), utilizando a enzima transcriptase reversa. A reação foi realizada com o kit Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied biosystems*), implementada com 10 microlitros de RNA purificado e 10 microlitros do mix, contendo *10x RT Buffer*, *25x dNTP mix*, *10x RT Random Primers*, *MultiScribe Reverse Transcriptase* e água ultrapura. O termociclador foi programado com a seguinte programação: 25°C por 10 minutos, seguido por 2 ciclos de 37°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a 4°C para posterior utilização em qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa Quantitativa).

3.5 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

A amplificação dos segmentos de cDNA, foi realizada no termociclador QuantStudio 7 Pro (*Applied Biosystems*), utilizando 45 ciclos de amplificação, dividido nas seguintes etapas:

- 1. Pré-leitura:** Inicialmente o termociclador realizou a leitura da fluorescência das amostras a 30°C por 1 minuto.
- 2. Pré-desnaturação:** Nesta etapa o DNA é pré-desnaturado a 94,9°C por 15 minutos. Este processo separa as fitas duplas do DNA em fitas simples, permitindo o anelamento dos primers as fitas simples.
- 3. Amplificação:** A amplificação foi realizada em duas etapas:
 - **Fase 1:** 10 ciclos de amplificação a 94°C por 20 segundos (desnaturação) e 61°C por 1 minuto (anelamento e extensão).

- **Fase 2:** 35 ciclos de amplificação a 94°C por 20 segundos (desnaturação) e 55°C por 1 minuto (anelamento e extensão).

Para a amplificação dos segmentos de cDNA utilizou-se pares de iniciadores para genes miogênicos e osteogênicos. Os genes miogênicos candidatos avaliados foram: *mstna* e *mstnb*. Dentre os genes osteogênicos analisados estão o *runx2b*, *runx2a*, *scxa*, *colla1a*, *colla1b*, *1-bmp6*, *xirp2b* e *tnmd*. Também foram analisados os genes *lplna2-x1*, *lplxna2-x2* (Tabela 2).

Tabela 2 — Sequência de primers utilizados para análise da expressão gênica

Categoria	Genes	Par de primers (5' - 3')	Acesso GENBANK
Miogênicos	<i>mstna</i>	F: CTG TTG AGC ACA GTA CGA G R: TTT GTC TGG CAG GAT CTT C	XM_036562065.1
	<i>mstnb</i>	F: GCT GTT TCT TCT CCT TCA GT R: CAT CTG TGA CGG GCA TC	XM_036572923.1
Osteogênicos	<i>runx2a</i>	F: ATG TCC ACC ACC ACC C R: TCC ATC CTG CCG CTG	XM_036593342.1
	<i>runx2b</i>	F: CCC ACT ACC ACA CCT ACC R: CAC TCC ACC CCC ACC	XM_036581739.1
	<i>scxa</i>	F: ATC GGG CAC GGG AAG R: GCG GAG AGT CTC AAT CTT TG	XM_036566895.1
	<i>colla1a</i>	F: CGA ATA CCA TGA ACC CAG AG R: CCA GCA GAC TTC TCA TCA AA	XM_036589998.1
	<i>colla1b</i>	F: ACT CCT GGC GAT CCT G R: GCT GGA CTT CTC ACT GC	XM_036573375.1
	<i>l-Bmp6</i>	F: ATG GTG GAG CTC TTA TTG CAT GT R: GAA TTG TAC TTG CCG TTG AGC AG	XM_036560693.1
	<i>xirp2b</i>	F: CAC TAC ACA CAC AGA TCC ATG R: GCT GAG AGT TTT GGG TAG TAC	XM_036567482.1
	<i>tnmd</i>	F: TGG TGG ACT CTC ATG TGT R: CAT GGA ACT CAG CAT CTG TAA	XM_036568930.1
Outros genes	<i>Plxna2-x1</i>	F: GTC TGA GAG ACA GGT GAC CCA R: TTC ATT GGC CCG TTC ACA TCT AT	XM_036590910.1
	<i>Plxna2-x2</i>	F: TTC ACT TCA TTA AAC CCA GGG CA R: GAA AGT CCT CTG TGA ATC TCG CT	XM_036590912.1
Gene de referência	<i>β-actin</i>	F: CGT GAT GGA CTC TGG TGA TG R: TCA CGG ACA ATT TCC CTC TC	XM_036566720.1

Fonte: National Center For Biotechnology Information (NCBI).

3.6 Diafanização

Para visualizar anatomicamente a influência das dietas suplementadas com fósforo nos desenvolvimentos das espinhas intermusculares, realizou-se a diafanização dos alevinos. A metodologia utilizada foi a técnica de pigmentação proposta por Taylor e Van Dyke (1985). Por um período de 24 horas, os alevinos de tambaqui permaneceram fixados em solução de formalina a 10%. Logo após, realizou-se a lavagem dos exemplares em água destilada para retirar o excesso do fixador. Posteriormente os animais foram submetidos à desidratação em séries alcoólicas, em concentrações de 30%, 50% e 70% por 24 horas em cada solução. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em álcool 70% para preservar as estruturas até a etapa de coloração.

A coloração do tecido cartilaginoso foi realizada por meio da imersão dos animais na solução de Azul de Alcian (Sigma Aldrich) nas seguintes proporções: 30% de azul de alcian diluídos em 30% de ácido acético por um período de 24 horas. Em seguida as amostras foram imersas na solução saturada de Borato por uma hora, para preservar as estruturas coradas da

ação da enzima Pancreatina (Sigma Aldrich), que foi utilizada na digestão muscular por um período de 96 a 120 horas até os animais apresentarem transparência.

Após a digestão muscular as amostras foram transferidas para a solução de despigmentação, composta por Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) + solução saturada de Borato (6 gotas/100 ml) por aproximadamente 60 horas. Completando a última etapa da diafanização, os ossos foram corados com Alizarina (Alizarina em solução de KOH 0.5%) por 24 horas. As amostras foram preservadas em soluções crescentes de glicerina (solução de preservação Glicerina a 30% e 60% em KOH 2%, ambas por 24 horas), e em seguida acondicionadas em Glicerina + Timol até a coleta das imagens. Esta coleta foi realizada para a análise quantitativa da presença ou ausência das estruturas mineralizadas registradas por uma câmera Canon EOS Rebel T3i.

3.7 Análise estatística

O comprimento padrão e ganho de peso dos animais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste Tukey, com nível de significância de 5% por meio do software SISVAR (versão 5.8). Para analisar a expressão diferencial dos genes nos diferentes tratamentos foi utilizado o PCRtools do pacote R aplicando o teste de Wilcoxon para comparações entre grupos não-paramétricos (considerado significativo P-valor < 0,05).

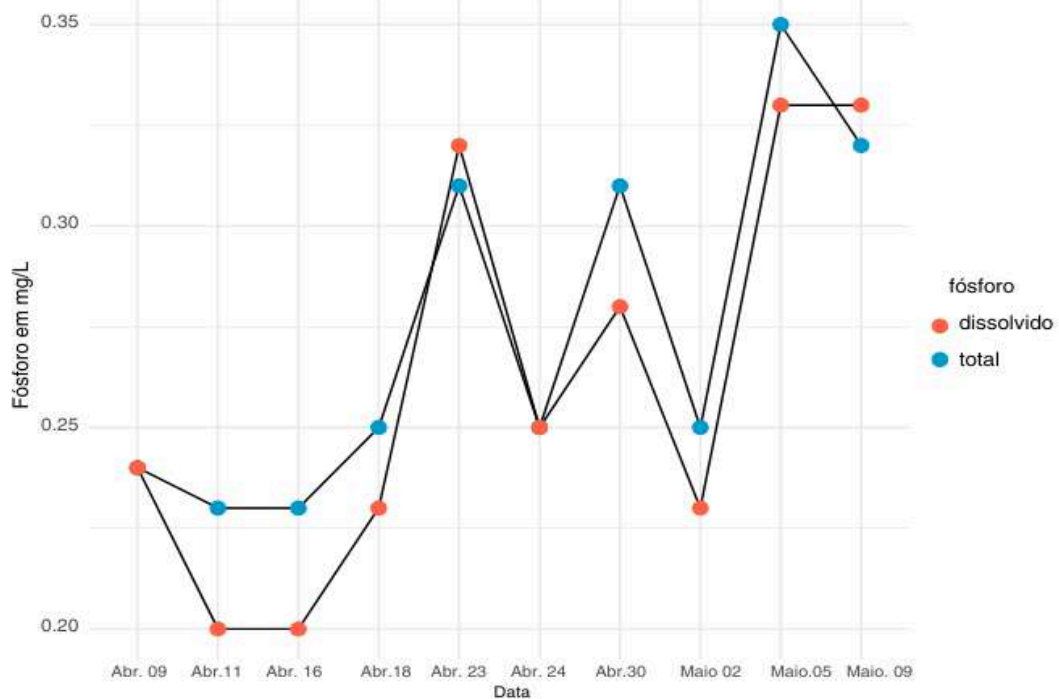
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação dos parâmetros de qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água monitorados ao decorrer do experimento foram: oxigênio dissolvido ($5,8 \pm 0,5$ mg/L), temperatura ($28,5 \pm 0,3$ °C), pH ($6,3 \pm 0,3$) e amônia tóxica ($0,0 \pm 0,0$ mg/L). Para espécies tropicais como pirarucu, tambaqui e pacu a temperatura ótima para o desenvolvimento situa-se entre 25°C e 32°C. O oxigênio dissolvido para essas espécies deve ser superior a 5 mg/L para proporcionar ótimo crescimento e desempenho. O pH deve estar entre 6,5 e 8,5 e valores de amônia acima de 0,01 mg/L afetam a resistência dos animais a doenças e interferem no crescimento, sendo valores de 0,20 mg/L são letais para peixes (IMBIRIBA; LOURENÇO JÚNIOR; CARVALHO, 2000; MORO *et al.*, 2013).

O fósforo total ($0,3 \pm 0,0$ mg/L) encontrava-se dentro do esperado (Figura 11), assegurando que a única fonte do mineral foi exclusivamente oriunda das dietas experimentais.

Figura 11 — Gráfico de regressão da análise do fósforo total e dissolvido na água antes e durante o experimento



Fonte: Autora (2025).

4.2 Desenvolvimento dos animais

Os resultados da biometria dos animais submetidos aos diferentes níveis de suplementação com fósforo (0%, 0,35% e 0,70%) são descritos na Tabela 3. As análises foram realizadas em dois momentos distintos: 14 dias após o início do experimento e ao final do período experimental, avaliando as variáveis peso e comprimento.

Tabela 3 — Médias de peso e comprimento dos alevinos de tambaqui submetidos a suplementação com diferentes níveis de fósforo, avaliadas aos 14 dias e no período final

Tratamentos	Peso (g) 14 dias	Peso (g) Final	Comp. (cm) 14 dias	Comp. (cm) Final
0P	1,38 c	3,12 c	3,28 c	4,20 c
0.35P	1,66 b	5,04 b	3,48 b	4,92 b
0.70P	1,85 a	6,04 a	3,62 a	5,24 a
CV (%)	38,5	42,84	11,56	14,79

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes (a, b, c) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CV: Coeficiente de Variação

Fonte: Autora (2025).

Com relação a variável peso, notou-se a influência do nível de fósforo em ambos os períodos analisados. Aos 14 dias de experimento o teste de Tukey demonstrou que as médias dos três tratamentos foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), com o maior peso observado no tratamento com 0,70% (1,85g), seguido por 0,35% (1,66 g). Ao final do experimento, essa tendência de superioridade dos tratamentos com fósforo se manteve.

