

**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**

**Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP**

**Campus de Jaboticabal**

Efeito do jejum sobre o desempenho zootécnico, crescimento e degradação muscular  
e alterações hepáticas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Ma. Olívia Cristina Camilo Menossi  
Bióloga

Jaboticabal – São Paulo  
Agosto – 2014

M547e Menossi, Olívia Cristina Camilo  
Efeito do jejum sobre o desempenho zootécnico, crescimento e  
degradação muscular e alterações hepáticas de juvenis de pacu  
*Piaractus mesopotamicus*. – Jaboticabal, 2014  
xix, 65 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de  
Aquicultura da UNESP, 2041

Orientadora: Maria Célia Portella

Banca examinadora: Laura Satiko Okada Nakaghi, Luiz Roberto  
Furlan, Natália de Jesus Leitão, Rosângela Kiyoko Jomori Bonichelli  
Bibliografia

1. Atrofia muscular. 2. Histologia. 3. Pacu. I. Título. II. Centro de  
Aquicultura.

CDU 639.3.043

**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**

**Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP**

**Campus de Jaboticabal**

Efeito do jejum sobre o desempenho zootécnico, crescimento e degradação muscular e alterações hepáticas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*

Ma. Olívia Cristina Camilo Menossi

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Portella

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai

Tese apresentada ao Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AQUICULTURA.

Jaboticabal – São Paulo

Agosto - 2014

*"Tear your web away  
Saw thru all your bars  
Melt your cell today.  
You are caught  
in a prison  
of your own  
devise.  
Fly fast away  
Don't miss your chance  
To swim in mystery..."*

*"Rasgue essa sua rede  
Arrebente todas as suas grades  
Derreta sua cela hoje mesmo  
Você foi condenada  
a uma prisão  
Que você mesma  
criou.  
Voe rápido para longe  
Não perca a sua chance  
De nadar no mistério..."*

*The Doors*

## Dedicatória

Ao meu sobrinho Lucca... Meu pequeno bem-te-vi fazedor de dias bonitos.

Aos meus pais, Benedita Camilo Menossi e Adão Geraldo Menossi. Por sempre e incondicionalmente, acreditarem em mim e me darem o suporte necessário para eu permanecer tentando conquistar um ponto mais alto em minha vida.

Todos os dias eu sou e serei grata.

Aos meus irmãos Afonso e Rafa, pelo apoio, risadas, amizade e um sentimento que não é explicável ou cabe em palavras. E, às minhas cunhadas, Juliana e Italine, por integrarem e expandirem a família de forma tão bonita.

O amor que sinto por vocês sempre me fortaleceu.

Vó Olívia... por demonstrar a cada queda, a persistência pela vida.

Ao Kauê, que tem sido a luz em meus dias e que fez com que eu encontrasse dentro de mim força, garra e vontade para continuar, mesmo quando eu esqueço o caminho.

*“Se você não desafoga a tua mente, ela te afoga.”*

E, especialmente, à minha orientadora Maria Célia Portella. Por todos os dez anos de amizade, carinho, respeito, compreensão...

Não existem palavras para agradecer o quanto me orienta, em todos os sentidos que a vida nos permite.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, pelo auxílio concedido por meio de Bolsa de Doutorado e a FAPESP pela concessão do Auxílio à Pesquisa.

Aos docentes e funcionários do programa de Pós Graduação do Caunesp, especialmente aos funcionários da Pós Graduação, David e Vera.

À coorientadora Profa. Dra. Maeli Dal Pai por ter disponibilizado seu laboratório e por ter despertado o interesse de quebrar limites ao adentrar em um campo da ciência até então desconhecido (e temido) por mim.

Aos membros participantes da banca do Exame Geral de Qualificação, Profa Dra. Janete Aparecida Desidério e Dra. Fernanda Regina Carani e da banca de defesa, Profa. Dra Laura Satiko Okada Nakaghi, Profa. Dra. Kiyoko Jomori Bonichelli, Dra. Natalia de Jesus Leitão e Prof. Dr. Luiz Roberto Furlan pelas valiosas correções e contribuições.

Aos doutores Fernanda Carani e Edson Mareco pela imensa ajuda nas análises moleculares. O auxílio de vocês foi de essencial importância para eu conseguir concluir o trabalho.

À Piscicultura Colpani, por fornecer as larvas para realização da presente pesquisa.

Aos meus amigos de trabalho: Rodrigo Takata, Natália Leitão, Caroline Nebo, Hellen Buzollo, Thiago Nascimento, Lidiane de Sandre, Gisele Fávero, Taís Lopes, Bruna Cabral, Thyssia Bomfim, Amanda Halum, Jesaías Ismael Costa, Raphael Serafini, Andressa Inocente, Thalys Vinícius. E, especialmente, ao Thiago Mendes de Freitas (Nog), que se tornou um amigo para vida inteira. À Juliana Tomomi Kojima, pois é um aprendizado diário trabalhar ao seu lado. Ao Rubens Antônio F. Turin por toda a ajuda durante a condução do experimento e análises biométricas infinitas, e à Silvinha

Regina Ligeiro, por todo auxílio nas biometrias ao longo desses anos de trabalho no CAUNESP.

Aos amigos de Bertioga, em especial Giu Rodrigues e Paty Murayama, que sempre me acolheram de volta fazendo com que sentisse que o tempo passa, mas amizades sinceras permanecem.

À família que conquistei ao longo de anos em Jaboticabal. Aline Raquel (Papete), Aline Calza (Maloca), Denise Ap. Chiconato, Marina M. Carvalho (Porka), Maria Fernanda (Pops), Sueyde (K-oral), Maridélia (Arriba), Thais Sgarbiero (Shitake), Gabriela Nazário (Traça), Gabriela Martins (Aôtra) e Murilo Dias (Bici). Vocês são de vital importância para mim, tornando meus dias sempre melhores.

Aos amigos que me auxiliaram sempre, mesmo que à distância, com palavras, imagens e poesias: Raul, Priscila de Menezes, Eder Prado, Alexandre Mercês e Romero Curtis, Vocês permanecem em minha memória sempre. Em dias bons e em dias não tão bons assim... Minhas conquistas também são devido à força que me deram.

À amiga Kezia Maria.... Obrigada por toda atenção, dedicação e amizade. O destino foi bom em te colocar entre os meus.

À todos os amigos que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos.

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1 Crescimento muscular.....	3
2.2 Fator semelhante à insulina (IGF).....	8
2.3 Atrofia Muscular .....	9
2.3.1 Vias de degradação muscular.....	10
2.4 Pacu.....	13
3. Hipótese.....	14
4. Objetivos.....	14
5. Material e Métodos.....	15
6. Resultados.....	22
6.1 Sobrevivência, mortalidade e canibalismo aparente.....	22
6.2 Crescimento.....	24
6.3 Morfometria das fibras musculares.....	25
6.4 Morfologia das fibras musculares.....	29
6.5 Efeitos no fígado.....	32
6.6 Expressão gênica.....	35
7. Discussão.....	36
8. Conclusões.....	44
9. Referências Bibliográficas.....	45