Os grupos 0%, 0,35% e 0,70% apresentaram pesos médios de 3,12 g, 5,04 g e 6,04 g, com diferenças significativas entre os tratamentos. Os coeficientes de variação (CV) para peso foram de 38,5% aos 14 dias e 42,84% aos 29 dias, indicando uma variabilidade considerável nos dados de peso dentro dos grupos, especialmente no período final.

A variável comprimento aos 14 dias apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os três tratamentos, com o 0,70% (3,62 g) apresentando valores de comprimento superiores ao grupo 0,35% (3,48 g) e 0% (3,28 g). A avaliação do comprimento ao final do experimento também foi estatisticamente significativa entre os tratamentos aplicados ($p < 0,05$), demonstrando que a suplementação com níveis crescentes de fósforo proporciona um aumento gradual sobre o crescimento dos animais. Quanto ao coeficiente de variação para comprimento foram menores 11,56% aos 14 dias e 14,79% ao final, indicando uma menor dispersão dos dados em comparação aos de peso.

A suplementação de fósforo tem sido um tópico bastante estudado. Sugiura *et al.* (1998) ressalta que a suplementação do mineral é crucial principalmente quando as fontes utilizadas são de origem vegetal. Constituinte de maior importância para a formação das estruturas óssea, o fósforo desempenha papel crucial para o crescimento, mineralização óssea e metabolismo de lipídios, além de atuar em processos metabólicos e transferência de energia para organismo via ATP para reações bioquímicas como síntese proteica, transporte de ácidos graxos (SANTOS, 2012).

Como é um mineral exigido em maiores quantidades, as exigências de fósforo vêm sendo estabelecidas para várias espécies de peixes situando-se em torno de 0,25 a 1% da dieta variando conforme a fase de vida (SANTOS, 2012). Pezzato *et al.* (2006) ao avaliar a suplementação de dietas com níveis crescentes de fosfato bicálcico para alevinos de tilápia, encontrou melhores resultados de desempenho e mineralização óssea com a dieta suplementada com 0,75%.

Roy *et al.* (2003) destaca que para teleósteos, como o tambaqui a deficiência de fósforo está relacionada a diminuição da mineralização da matriz óssea. Como algumas deformidades são irreversíveis, podem estar relacionadas à influência de níveis de fósforo presente na expressão de genes (COSTA, 2015).

4.3 Diafanização

A técnica de diafanização permitiu avaliar a presença e ausência das espinhas intermusculares (IBs) nos exemplares de alevinos de tambaqui submetidos às dietas experimentais com suplementação de fósforo. Por meio da clarificação do tecido muscular, foi possível corar seletivamente as estruturas ósseas, possibilitando observar as diferenças entre os tratamentos aplicados. Barroso (2022) destaca a coloração óssea como o método mais eficiente para identificar e quantificar IBs em comparação às outras técnicas, como tomografia, ultrassom, raio-x e anatômica por dissecação.

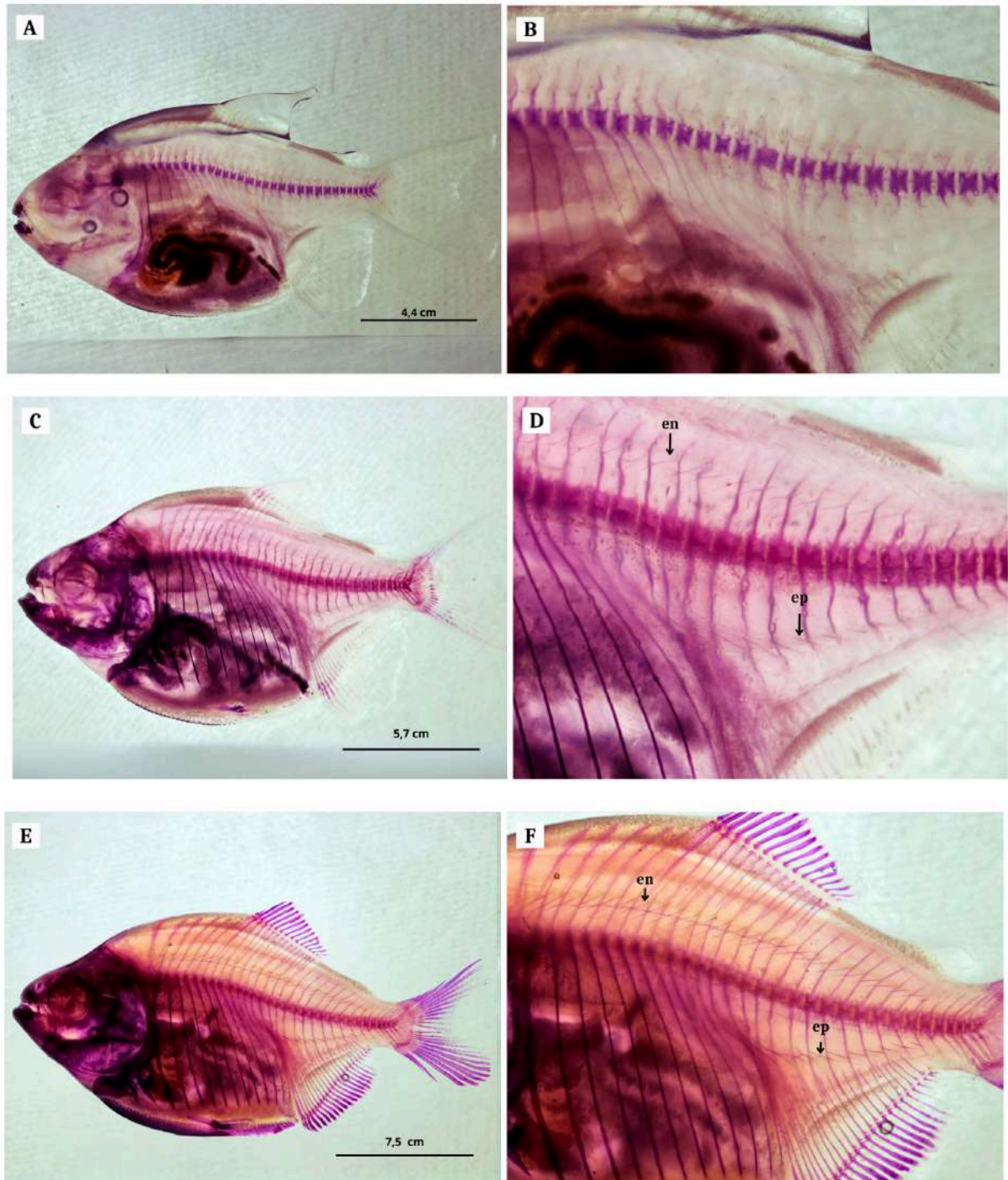
Ao avaliar os três tratamentos, foi possível identificar uma variação na intensidade da coloração das estruturas ósseas, sendo que estas variações estão relacionadas ao processo de mineralização óssea, que consiste na substituição da cartilagem por tecido ósseo. Os animais que receberam a dieta sem a suplementação de fósforo apresentaram coloração menos intensa em relação aos demais tratamentos, indicando uma menor mineralização dos tecidos (Figura 12), enquanto os alevinos que receberam a dieta suplementada com 0,35% de fósforo tiveram uma coloração intermediária, que se intensifica nos animais do tratamento com 0,70% de

suplementação de fósforo. Esta progressão na intensidade da coloração evidencia um aumento do processo de mineralização óssea em resposta ao aumento do nível de fósforo presente na ração.

O fósforo e cálcio são os macrominerais de maior importância para nutrição de peixes, pois atuam no desenvolvimento, manutenção do sistema esquelético e estabilidade das vértebras sendo requeridos em maiores quantidades em comparação aos demais minerais. A carência de fósforo na dieta pode provocar baixo desempenho zootécnico e deficiência na mineralização óssea, sendo necessário que as formulações das rações atendam às exigências deste mineral para a espécie de acordo com cada fase de desenvolvimento (ROCHA, 2012).

Quanto à presença das espinhas intermusculares, os alevinos alimentados com a dieta 0% apresentaram uma redução significativa das IBs, com exemplares exibindo ausência total das estruturas (Figura 12 B). Nos animais que receberam a dieta suplementada com 0,35% de fósforo, foi possível identificar a presença das IBs (Figura 12 D), entretanto as estruturas estavam menos nítidas, quando comparadas aos animais da dieta controle 0,70% que exibiram IBs completamente evidente (Figura 12 F).

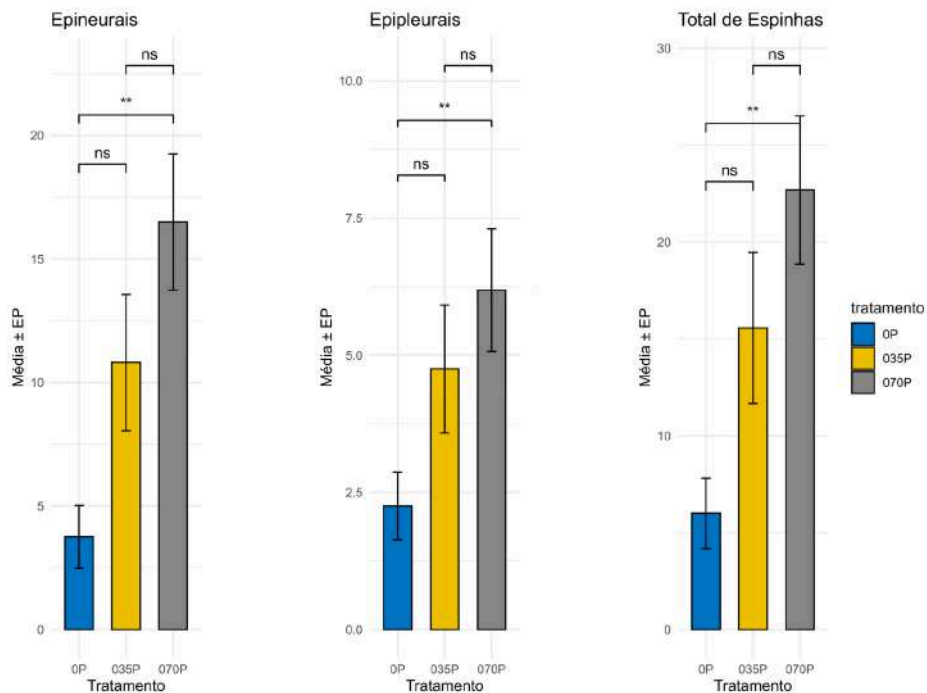
Figura 12 — Espécimes de alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com 29 dias de experimentação diafanizados e corados utilizando a metodologia descrita por Taylor e Van Dyke (1985) com os tecidos moles transparentes, corando seletivamente o tecido ósseo com alizarina nos tons de rosa e roxo. A: exemplar do tratamento 0%; B: ampliação da região dorsal do tronco do mesmo peixe, permitindo visualizar as vértebras da coluna vertebral e a ausência das espinhas intermusculares; C: exemplar do tratamento 0,35%; D: ampliação da região dorsal do tronco detalhando a presença das IBs indicadas pela seta preta (epineural[en]localizados acima do septo horizontal, região onde são fixados os arcos neurais e epipleural [ep]que são fixados na região da costela, abaixo do septo horizontal); E: exemplar do tratamento 0,70%; F: ampliação da região dorsal, destacando a presença total das IBs.



Fonte: Autora (2025).

A análise do número de espinhas intermusculares nos três tratamentos (Figura 13) demonstra que a dieta com suplementação de 0,70% de fósforo exerceu influência significativa no desenvolvimento das IBs. Para todas as categorias avaliadas (epineurais, epipleurais e total de espinhas), a diferença na média do número de espinhas entre o grupo controle 0,70P e o tratamento 0% foi estatisticamente significativa para todas as variáveis analisadas ($p < 0,01$). Entretanto, o tratamento 0,35% não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos tratamentos 0% e 0,70%. Esses resultados indicam que o aumento do fósforo dietético está associado a um maior desenvolvimento de espinhas ósseas em tambaquis, particularmente evidenciado no tratamento com 0,70% de fósforo.

Figura 13 - Gráfico da Média do número IBs em alevinos de tambaqui sob diferentes níveis de suplementação de fósforo



NS: Diferença não significativo ($p > 0,01$); ** Diferença significativa $p < 0,01$.

Fonte: Autora (2025).

O sistema esquelético de teleósteos como do tambaqui é altamente dinâmico e plástico, e responde ao comportamento do ambiente interno e externo ao decorrer das fases de vida. Desta forma os ossos podem remodelar, reabsorver, remineralizar e comprimir respondendo a disponibilidade de minerais, vitaminas, temperatura, crescimento e aumento de cargas mecânicas. Forças mecânicas externas, como locomoção e alimentação impactam de forma direta no crescimento e formação óssea, exercendo influência no desenvolvimento ósseo inicial (LYALL *et al.*, 2024).

Barroso (2020) ao investigar a influência de parâmetros morfométricos no desenvolvimento dos ossos intermusculares (IBs) em alevinos de *Colossoma macropomum* de três famílias distintas, com idade de 75 a 124 dias após a eclosão, identificou um padrão dinâmico no surgimento e desaparecimento das IBs em curtos períodos. A presença das IBs aos 46 e 95 DAE, seguida de ausência aos 100 DAE e reaparecimento aos 104 DAE, demonstra que há um mecanismo de controle de remodelagem óssea e de reabsorção abrupta do cálcio por volta dos 100 dias após a eclosão.

No entanto, Witten e Huysseune (2009), destacam que peixes teleósteos necessitam de remodelação esquelética com reabsorção óssea para crescimento, adaptação mecânica e substituição de tecidos esqueléticos. Em virtude das necessidades de adaptação ao ambiente aquático diferente dos outros vertebrados, o metabolismo ósseo dos teleósteos apresenta uma maior dependência aparente do fósforo em detrimento do cálcio.

A menor ocorrência de IBs nos alevinos submetidos a dieta sem suplementação de fósforo (0%) e a diferença estatisticamente comprovada entre os tratamentos 0% e 0,70%, trazem importantes perspectivas para a investigação da influência da restrição de fósforo nos mecanismos moleculares envolvidos na formação das IBs. Em consonância Bronze (2020) ao investigar os mecanismos genéticos envolvidos nas vias de formação das espinhas intermusculares em tambaqui, relatou que a identificação do fenótipo sem IBs epineurais na região do lobo em seus estudos genéticos foi fundamental para direcionar a análise do perfil de expressão gênica.

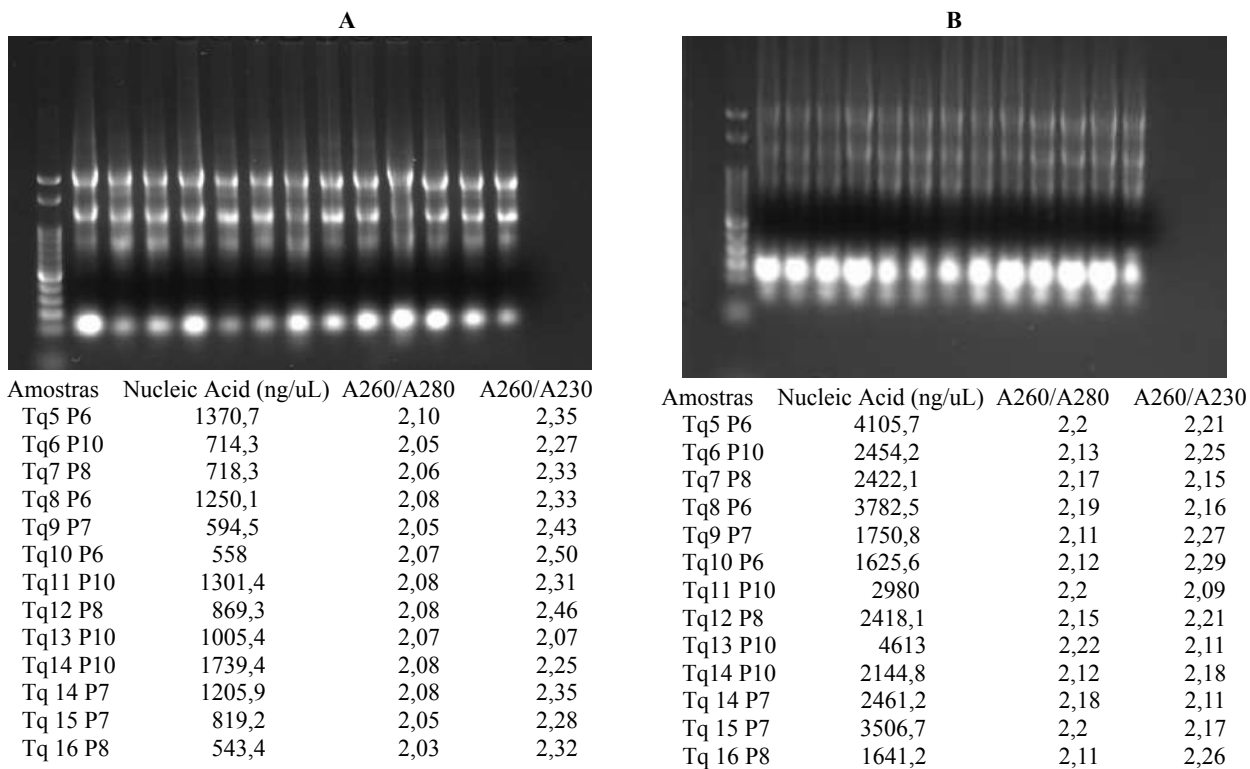
4.4 Avaliação da pureza e integridade do RNA extraído

A pureza do RNA extraído foi determinada pela absorvância da amostra em diferentes comprimentos de onda, avaliando-se os valores dos parâmetros A260/A280 e A260/A230. Para as amostras de cérebro e músculo (contendo tecido conectivo e osso) apresentaram valores superiores a 2,0 (Figura 14). Valores entre 1,8 e 2,0 para a razão A260/A280 indicam que o RNA está livre de contaminação por proteínas, enquanto a relação A260/A230 superior a 1,5 indicam a ausência de contaminação por compostos fenólicos (TIRABASSI, 2024).

Por meio do gel de agarose foi possível avaliar a integridade das amostras de RNA extraídas permitindo visualizar as bandas de RNA ribossomais 28S e 18S. As amostras extraídas do cérebro apresentaram boa integridade, evidenciadas por bandas nítidas e intactas. Em contraste, as amostras de músculo apresentaram algum grau de degradação, mas não comprometeram as análises subsequentes, fator que pode estar associado ao intervalo de

tempo que o material permaneceu fora do trizol, durante o processo de corte e pesagem das amostras. O rápido acondicionamento das amostras no trizol, garante a inativação das RNases, enzimas que degradam o RNA.

Figura 14 — Avaliação da pureza e integridade do RNA extraído das amostras de cérebro (A) e músculo (B)

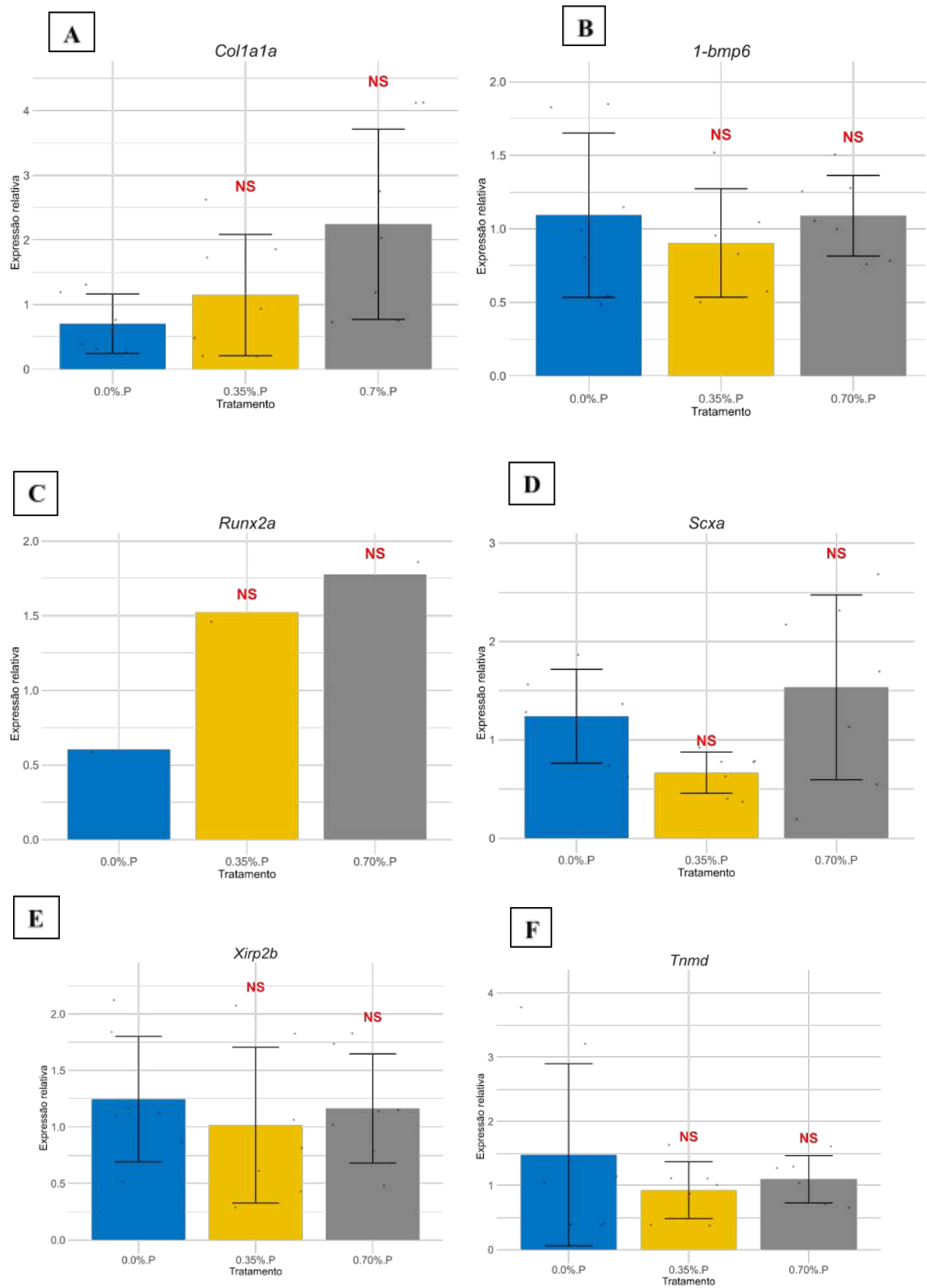


Fonte: Autora (2025).