## RESUMO

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é uma espécie de grande importância econômica no Brasil e muitos estudos sobre sua fase inicial já foram conduzidos visando viabilizar o cultivo intensivo dessa espécie. Peixes passam por períodos em jejum, tanto em condições naturais quanto nas de cultivo, ocorrendo a ativação de sistemas proteolíticos ocasionando a degradação do tecido muscular, o que implica na redução da musculatura estriada esquelética, parte mais importante do animal em termos produtivos. Assim, fazem-se necessárias pesquisas visando compreender a formação e degradação do tecido muscular, uma vez que essa é a principal parte comercializada. Nesse estudo, juvenis de pacu com  $20,4 \pm 0,7$  mm de comprimento total e  $90,3 \pm 4,1$  mg de peso médio foram estocados em 20 tanques de 50 L a uma densidade de 10 peixes/L. Três períodos de jejum foram avaliados: J4, J8 e J11, correspondentes a 4, 8 e 11 dias de jejum. Após este período, os peixes foram realimentados por 20 dias com náuplios de artêmia. O controle positivo (ART) foram peixes alimentados com náuplios de artêmia durante todo o período experimental. Amostras para análises biométricas, histológica do fígado e musculo esquelético e de expressão de genes que controlam o crescimento e atrofia muscular foram coletadas no final de cada período de jejum e ao final do experimento. As fibras musculares foram distribuídas nas seguintes classes de diâmetro ( $d = \mu\text{m}$ ): Classe 10 =  $d \leq 10$ , Classe 20 =  $10 < d \leq 20$ , Classe 30 =  $20 < d \leq 30$ , Classe 40 =  $30 < d \leq 40$ , e classe 50 =  $d > 40$ . No final do período de jejum observou-se que o crescimento dos juvenis celularidade das fibras musculares foram afetados pelo jejum. Os animais do tratamento J11 apresentaram alta incidência de atrofia das fibras musculares, como revelado pelo aumento das frequências das fibras nas classes de fibras 10 e 20. Comportamento semelhante foi observado nos animais mantidos 8 dias em jejum (J8). Já os peixes do tratamento J4 demonstraram uma menor incidência de atrofia muscular e frequência de fibras das classes 10, 20, 30 e 50, semelhantes ao controle positivo. O glicogênio acumulado no fígado dos animais em jejum foi diminuindo à medida que o período de jejum aumentou. Além disso, os animais dos tratamentos J8 e J11 apresentaram no fígado, áreas de necrose e infiltração do tecido conjuntivo. Em relação à expressão gênica, foi observada maior taxa de expressão dos genes relacionados à atrofia muscular (MuRF-1a e MAFbx) nos animais mantidos em

jejum e, para o gene IGF-1a, a expressão foi reduzida com o prolongamento do jejum, diferindo estatisticamente do controle alimentado. Após a realimentação por 20 dias, não houve diferença estatística na frequência de fibras musculares nas classes 10 e 30 entre os peixes do tratamento J4 e o controle positivo. Já o tratamento J11 apresentou menor frequência de fibras de classe 10, o que indica que esses animais tiveram menor investimento no crescimento hiperplásico quando comparado ao controle positivo. Assim, observa-se que longos períodos de jejum em juvenis de pacu pode comprometer a formação de novas fibras musculares, diminuindo a hiperplasia e ocasionando maior investimento no crescimento hipertrófico.

## ABSTRACT

The pacu, *Piaractus mesopotamicus*, is a species with great economic importance in Brazil and many studies on its initial phase have been conducted to enable the intensive culture of this species. Fish undergo fasting periods, both in natural conditions as in the intensive rearing, causing activation of proteolytic systems due to the breakdown of muscle tissue, which implies the reduction of the skeletal striated muscles of the animal, the edible part of fish. In this way, more research is necessary to understand the formation and breakdown of muscle tissue. In this study, juvenile pacu with  $20.4 \pm 0.7$  mm in total length and  $90.3 \pm 4.1$  mg of average weight were stocked in 20 tanks of 50 L at a density of 10 fish/L. The fasting periods evaluated were: J4; J8 and J11, corresponding to 4, 8 and 11 days of fasting. After this period, the fish were refeed for 20 days with artemia nauplii. The positive control (ART) was fish fed newly hatched artemia nauplii throughout the experimental period. Samples for growth, histological analysis of liver and muscle fibers and gene expression were collected at the end of each period of fasting and at the end of the experiment. Muscle fibers were distributed into the following diameter classes ( $d = \mu\text{m}$ ): Class 10 =  $d \leq 10$ , Class 20 =  $10 < d \leq 20$ , Class 30 =  $20 < d \leq 30$ , Class 40 =  $30 < d \leq 40$ , and class  $d \geq 50$ . At the end of the fasting period, growth, survival and the frequency of muscle fibers were affected by fasting. The fish in the treatment J11 showed high incidence of muscle fiber atrophy, as revealed by increased frequencies in classes 10 and 20 fibers. Similar pattern was observed in animals kept eight days fasting (J8). The fish of the treatment J4 showed a lower incidence of muscle fiber atrophy and the frequency of fiber classes 10, 20, 30 and 50 was similar to the positive control. The glycogen storage in the liver of fasted animals was decreased as higher was the fasting period. Furthermore, the animals of J8 and J11 treatments showed areas of necrosis and infiltration of the connective tissue. Regarding gene expression, higher rate of expression of genes related to muscle atrophy (MAFbx and MuRF-1a) was observed in fasted animals. The expression of IGF-1a was reduced with prolonged fasting, differing statistically to the fed control. After refeeding (20 days), there was no statistical difference in the frequency of muscle fibers of classes 10 and 30 between fishes of the treatment F4 and the positive control, indicating that these animals did not show the hyperplastic growth affected by fasting. On the other hand, the treatment J11 showed

lower frequency class fiber 10, indicating that these animals had smaller investment in hyperplastic growth compared to the positive control. Thus, it is concluded that long periods of fasting in juvenile pacu may compromise the formation of new muscle fibers, reducing the hyperplasia and causing a greater investment in hypertrophic growth.

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma atividade que vem crescendo no Brasil nos últimos anos, e pode ser relacionada com a grande extensão territorial do país e sua abundância em recursos hídricos, além da presença de muitas espécies cultiváveis (PORTELLA et al. 2014). A produção brasileira é compreendida principalmente por espécies de água doce, atingindo cerca de 545 mil toneladas em 2011 (MPA 2013). Porém, baseia-se principalmente em espécies exóticas como a tilápia-do-nilo (46,6%), carpa e trutas. Entre as espécies nativas mais cultivadas encontram-se os da família Characidae (tambaqui, *Colossoma macropomum*, e pacu, *Piaractus mesopotamicus*), com cerca de 250 mil toneladas (MPA 2013).

Com o crescimento da piscicultura, há maior demanda de larvas e juvenis de peixe, evidenciando a necessidade de maiores estudos nessas fases iniciais, etapa considerada a mais crítica e um entrave produtivo (JOMORI et al. 2003). As espécies nativas dos peixes neotropicais são consideradas “altriciais” (PORTELLA et al. 2014). No início da alimentação exógena, essas larvas apresentam o tubo digestório indiferenciado, e por isso não são capazes de digerir eficientemente dietas inertes e essa imaturidade do trato digestório de larvas altriciais torna difícil a aceitação de dietas inertes como primeira fonte de alimentação, e é necessário o uso de alimento vivo nessa etapa inicial. O insumo fornecido geralmente é náuplios de artêmia, o que onera a produção. Assim, nos últimos anos, foram conduzidos estudos visando estudar a substituição do alimento vivo por dietas inertes e sua influência na formação do sistema digestório (JOMORI 2005, MENOSSI et al. 2012, PORTELLA et al. 2012, PORTELLA et al 2014) e muscular (LEITÃO et al 2011, TAKATA 2011, KOJIMA 2012).

A diminuição do período de fornecimento do alimento vivo e sua substituição precoce por dietas inertes é uma etapa delicada em que, em muitas vezes, há estagnação no crescimento ou redução do peso dos animais (JOMORI et al. 2008, LEITÃO et al. 2011, MENOSSI et al 2012).

Dentre os fatores que prejudicam o crescimento muscular em peixes destaca-se a qualidade do alimento fornecido, tanto nas fases iniciais de desenvolvimento quanto durante seu período posterior. Quando os peixes estão bem alimentados há um balanço entre a síntese e degradação proteica. Observa-se que em peixes mantidos em

jejum há o desencadeamento de cascatas de reações catabólicas, que levam à degradação do tecido muscular. Assim, a compreensão dos fatores envolvidos nos processos que regulam a síntese e degradação das proteínas miofibrilares pode auxiliar na adoção de práticas de manejo que visem diminuir o catabolismo e aumentar a síntese proteica, o que ocasionaria um desbalanço positivo no *turnover* proteico.