4.5 Expressão relativa dos genes osteogênicos e miogênicos

No presente estudo os genes osteogênicos *Colla1a* (Colágeno tipo I alfa 1) *l-bmp6* (Proteína Morfogenética Óssea 6), *Runx2a* (Fator de transcrição da família RUNX 2a), *Scxa* (fator de transcrição bHLH a da escleraxia) *Xirp2b* (repetição de ligação de actina xin contendo 2b) e *Tnmd* (Tenomodulina), não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos avaliados (Figura 15). A ausência de alterações expressivas nos níveis de transcrição em resposta à suplementação de P na dieta, indicam que as concentrações de fósforo, não influenciam na expressão destes genes em *Collossoma macropomum*. A falta de diferença entre os tratamentos também pode estar relacionada à idade dos animais avaliados, ou seja, que neste período os animais não tenham necessidade da utilização metabólica deste genes, que podem ser recrutados em outro período.

Figura 15 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes *Col1a1a* (A); *1-bmp6* (B); *Runx2a* (C); *Scxa* (D); *Xirp2b* (E) e *Tnmd* (F). NS: Diferença não significativa ($p>0,05$).



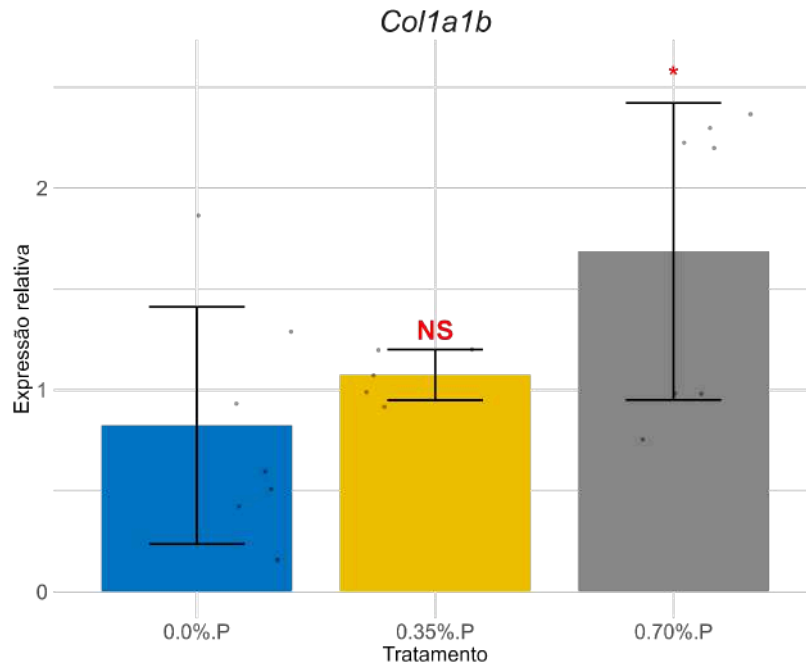
Fonte: Autora (2025).

A via de ossificação intramembranosa (IO), é considerada como a principal responsável pela formação das IBs, sendo regulada por inúmeros genes e proteínas em diferentes fases. Genes como o fator de transcrição 2 relacionados a Runt (*runx2*), Colágeno tipo I alfa 1(*coll1a1*) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) dentre outros, são considerados responsáveis pela regulação de processos críticos para a formação e manutenção das IBs, como deposição e cimentação de minerais (MUBANGO *et al.*, 2022).

Entretanto, na IO a expressão de alguns genes e proteínas não são igualmente significativos em comparação a outros (MUBANGO *et al.*, 2022). Yang *et al.* (2019), verificaram uma expressão insignificante dos genes *smad1*, *smad4a*, *runx2a*, Osterix (*osx/sp7*), *bmp2a* e *bmp4a* em embriões de peixe-zebra selvagem e mutante com ausência de IBs. Nie *et al.* (2021), identificaram uma diferenciação funcional entre dois ortólogos do gene *scx*, *scxa* e *scxb*, sendo que a deleção de *scxa* em peixe-zebra resultou na redução de 70% das IBs em comparação ao tipo selvagem. Entretanto, a expressão dos genes *Runx2a* e *Runx2b* que estão envolvidos no processo de diferenciação dos osteoblastos, não apresentaram diferença significativa entre os mutantes e os selvagens. Contudo, a deleção de *runx2b* por CRISPR-Cas9 em peixe-zebra resultou na redução significativa da diferenciação dos osteoblastos e diminuição das IBs (NIE *et al.*, 2022).

Por sua vez, a expressão relativa do gene *coll1a1b* apresentou diferença significativa entre o tratamento 0,70% e 0% (Figura 16). Os animais que receberam a ração suplementada com 0,70% de fósforo apresentaram uma expressão significativa do gene (* $p < 0,05$) em comparação ao grupo 0%. Esses resultados sugerem que o fósforo pode estar envolvido na ativação deste gene induzindo a formação das IBs corroborando com os dados da análise de contagem das espinhas intermusculares indicaram maior quantidade de IBs no grupo 0,70%. O aumento na disponibilidade de fósforo pode ter estimulado a atividade do gene *Coll1a1b*, levando a uma maior produção de colágeno tipo I, o que, por sua vez, contribuiu para a maior quantidade de espinhas intermusculares observada neste grupo.

Figura 16 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR do gene *Coll1a1b*.



* Diferença significativa $p < 0,05$; NS: Diferença não significativa ($p > 0,05$)
 Fonte: Autora (2025).

O colágeno tipo I é a principal proteína que compõe a camada do tecido conjuntivo da matriz extracelular, sendo essencial para formação dos ossos, cartilagens, articulações e tendões. Em grande parte dos vertebrados, ele é composto por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ codificada pelos genes *colla1* e *colla2*. Entretanto algumas espécies de teleosteos, como o peixe -zebra o colágeno tipo I é codificada pelos genes *colla1a* (cadeia $\alpha 1$), *colla1b* ($\alpha 3$) e *colla2* ($\alpha 2$) (LUDERMAN; UNLU, 2017; FURTADO, 2022; JOVANOVIC; GUTERMAM-RAM; MARINI, 2022).

Na literatura as IBs são descritas como tendões mioseptais ossificados (NIE *et al.*, 2021). Portanto, o colágeno exerce papel crucial para a formação e manutenção das IBs. Ao investigar como os genes *colla1a* e *colla1b* interferem na produção de colágeno tipo I em peixe zebra, Gistelinck *et al.*, (2018), observaram que estes genes são fundamentais para a formação adequada do colágeno da estrutura óssea e tecidos moles. Mutantes com deleção ou que apresentavam mutação nesses genes apresentam diferentes graus de deficiência na produção de colágeno, provocando anomalias esqueléticas, fragilidade óssea, problemas nos tecidos moles e deformidades.

Após a obtenção de mutantes de peixe-zebra sem IBs a partir do nocaute do gene *scxa*, Nie *et al.* (2021), analisou o padrão de expressão de gene associados à mineralização e osteogênese. Os mutantes apresentaram expressão negativa dos genes *colla2*, *colla1a*,

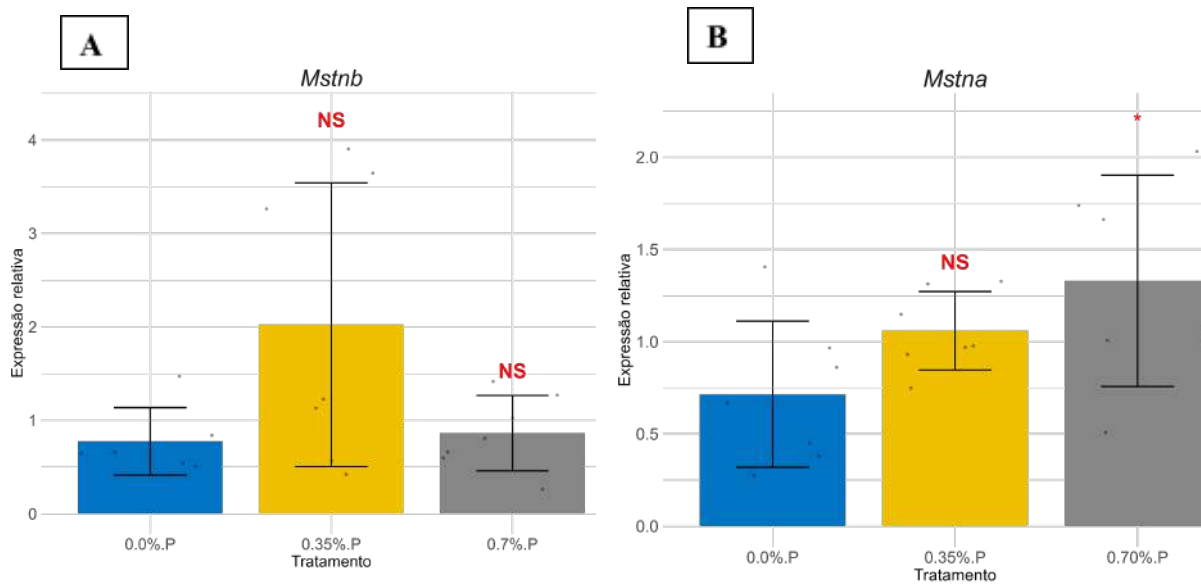
coll1b, *entpd5*, *enpp1*, indicando que a deleção de *scxa* interfere na regulação de genes importantes para a formação das IBs.

A disponibilidade de nutrientes, como o fósforo, pode estar intrinsecamente relacionada ao acionamento de genes envolvidos na formação das IBs. O gene *Coll1b* é responsável pela codificação da cadeia do colágeno tipo I, fundamental para a formação do tecido conjuntivo. A menor expressão deste gene nos animais que não receberam dieta suplementada com fósforo em comparação ao grupo 0,70% evidenciam que a deficiência de P pode comprometer a síntese adequada de colágeno, desencadeando uma cascata de eventos que afetam a expressão de *coll1b* e consecutivamente mecanismos regulatórios envolvidos na formação das IBs.

Anatomicamente e funcionalmente, músculo e osso estão fortemente relacionados, sendo que em animais vertebrados a atividade muscular desempenha papel crucial não só no deslocamento, como também no processo de homeostase entre formação e reabsorção óssea, atuando diretamente nessa regulação (BRONZE, 2020). Por estas razões, a expressão relativa de genes miogênicos também foi quantificada. Esses resultados ajudam a compreender como o fósforo interfere na regulação de genes miogênicos e sua possível relação com a formação das IBs.

A expressão relativa média do gene *Mstnb* (miostatina b) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos analisados (Figura 17 A), indicando que as concentrações de P testadas não tiveram impacto suficiente para exercer influência sobre a expressão desta isoforma em tambaqui. Em compensação, a *Mstna* (miostatina a), apresentou níveis de expressão distintos entre os grupos submetidos às dietas suplementadas com fósforo (Figura 17 B).

Figura 17 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes *Mstnb* (A) e *Mstna* (B).



NS: Diferença não significativo ($p > 0,05$); * Diferença significativa $p < 0,05$.

Fonte: Autora (2025).

O tratamento 0% apresentou menor expressão, em comparação ao grupo 0,35%, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa. No entanto, o grupo que recebeu maior suplementação de fósforo na dieta (0,70%), apresentou maior expressão, sendo estatisticamente significativo ($*p < 0,05$) em comparação ao tratamento 0% e 0,35%. Estes resultados sugerem que a disponibilidade de fósforo na dieta pode desempenhar papel crucial na regulação deste gene, podendo ter implicações relevantes para o crescimento muscular e regulação de genes associados à formação das IBs.

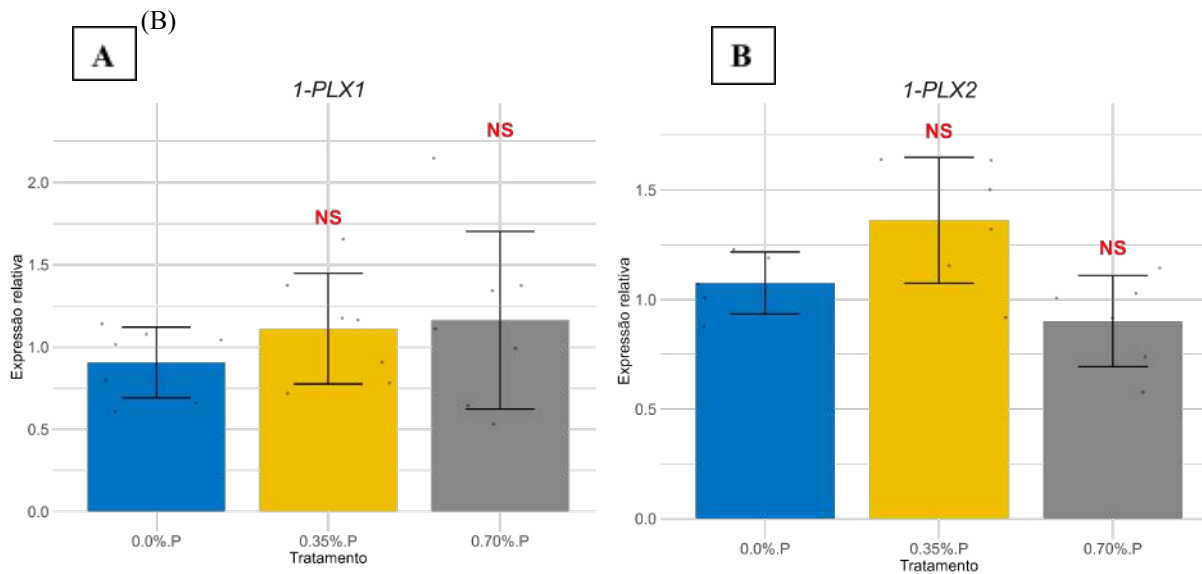
A miostatina pertence à superfamília do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β), responsável pelo controle e ativação da transcrição de genes músculo-específicos, sendo considerada fundamental para a regulação negativa do crescimento do músculo estriado esquelético (SALOMÃO, 2014; OSWALDO; GILMAR; ARIAS, 2020). Estudo realizado por Qin *et al.* (2017), demonstraram que a miostatina promoveu a expressão de genes importantes que atuam na regulação negativa da formação óssea como esclerostina (*sost*), *dkk1* e *rankl* em células osteocíticas cultivadas (Ocy454).

Estudo realizado por Bronze (2020) observou que a expressão de miostatina em tambaqui aumentou conforme o desenvolvimento das IBs. A autora destaca que isso pode estar relacionado ao fato de que conforme ocorre o desenvolvimento das IBs dentro dos mioseptos, a miostatina atue na inibição do crescimento muscular permitindo a formação das IBs. Mendias *et al.* (2008) avaliaram a influência de *mstn* na regeneração de tendões em

camundongos nocauteados com o gene, e constataram que as estruturas apresentavam mais frágeis e menores. Portanto, a miostatina, principalmente a *Mstna* pode ter um papel-chave direta ou indiretamente no processo metabólico para a formação das IBs.

A análise da expressão dos genes *lplxna2 - x1* e *lplxna2 - x2* apresentaram expressão nos três tratamentos, entretanto não foi estatisticamente significativa (Figura 18), para os tecidos alvos do estudo.

Figura 18 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes *l-PLX1* (A) e *l-PLX2*



NS: Diferença não significativa ($p > 0,05$)

Fonte: Autora (2025).

Em humanos a Plexina (*PLXNA2*), é responsável pela codificação da plexina A, que atua como correceptora das semaforinas. As semaforinas são proteínas ligadas à membrana que atuam no desenvolvimento do sistema nervoso, cardiovascular, imunológico, endócrino, hepático, renal, reprodutor, respiratório e musculoesquelético (NCBI, 2015; ALTO; TERMAN, 2016). Em relação a sua atuação em peixes, a função deste gene ainda não se encontra bem estabelecida, necessitando que mais estudos sejam conduzidos a fim de compreender sua função no desenvolvimento ósseo e muscular. A análise da expressão destes genes no tecido cerebral será crucial para entender como a restrição de fósforo pode afetar a atividade gênica.

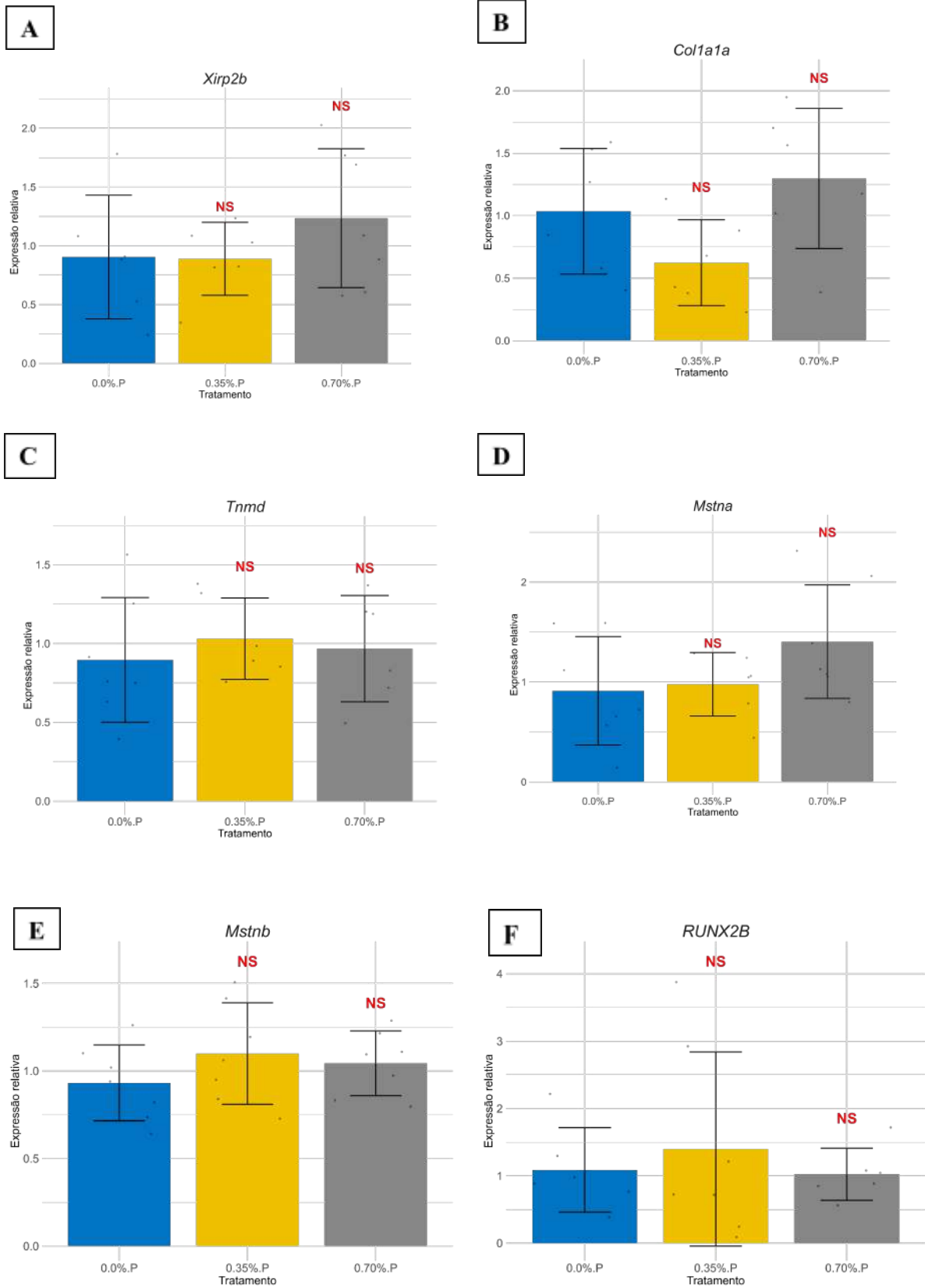
4.6 Expressão relativa dos genes no cérebro

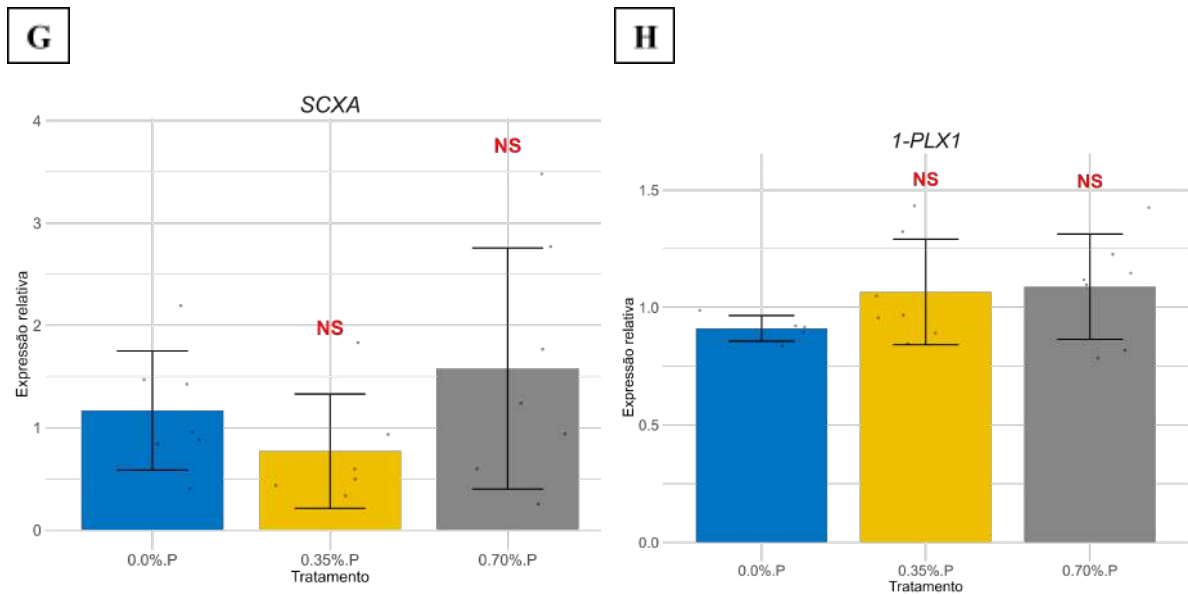
O sistema nervoso central e o cérebro são os principais responsáveis pela coordenação da homeostase corporal, atuando diretamente nas atividades dos órgãos. Apesar de aparentemente não estarem relacionados, cérebro e osso possuem uma dependência bilateral (OTTO et al., 2020). Shi e Chen (2024) ressalta que há uma comunicação bidirecional entre sistema nervoso central (SNC) e metabolismo esquelético, abrangendo uma diversidade de vias de sinalização, fatores neuroendócrinos e mediadores moleculares responsáveis pela comunicação entre metabolismo esquelético e sistema cerebral.

Para compreender os processos moleculares envolvidos na formação das IBs, é fundamental entender como esses genes candidatos interferem no desenvolvimento de outros setores do animal, principalmente no cérebro, que é um órgão altamente importante para coordenação de todos os outros órgãos e sistemas.

A análise da expressão gênica do cérebro dos alevinos de tambaqui, demonstrou que independente dos tratamentos aplicados os genes *xirp2b*, *coll1a1a*, *tnmd*, *mstna*, *mstnb*, *runx2b*, *scxa* e *1 plxnal-x1* encontram-se expressos neste órgão do sistema nervoso central (Figura 19), indicando que possivelmente estes genes desempenham algum papel neste órgão. Entretanto, não foi observada diferença significativa na expressão destes genes em resposta às dietas suplementadas com fósforo ($p > 0.05$ para todas as comparações entre os tratamentos para cada gene).