Em estágio mais tardios de desenvolvimento, os peixes estão adaptados a passarem por períodos em jejum (COOK et al. 2000). Estes períodos podem ocorrer durante o inverno, quando há diminuição do suprimento alimentar natural e também devido à diminuição da temperatura e, ainda, durante as migrações reprodutivas (MEHNER e WIESER 1994, MACKENZIE et al. 1998). Com a escassez de alimentos os processos essenciais do metabolismo dos animais são mantidos, utilizando-se as reservas lipídicas. Porém, com o prolongamento do período de jejum, há o esgotamento dessas reservas, iniciando-se o processo de degradação de proteínas do tecido muscular (METON et al. 2003). Esse fato implica na redução do crescimento dos peixes e em maior mortalidade. Para reduzir o gasto energético, os peixes podem adotar estratégias comportamentais como reduzir sua atividade e, também, adotar medidas fisiológicas, celulares e moleculares para limitar o consumo de energia durante períodos de jejum (LAND e BERNIER, 1995).

Em sistemas de cultivo, durante o processo de transição alimentar, observa-se que no início as larvas relutam em receber a dieta inerte, o que ocasiona ligeira perda de peso ou estagnação do crescimento. Além disso, adversidades ambientais podem atrasar a transferência das larvas da incubadora ou do laboratório para viveiros externos fertilizados, fazendo-se necessário manter as larvas por curtos períodos em jejum. Porém, ainda são escassos os estudos sobre a influência da restrição alimentar em peixes nativos em sistema de cultivo. O jejum pode acarretar prejuízo no crescimento do animal, ocasionando a redução da musculatura estriada esquelética, parte que compreende cerca de 60% da massa corporal dos peixes teleósteos (STÄGER e STOIBER 2001). Assim, estudos desenvolvidos no laboratório de nutrição de peixes do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), em conjunto com o departamento de Morfologia do Campus de Botucatu (UNESP), têm visado pesquisas básicas para a compreensão dos mecanismos de regulação de expressão gênica dos fatores de

crescimento muscular dos peixes em função de sua nutrição ou manejos alimentares (ALMEIDA et al. 2008, LEITÃO et al. 2011, NEBO et al. 2013).

Baseando-se nas informações oriundas dos estudos sobre crescimento muscular e a observação da perda de peso e diminuição do crescimento dos peixes em laboratório em situações experimentais, esse estudo visou à compreensão dos mecanismos envolvidos na expressão dos genes relacionados ao catabolismo proteico em juvenis de pacu submetidas à períodos crescentes de jejum e posteriormente realimentadas. O pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) foi a espécie escolhida por já ter sido muito bem estudada nos aspectos produtivos, biológicos e econômicos. Além disso, o cultivo desse peixe destaca-se pelo seu potencial, tanto em termos de rusticidade ao manejo e boa taxa de crescimento, como na aceitação pelo mercado consumidor (JOMORI et al. 2003).

Kojima (2012) conduziu um estudo analisando a resistência de larvas de pacu à restrição alimentar, ponto-de-não-retorno e sua influência na distribuição da frequência das fibras musculares. Porém, não foram conduzidos estudos relacionados à expressão gênica dos fatores relacionados à atrofia muscular. Assim, esse estudo propôs observar o comportamento das fibras musculares durante o jejum prolongado e a expressão dos genes relacionados à atrofia muscular (MURF-1a e MAFbx) bem como a recuperação dessas fibras após a realimentação. Avaliou-se também a influência ocasionada pelo jejum no crescimento hiperplásico e hipertrófico visando gerar informações que poderão ser utilizadas para o manejo alimentar em sistemas de cultivo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 *Crescimento muscular***

A musculatura esquelética nos peixes, parte que compreende cerca de 60% da massa corporal dos teleósteos (STÄGER e STOIBER 2001), está organizada em miômeros que são separados entre si por bainhas de tecido conjuntivo que os envolvem, os miosseptos (ALEXANDER 1969). Nesse grupo de animais, os miômeros são unidades morfofuncionais que se repetem ao longo do corpo do animal

(ALEXANDER 1969) e são responsáveis pelos movimentos ondulatórios durante a natação.