Figura 19 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR dos genes *Xirp2b* (A); *Coll1a1a* (B); *Tnmd* (C); *Mstna* (D); *Mstnb* (E); *Runx2b* (F); *Scxa* (G) e *I-PLX 1* (H) no cérebro





NS: Diferença não significativa ($p > 0,05$).

Fonte: Autora (2025).

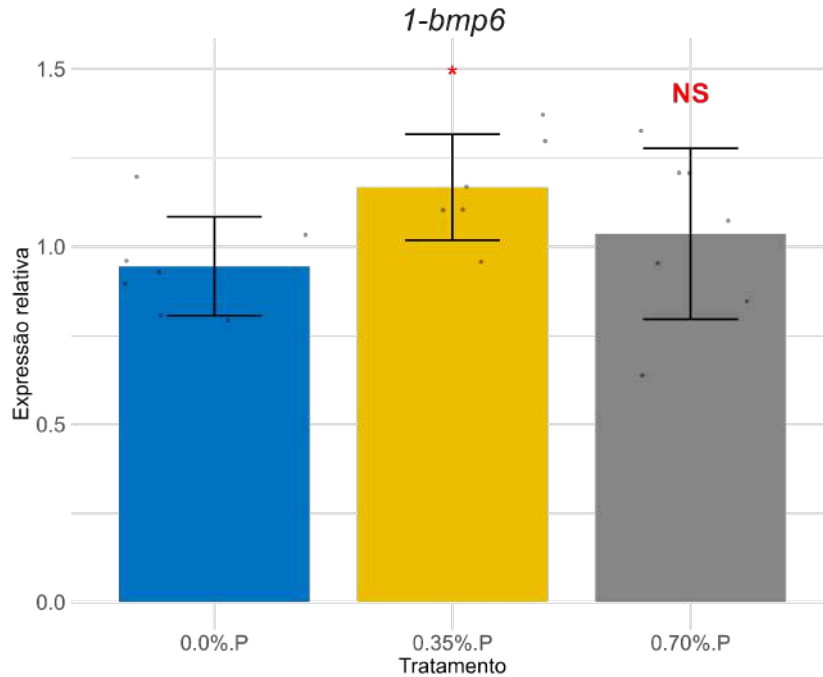
Minoia *et al.* (2023), destacam que apesar de poucos estudos terem sido realizados para investigar a conexão entre sistema ósseo e nervo, é possível que exista uma correlação entre esses dois sistemas, sendo que alterações em um interferem no outro. Os autores destacam que as vias de sinalização Wnt e Hedgehog que desempenham papéis cruciais para o desenvolvimento de tecido e cartilagem. A via Wnt/ β -catenina, por exemplo, é responsável pela expressão de *runx2*, gene importante para diferenciação osteogênica. No entanto, também é um elemento fundamental para a regulação de processos neurais, participando de processos como desenvolvimento do hipocampo e tálamo em camundongos.

Ao estudar a crista neural (NCC) células responsáveis pela origem de neurônios, cartilagem e osso craniofacial em embriões de peixe-zebra, Rocha *et al.* (2020) observaram que a sinalização de BMP induziu a formação da crista neural, e alteração na atividade de BMP durante a gastrulação (processo de desenvolvimento embrionário) interrompeu a formação da NCC. Os autores também observaram que a via de sinalização Wnt desempenhou papel fundamental na indução de NCC, regulada pela expressão dos genes *foxd3* e *sox10*. Esses resultados demonstram que as vias de sinalização que desempenham papel importante na regulação de genes envolvidos no desenvolvimento ósseo também exercem papel fundamental na regulação de genes envolvidos na formação do sistema neural.

O gene *1-bmp6* apresentou expressão nos três tratamentos, com diferença significativa entre a dieta suplementada com 0,35% em relação ao grupo 0% (Figura 20). Esses resultados indicam que essa concentração de fósforo pode representar uma faixa ideal para otimizar a

expressão deste gene no cérebro de alevinos de tambaqui. Portanto, os resultados indicam que em tambaqui a expressão de *1-bmp6* no cérebro necessita de uma faixa ideal de fósforo, e que o aumento adicional de P não proporciona maior expressão do gene. No entanto, é necessário que mais estudos sejam realizados para compreender os mecanismos envolvidos na expressão deste gene mediante a disponibilidade de fósforo na dieta.

Figura 20 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR do gene *1-bmp6* no cérebro



NS: Diferença não significativo ($p > 0,05$); * Diferença significativa $p < 0,05$.

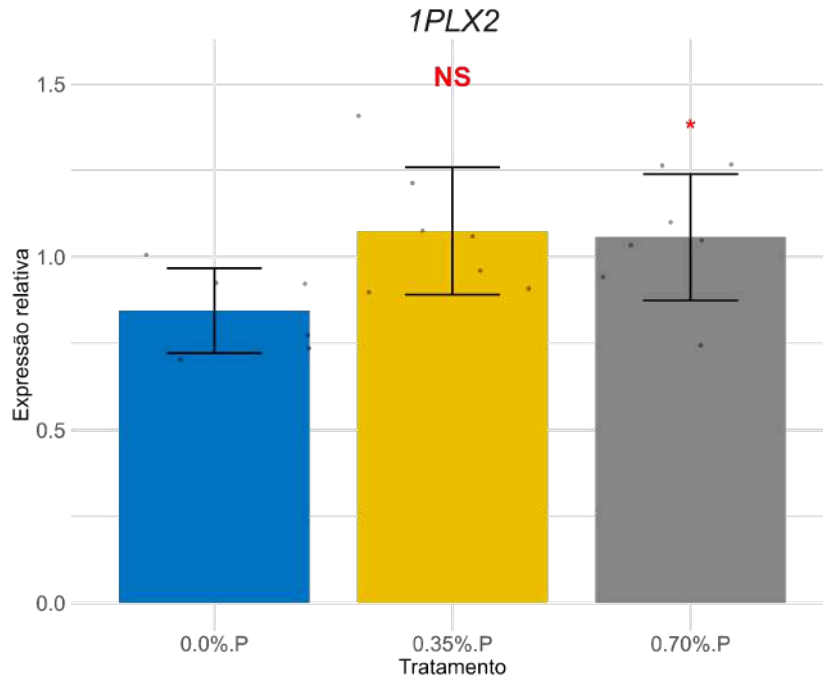
Fonte: Autora (2025).

As proteínas morfogenéticas ósseas (bmps) contém uma gama de genes que estão envolvidos em processos fundamentais do desenvolvimento de vértebras, reabsorção e formação óssea, interligada pela sinalização de múltiplas vias de sinalização como Wnt, Hedgehog Notch e FGF (CHEN *et al.*, 2017). A expressão de 44 ortólogos de BMPs foi analisada em doze tecidos de carpa comum (cérebro, fígado, músculo, rins gônada, coração, pele, brânquias, rins da cabeça, sangue e baço). Os resultados obtidos indicaram que a maioria dos genes analisados apresentaram níveis de expressão mais altos em brânquias, intestino, fígado, baço, sangue e cérebro, apresentando especificidade por estes tecidos (CHEN *et al.*, 2017).

O nível de expressão do gene *1 plxna1-x2* no cérebro apresentou expressão significativa entre os tratamentos 0% e 0.70% (Figura 21). A suplementação de fósforo 0,70% em comparação a dieta sem suplementação (0P) apresentou um efeito significativo na

expressão de *lplxna2-x2* no cérebro dos alevinos de tambaqui, sugerindo que o fósforo pode influenciar em processos biológicos nos quais este gene está envolvido.

Figura 21 — Gráfico de expressão gênica do sequenciamento por qRT-PCR do gene *1 PLX 2* no cérebro.



NS: Diferença não significativo ($p > 0,05$); * Diferença significativa $p < 0,05$.

Fonte: Autora (2025).

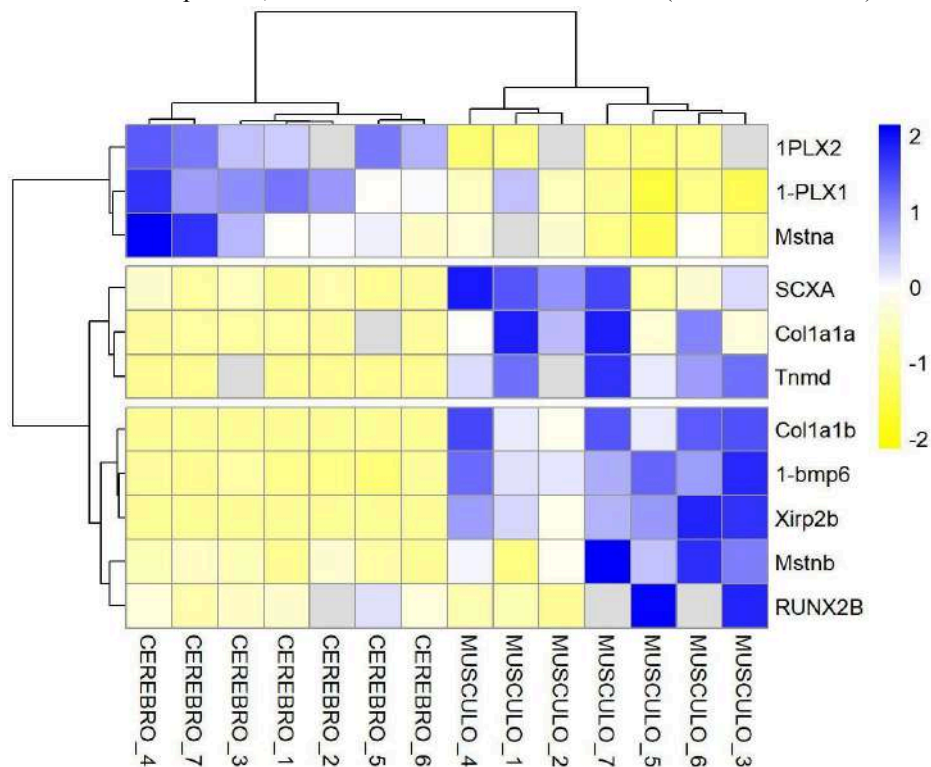
A análise da expressão dos genes da família Plexina por hibridização *in situ* em peixe zebra (*Danio rerio*) durante o desenvolvimento embrionário, observaram que a *plxna1*, *A1b*, *A2*, *A3* e *A4* apresentaram padrões distintos durante as fases embrionárias. Essa variação na expressão sugere que cada gene pode desempenhar papéis específicos na orientação dos neurônios e na formação de conexões neurais em regiões distintas do cérebro e do sistema nervoso (EMERSON *et al.*, 2018).

Dado a importância da plexina para o desenvolvimento do sistema neural e outros órgãos, é necessário que mais estudos sejam realizados, buscando averiguar o papel desses genes em tambaqui e em outras espécies de peixe de importância econômica para a aquicultura, e sua correlação com a disponibilidade de nutrientes como o fósforo que são fornecidos na dieta.

4.7 Padrões de expressão diferencial entre cérebro e músculo

O heatmap apresenta um padrão hierárquico da expressão relativa dos genes (*IPLX-1*, *IPLX-2*, *Mstna*, *Scxa*, *Colla1a*, *Tnmd*, *Colla1b*, *1-bmp6*, *Xirp2b*, *Mstnb* e *Rux2b*) para as amostras de cérebro e músculo, possibilitando visualizar o padrão da expressão gênica agrupada em perfis de similaridade (Figura 22). O tecido muscular apresentou superexpressão de um conjunto de genes associados a crescimento, diferenciação e estrutura muscular, bem como de genes implicados na formação das espinhas intermusculares. Em contrapartida, o cérebro mostra expressão acentuada de genes mais relacionados a funções neurais, regulação de sinalização celular e homeostase metabólica.

Figura 22 - Heatmap da expressão diferencial entre cérebro e músculo. A intensidade das cores representa o nível de expressão gênica: tons de azul escuro indicam alta expressão, enquanto amarelo claro indica baixa expressão, conforme a escala de cores à direita (variando de -2 a 2)



Fonte: Autora (2025).

Os genes *1 PLX-1*, *IPX-2* e *Mstna* apresentaram alta expressão nas amostras de cérebro (coloração azul) e baixa no tecido muscular (coloração amarela). A expressão destes genes no tecido cerebral indica que eles podem estar envolvidos nas vias de sinalização ou processos biológicos específicos no sistema nervoso central. A expressão da *mstna* é particularmente intrigante, dada sua função mais conhecida ser de reguladora do crescimento

muscular, entretanto possivelmente há uma possível relação deste gene no desenvolvimento neural no período avaliado pelo estudo.

Os genes *Scxa*, *Colla1a* e *Tnmd*, apresentam alta expressão nas amostras de músculo em detrimento do cérebro. Este perfil é coerente com suas funções conhecidas como marcadores de tecido conectivo e componentes estruturais da matriz extracelular e do desenvolvimento de tendões. Similarmente, os genes *Colla1b*, *I-bmp6*, *Xirp2b*, *Mstnb* e *Runx2b* apresentaram padrão de expressão maiores no músculo. Os genes *I-bmp6* e *Runx2b*, estão associados ao desenvolvimento ósseo e cartilaginoso, juntamente com *Mstnb* (uma isoforma de miostatina), sugere sua participação em processos de remodelação, diferenciação ou manutenção do tecido musculoesquelético. A co-expressão de *Mstnb* com estes genes pode indicar interações complexas na regulação da massa muscular e tecido adjacente.

Genes como *Runx2*, *Colla1a/b*, *Scxa* e *BMP6* estão fortemente associados à formação de ossos membranosos, incluindo as IBs estruturas calcificadas que se desenvolvem na musculatura dos peixes. Sua superexpressão no músculo corrobora com os dados fenotípicos que mostram maior quantidade de espinhas em condições que favorecem esse perfil transcricional. Costa *et al.*, (2018), ressalta que a concentração de um determinado nutriente na dieta pode interferir no metabolismo e influenciar na expressão gênica. Portanto o nível de P dietético pode interferir no desenvolvimento esquelético e influenciar na expressão de genes específicos.

Este heatmap não apenas valida as diferenças de expressão gênica entre órgãos distintos, mas também fornece *insights* cruciais sobre a co-regulação de genes, indicando possíveis interações biológicas ou envolvimento em vias metabólicas/sinalização comuns. Tais achados são fundamentais para futuras investigações sobre as funções específicas desses genes nos respectivos tecidos e suas implicações biológicas

5 CONCLUSÕES

A expressão diferencial dos genes *Colla1b* e *Mstna* revelou influência significativa da dieta suplementada com fósforo na regulação molecular da formação óssea em tambaquis. O gene *Colla1b* apresentou aumento significativo de expressão sob alta suplementação de fósforo presente no tratamento 0,70%, correlacionando-se com o aumento do número de espinhas intermusculares. Estes achados indicam que este gene pode estar diretamente envolvido no processo de osteogênese induzido por fósforo em músculos esqueléticos, enquanto *Mstna* pode desempenhar papel secundário, possivelmente associado ao remodelamento muscular em resposta à osteogênese local. Tais evidências reforçam o papel do fósforo como modulador da biologia óssea em peixes neotropicais e destacam a importância de *Colla1b* como marcador funcional da formação de IBs em alevinos de tambaquis.

A análise integrada da expressão gênica e fenótipo ósseo demonstrou que a formação das espinhas intermusculares (IBs) em tambaquis está associada à ativação coordenada de genes osteogênicos como *Colla1b* juntamente com reguladores de diferenciação de tecidos. Este padrão é especialmente evidente em peixes submetidos à dieta com 0,70% de fósforo, que apresentaram maior número de IBs. Esses dados indicam que o fósforo dietético promove a formação de IBs via ativação de um programa molecular osteogênico-muscular específico.

Por outro lado, a expressão gênica diferencial entre músculo e cérebro em tambaquis identificou dois programas biológicos distintos: um perfil osteomuscular altamente ativado no músculo, com superexpressão de genes associados à formação de espinhas intermusculares, crescimento tecidual e remodelamento celular, e outro mais regulatório e conservador no cérebro, voltado à manutenção da homeostase neural. Este padrão confirma a relação funcional entre expressão gênica e a morfologia adaptativa observada no músculo, particularmente em resposta ao fósforo dietético e à presença de IBs.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Evenise Ribeiro de; MENDES, Soraya Helena de Araújo. Criação de peixe no Tocantins: a contribuição da piscicultura para o desenvolvimento local. **Revista São Luis Orione Online**, Araguaína - TO, Ano XIV, v. II, n. 9, p. 20-33, jan./dez. 2015.
- ALTO, Laura Taylor; TERMAN, Jonathan R. Semaphorins and their Signaling Mechanisms. **Methods Mol Biol.** p. 1-25, 2016.
- ARIDE, Paulo Henrique Rocha *et al.* Growth and hematological responses of tambaqui, *Colossoma macropomum* fed different levels of rice, *Oryza* spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 4, p. 962-968, 2020.
- ARUMUGAM, Manikandan *et al.* Recent advances in tilapia production for sustainable developments in Indian aquaculture and its economic benefits. **Fishes**, v. 8, n. 4, p. 176, 2023.
- BARÇANTE, Bruna; SOUSA, Alexandre Benvindo de. Características zootécnicas e potenciais do tambaqui (*Colossoma macropomum*) para a piscicultura brasileira. **PubVet**, v. 9, n. 07, 2015.
- BARROSO, Aurisan da Silva. **Desenvolvimento ontogenético de espinhas intermusculares em tambaqui (*Colossoma macropomum*): remodelagem esquelética e reabsorção.** 2022. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2022.
- BEBER, Gisele Miyamura Martins. **Interação músculo-osso: papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto.** 2021. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.
- BOGLIONE, Clara *et al.* Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: Normal and anomalous skeletogenic processes. **Reviews in Aquaculture**, v. 5, p. 99-120, 2013.
- BRABO, Marcos Ferreira *et al.* Viabilidade econômica da produção familiar de tambaqui em gaiolas flutuantes no Oeste paraense, Amazônia, Brasil. **Custos e @gronegocio online**, v. 13, n. 1, jan./mar. 2017. Disponível em: www.custoseagronegocioonline.com.br. Acesso em: 01 jun. 2024.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Ordenamento e Desenvolvimento da Cadeia Produtiva da Aquicultura.** 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/mpa/aquicultura-1/aquicultura>. Acesso em: 01 jun. 2024.
- BRONZE, Emily. **Investigação de mecanismos genéticos associados às vias de formação de ossos intermusculares no Tambaqui (*Colossoma macropomum*).** 2020. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) — Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2020.
- CHEGENI, Alireza. **What are isonitrogenous and isocaloric diets?** [S. l.]: ResearchGate, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/post/What-are-isonitrogenous-and-isocaloric-diets/5731f5bd40485470b66b66d1/citation/download>. Acesso em: 15 jan. 2025.

CHEN, Jing *et al.* Genome-wide analysis of intermuscular bone development reveals changes of key gene expression and signaling pathways in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 654-663, 2021.

CHEN, Lin *et al.* Genome wide identification, phylogeny, and expression of bone morphogenetic protein genes in tetraploidized common carp (*Cyprinus carpio*). **Gene**, v. 627, p. 157-163, 2017.

CHEN, Ming-Ming *et al.* Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 785712, 2021.

CIRNE, Luis Gabriel Alves *et al.* Características morfométricas e da carcaça de tambaqui abatidos com diferentes pesos. **Magistra**, v. 30, p. 160-167, 2019.

COSTA, Andrey Chama da; SILVA, Mônica Aparecida da Rocha; SOUSA, Diego Neves de. Avaliação do plano de desenvolvimento da piscicultura no Tocantins: desafios e perspectivas. **Colóquio – Revista do Desenvolvimento Regional - Faccat**, Taquara/Rs, v. 20, n. 4, p. 1-2, 21 maio 2023.

COSTA, Juliana M. *et al.* Inadequate dietary phosphorus levels cause skeletal anomalies and alter osteocalcin gene expression in zebrafish. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 364, 2018.

COSTA, Juliana Mara. **Níveis de fósforo em dietas para Zebrafish Danio rerio**. 2015. 77 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

COTTI, Silvia *et al.* Matrix first, minerals later: fine-tuned dietary phosphate increases bone formation in zebrafish. **JBMR Plus**, p. 81, 2024.

DAIRIKI, Jony Koji; SILVA, Thyssia Bomfim Araújo. **Revisão de literatura: exigências nutricionais do tambaqui – compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011. 44 p. (Documentos; 91).

DALLE CARBONARE, Luca *et al.* Modeling Musculoskeletal Disorders in Zebrafish: Advancements in Muscle and Bone Research. **Cells**, v. 14, n. 1, p. 28, 2024.

DURÁN, I. *et al.* Actinotrichia collagens and their role in fin formation. **Developmental biology**, v. 354, n. 1, p. 160-172, 2011.

EMERSON, Sarah. E. *et al.* Neuronal expression patterns of the PlexinA family during zebrafish development. **Gene Expression Patterns**, v. 27, p. 56-66, 2018.

FAO. **O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2020. Sustentabilidade em ação**. Roma: FAO, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>. Acesso em: 12 set. 2024.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation**. Roma: FAO, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. Acesso em: 12 set. 2024.

FAO. **Informe da FAO: A produção mundial de pesca e aquicultura atingiu novo recorde histórico.** Roma: FAO, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/1696371/>. Acesso em: 12 out. 2024.

FAO. **Uma produção pesqueira e aquícola sem precedentes contribui decisivamente para a segurança alimentar global.** Roma: FAO, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/es/c/1585153/>. Acesso em: 05 out. 2024.

FERREIRA, Lucas Eduardo de Lima *et al.* Análise da concentração do mercado de exportação de pescado. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 14, n. 1, p. 1-13, dez., 2021.

FERREIRA, Valéria Fernandes; MUNIZ, Claumir César; OLIVEIRA JUNIOR, Ernandes Sobreira. Evolução da piscicultura no estado de Mato Grosso: panorama da cadeia produtiva de peixes em cativeiros. **Revista Equador**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 383-402, abr., 2024.

FISCHER, Marta Luciane *et al.* Panorama da nutrigenômica no Brasil sob a perspectiva da Bioética. **Revista Latinoamericana de Bioética**, v. 20, n. 1, p. 27-48, 2020.

FURTADO, Meison *et al.* Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. **Engineered Regeneration**, v. 3, n. 3, p. 217-231, 2022.

GISTELINCK, Charlotte *et al.* Zebrafish type I collagen mutants faithfully recapitulate human type I collagenopathies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.115, n. 34, p. E8037–E8046, 2018.

GROBET, Luc *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. **Nature genetics**, v. 17, n. 1, p. 71-74, 1997.

HUE, Isabelle *et al.* Recent advances in the crosstalk between adipose, muscle and bone tissues in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, p. 1155202, 2023.

HUITEMA, Leonie FA *et al.* Entpd5 is essential for skeletal mineralization and regulates phosphate homeostasis in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 52, p. 21372-21377, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2023**. v. 51, p. 1-12. Rio de Janeiro: IBGE, 2023.