Em peixes a formação das fibras musculares ocorre durante a fase de embriogênese (JOHNSTON 1980; CURRIE e INGHAM 2001). As fibras da musculatura estriada dos peixes estão distribuídas em três compartimentos distintos: vermelho, intermediário e branco. A maior parte da massa muscular é formada pelo compartimento branco (musculatura branca), que possui fibras musculares de contração rápida e metabolismo glicolítico. Já o compartimento vermelho (musculatura vermelha) está localizado na região superficial, abaixo da derme, sendo formado por fibras de contração lenta e metabolismo oxidativo e utilizado na realização de movimentos lentos e de sustentação, como a natação durante a migração. Entre essas duas regiões, encontra-se o compartimento intermediário (musculatura intermediária) com fibras de contração rápida e de metabolismo oxidativo/glicolítico (JOHNSTON 1981; WEATHERLEY e GILL 1987) (Figura 1).

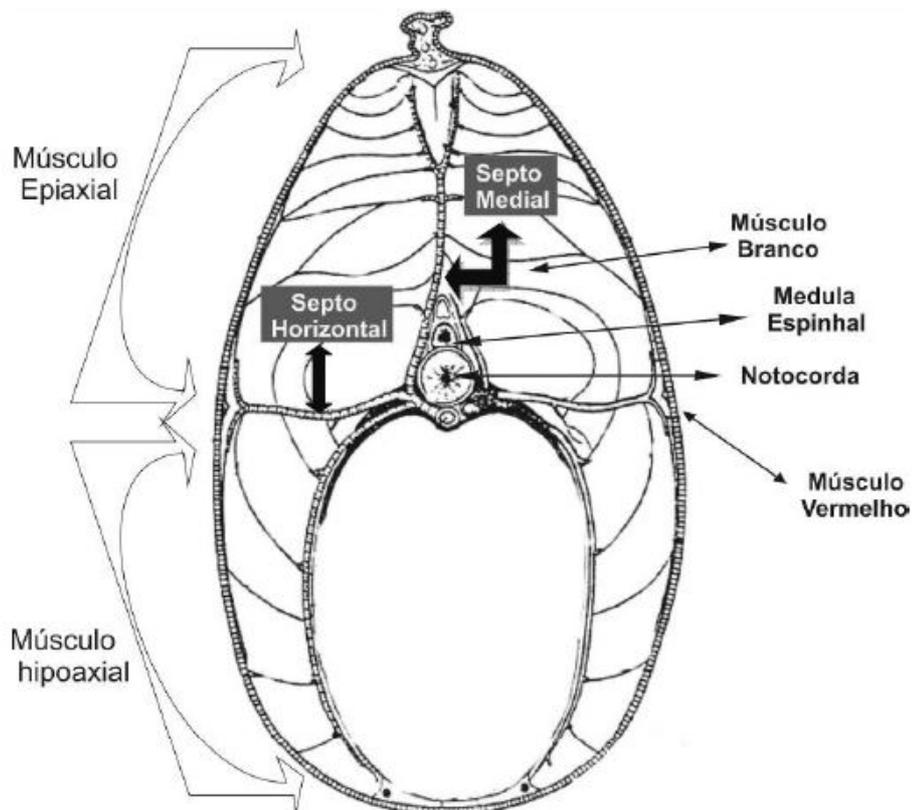


Figura 1. Desenho esquemático de um corte transversal da musculatura de peixe demonstrando a organização anatômica da musculatura estriada. Observa-se músculo vermelho (superficial), o músculo branco (profundo), o septo horizontal separando a musculatura em hipoaxial e epiaxial e o septo medial separando a musculatura em antímeros (direito e esquerdo). Fonte: Mareco 2012, baseado em Videler, 2011.