IMBIRIBA, Emir Palmeira; LOURENÇO JÚNIOR, José de Brito; CARVALHO, Luiz Octávio Danin de Moura. **Parâmetros ambientais e qualidade da água na piscicultura**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 4 p. (Recomendações Técnicas, n. 8).

JOVANOVIC, Milena; GUTERMAN-RAM, Gali; MARINI, Joan C. Osteogenesis imperfecta: mechanisms and signaling pathways connecting classical and rare OI types. **Endocrine reviews**, v. 43, n. 1, p. 61-90, 2022.

KAMBADUR, Ravi *et al.* Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome research**, v. 7, n. 9, p. 910-915, 1997.

KATAGIRI, Takenobu; WATABE, Tetsuro. Proteínas morfogenéticas ósseas. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 6, p. a021899, 2016.

KOMORI, Toshihisa. Roles of Runx2 in skeletal development. **RUNX Proteins in development and cancer**, p. 83-93, 2017.

KUANG, Youyi *et al.* Generate a new crucian carp (*Carassius auratus*) strain without intermuscular bones by knocking out *bmp6*. **Aquaculture**, v. 569, p. 739407, 2023.

LALL, Santosh P. The minerals. In: **Fish nutrition**. Academic Press, 2022. p. 469-554.

LI, Bo *et al.* Mecanismos moleculares do desenvolvimento ósseo intermuscular em peixes: uma revisão. **Pesquisa zoológica**, v. 42, n. 3, p. 362, 2021.

LI, Ling *et al.* Comparative analysis of intermuscular bones in fish of different ploidies. **Science China Life Sciences**, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 341-350, abr. 2013.

LIMA, Carlos André Silva *et al.* Análise socioeconômica e lucratividade da piscicultura do tambaqui (*Colossoma macropomum*) no estado do Amazonas, Brasil. In: MATOS, Bruno Oliveira de. *et al.* (orgs.). **Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias**. Ponta Grossa: Atena, 2021. p. 86-112.

LIMA, Leandro Kanamaru Franco de *et al.* Rendimento e composição centesimal do tambaqui (*Colossoma macropomum*) por diferentes cortes e categorias de peso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 12, n. 2, p. 223-235, 2018.

LUDERMAN, Lauryn; UNLU, Gokhan. Zebrafish Developmental Models of Skeletal Diseases. **Current Topics of Biology**. [S. l.]: [s. n.], 2017. cap. 3, p. 24-81.

LYALL, Brianne A. *et al.* The problems with pin bones: Intermuscular bone development and function in salmonids and their implications for aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [S. L.], v. 16, n. 4, p. 1981-1995, set., 2024.

MAIR, Graham Charles *et al.* A decadal outlook for global aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 54, n. 2, p. 196-205, 2023.

MENEZES, Ludmila LC *et al.* A new approach for quantifying phosphorus requirement in *Colossoma macropomum* using CT scanning. **Aquaculture Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 1798-1810, 2021.

MINOIA, Arianna *et al.* Bone Tissue and the Nervous System: What Do They Have in Common? **Cells, Basel**, v. 12, n. 1, p. 1-20, 2023.

MORAIS, Iraní da Silva de; ALMEIDA, Fernanda Loureiro de O'Sullivan. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 81-93, 2017.

MORO, Giovanni Vitti; TORATI, Lucas Simon; LUIZ, Danielle de Bem; MATOS, Flávia Tavares de. Monitoramento e manejo da qualidade da água em pisciculturas. In: RODRIGUES, A. P. O. *et al.* (Org.). **Piscicultura de água doce: multiplicando**

conhecimentos. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap. 5, p. 141-169.

MUBANGO, Elliot *et al.* Intermuscular bones in Asian carps: health threats, solutions, and future directions. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, v. 31, n. 2, p. 233-258, 2022.

NAYLOR, Rosamond; FANG, Safari; FANZO, Jessica. A global view of aquaculture policy. *Food Policy*, [S.L.], v. 116, p. 102422, abr. 2023.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information Anúncios do RefSeq**. 2015.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/announcements/201>. Acesso em: 21 jan. 2025.

NIE, Chunhong *et al.* Loss of scleraxis leads to distinct reduction of mineralized intermuscular bone in zebrafish. *Aquaculture and Fisheries*, v. 6, n. 3, p. 169-177, 2021.

NIE, Chun-Hong *et al.* Single-cell transcriptomes and *runx2b*^{-/-} mutants reveal the genetic signatures of intermuscular bone formation in zebrafish. *National science review*, v. 9, n. 11, p. nwac152, 2022.

NIE, Chun-Hong *et al.* Understanding the development of intermuscular bones in teleost: status and future directions for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 2, p. 759-772, 2020.

OFER, Lior *et al.* A novel nonosteocytic regulatory mechanism of bone modeling. *PLoS biology*, v. 17, n. 2, p. e3000140, 2019.

OLIVEIRA, Antônia Valcemira Domingos de *et al.* Utilização da ultrassonografia para o diagnóstico reprodutivo e detecção de espinha intermusculares “Y” em Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Observatório de La Economía Latinoamericana*, [S.L.], v. 22, n. 7, p. 59-99, 24 jul. 2024.

OLIVEIRA, Leticia Tuane Souza. **Sistematização dos estudos nutrigenômicos com peixes: caracterização e metanálise**. 2024. 66 f. Tese (Doutorado em Zootecnia Tropical) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2024.

OLIVEIRA, Marcos Antonio de *et al.* Fishing Agribusiness Management: Importance of the sector for Brazil. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 7, p. e39511729974, 2022.

OLIVEIRA, Naislan FA *et al.* O tamanho dos peixes se correlaciona com o tamanho e a morfologia dos ossos intermusculares do Tambaqui *Colossoma macropomum*, conforme demonstrado por métodos de dissecação e imagem de raios X. *Fishes*, v. 8, n. 4, p. 180, 2023.

OSWALDO, Charles; GILMAR, José; ARIAS, Ángel Andrés. Influência de fatores abióticos sob miogênese de peixes teleósteos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, v. 15, n. 3, p. 41-50, 2020.

OTTO, Ellen *et al.* Interação entre cérebro e osso — observações clínicas e suas bases moleculares. *Revista internacional de ciências moleculares*, v. 21, n. 14, p. 4946, 2020.

OWEN, Richard. *On the anatomy of vertebrates*. London: Longmans, Green, and Co., 1866. Disponível em: <https://books.google.co.mz/books?id=R5I-AAAACAAJ&hl=pt-PT&pg=PA6#v=onepage&f=false>. Acesso em: 12 nov. 2024.

PATTERSON, Colin; JOHNSON, G. David. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes. **Smithsonian Contributions To Zoology**, [S.L.], n. 559, p. 1-83, 1995.

PEDROZA FILHO, Manoel Xavier; ROUTLEDGE, Eric Arthur Bastos. Intensificação produtiva da aquicultura brasileira e novas demandas tecnológicas. **Nota técnica**: Palmas: Embrapa, 2016.

PEDROZA FILHO, Manoel Xavier *et al.* **O mercado de peixes da piscicultura no Brasil: estudo do segmento de supermercados**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2020.

PEIXE BR, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário Peixe BR da Piscicultura 2024**. 2024. Disponível em: <https://peixebr.com.br>. Acesso em: 13 out. 2024.

PEZZATO, Luiz Edivaldo *et al.* Exigência em fósforo disponível para alevinos de tilápia do Nilo. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1600-1605, 2006.

PINTO, Anderson Rogério Faia; GALVÃO, Ozias Marciliano. Uma revisão da literatura brasileira sobre os métodos de custeio aplicados à piscicultura no Brasil. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 25, 1914, 2023.

QIN, Yiwen *et al.* Myostatin inhibits osteoblastic differentiation by suppressing osteocyte-derived exosomal microRNA-218: A novel mechanism in muscle-bone communication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 26, p. 11021-11033, 2017.

ROCHA, Manuel *et al.* Neural crest development: insights from the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 249, n. 1, p. 88-111, 2020.

ROCHA, Mariucha Karina Honório Ribeiro. **Fósforo disponível na mineralização óssea de alevinos da tilápia do Nilo**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) — Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, 2012.

RODRIGUES, Ana Paula Oeda. **Piscicultura de água doce – multiplicando conhecimentos: Nutrição e alimentação de peixes**. 1 ed., Brasília: Embrapa, 2013.

ROTTA, Maurício Aurélio. **Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003.

SALOMÃO, Rondinelle Artur Simões. **Crescimento compensatório em linhagens de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus* L.) cultivadas em ambiente resfriado: morfologia muscular e expressão de genes relacionados ao crescimento muscular**. 2014. 62 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

SANTOS, Janaina Janaina dos Santos. **Exigência em fósforo digestível para tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. 2012. 111 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) — Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

SEBRAE - SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS **Aquicultura no Brasil: Série Estudos Mercadológicos**. Brasília: SEBRAE, 2015.

SIDONIO, Luiza *et al.* **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. BNDES Setorial, n. 35, mar. 2012, p. 421-463, 2012.

SHI, Haojun; CHEN, Min. The brain–bone axis: Unraveling the complex interplay between the central nervous system and skeletal metabolism. **European Journal of Medical Research**, v. 29, n. 1, p. 317, 2024.

SIQUEIRA, Tagore Villarim de. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. **Boletim Regional, Urbano e Ambiental**, Brasília, n. 17, p. 53-59, jul./dez. 2018. Disponível em: <https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/8142>. Acesso em: 8 nov. 2024.

SOUSA, Thalles José Rego de. **Exigência de fósforo para tambaqui (*Colossoma macropomum*) em diferentes faixas de peso**. 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Chapadinha, 2017.

SOUZA, Ana Claudia Silva de *et al.* Produção e caracterização de farinha e óleo de resíduo de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 6, p. 407-430, 2020.

SUAREZ-BREGUA, Paula *et al.* Impact of dietary phosphorus on turbot bone mineral density and content. **Aquaculture Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 1128-1134, 2021.

SUGIURA, Shozo H. *et al.* Digestibilidade aparente de proteínas e disponibilidade de minerais em vários ingredientes para rações de salmonídeos. **Aquaculture**, v. 159, n. 3-4, p. 177-202, 1998.

TIRABASSI, Rebecca. How to Quality Control Check Your RNA Samples. **Bitesize Bio**, 20 jun. 2024. Disponível em: <https://bitesizebio.com/13527/how-to-quality-control-check-your-rna-samples>. Acesso em: 19 maio. 2025.

VALENTE, Luísa MP. Nutrição e alimentação de peixes. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 4, p. 73, 2018.

WAN, S.-M. *et al.* Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Scientific Reports**, v. 6, p. 31050, 2016.

WITTEN, Paul Eckhard; HUYSSEUNE, Ann. A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. **Biological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 315-346, 2009.

XU, Huan *et al.* Transcriptomic analysis provides insights to reveal the bmp6 function related to the development of intermuscular bones in zebrafish. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 821471, 2022.

YANG, Jian *et al.* Comparative analysis of embryonic muscle development in wildtype zebrafish and its intermuscular bone deficiency mutant[J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, v. 26, n. 2, p. 296-303, 2019.

YAO, Wenjie *et al.* Different ossification patterns of intermuscular bones in fish with different swimming modes. **Biology Open**, [S.L.], v. 4, n. 12, p. 1727-1732, 24 nov. 2015. The Company of Biologists.

YE, Weidong *et al.* Profiling the Spatial Expression Pattern and ceRNA Network of lncRNA, miRNA, and mRNA Associated with the Development of Intermuscular Bones in Zebrafish. **Biology**, v. 12, n. 1, p. 75, 2022.