O desenvolvimento muscular inclui uma sucessão de eventos e começa na fase inicial de desenvolvimento embrionário do animal. Primeiramente, a mesoderme dá lugar aos mioblastos, que são células mononucleadas precursoras das células musculares. A fusão dos mioblastos origina os miotubos que possuem um ou mais núcleos centrais e miofibrilas em posição periférica (JOHNSTON et al. 1995). Nos miotubos ocorre a organização das proteínas que irão formar as unidades contráteis, os sarcômeros (HUXLEY 1969). Ao observar cortes histológicos de tecido muscular, notamos a diferença entre as células musculares maduras, que se caracterizam por apresentarem núcleos periféricos, ao contrário das fibras jovens. Além disso, o tamanho do diâmetro dessas fibras também apresenta diferença entre os animais jovens e adultos.

No desenvolvimento embrionário de peixes e outros vertebrados, existem as células satélites ou mioblastos adultos, que possuem a capacidade de se proliferar e também apresentam o potencial de se diferenciar e se fundir com as fibras musculares existentes (VASYUTINA et al. 2007). Estas células são a principal fonte celular para a regeneração e para o processo de crescimento muscular pós-natal (JOHNSTON et al. 2000, BUCKINGHAM 2007).

Os mioblastos são capazes de se diferenciar em novas fibras (hiperplasia) ou de se fundirem às fibras já existentes (hipertrofia) e estão envolvidas no crescimento muscular normal e na regeneração do tecido muscular após uma lesão, doença ou privação alimentar (ROWLERSON e VEGGETTI 2001, DAL-PAI-SILVA et al. 2007, TEIXEIRA et al. 2012). Assim, o crescimento muscular é dependente da ativação, proliferação e diferenciação dos mioblastos (Koumans & Akster, 1995) que ocorre sob o controle de fatores transcricionais, dentre eles, os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Miogenina, Myf5 e MRF4 que são fatores que contêm um domínio altamente conservado evolutivamente. Os primeiros MRFs são expressos pelos mioblastos expressos são a MyoD (“myoblast determination fator”) e Myf-5, que são fatores primários, expressos principalmente nas fases de proliferação dos mioblastos (HINITS e HUGHES 2007, WATABE 1999) e a miogenina e o MRF4, expressos posteriormente e regulam a diferenciação da fibra muscular (MEGENEY e RUDNICK 1995). Johansen e Overturf (2005) demonstraram, em truta, arco-íris, a expressão diferencial da MyoD desde o início do desenvolvimento até a fase adulta,

relacionando a expressão desse gene com a proliferação de células satélites e hiperplasia. Almeida et al. (2008) observaram maior expressão da MyoD na musculatura branca de pacus jovens quando comparado aos adultos, relacionando essa diferença decorrente da hiperplasia mais pronunciada em fases iniciais.

A expressão da miogenina e do MRF4 está relacionada com os processos de diferenciação dos mioblastos em fibras musculares maduras (MEGENEY e RUDNICKI, 1995; RUDNICKI e JAENISCH, 1995; WATABE, 1999, 2001). Johansen e Overturf (2005) relacionaram a expressão da miogenina, com a diferenciação dessas células e hipertrofia, sendo assim, mais expressa em estágios posteriores do desenvolvimento dos peixes.

A miostatina, também conhecida como GDF-8 (*"Growth and Differentiation Factor-8"*), em vertebrados está envolvida com a regulação do crescimento muscular estriado esquelético (FUNKESTEIN e REBHAN 2007; PATRUNO et al. 2006) e é predominantemente expressa nesse tecido (MCPHERRON et al. 1997).

Nos mamíferos, em que a hiperplasia não perdura durante toda a vida – diferentemente dos peixes – a miostatina tem a principal função de regular negativamente o desenvolvimento e o crescimento muscular (MCPHERRON et al. 1997). E esse controle se dá através da *down-regulation* da expressão da MyoD, miogenina e Myf-5 (RÍOS et al. 2002, JOULIA et al. 2003).

Em peixes, como em mamíferos, a miostatina também está relacionada ao controle do crescimento muscular. Nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário e larval, onde há predomínio do crescimento hiperplásico, os níveis de miostatina expressos no tecido muscular são bem baixos e vão aumentando gradativamente nas fases subsequentes, o que demonstra um possível controle negativo da miostatina sobre o crescimento muscular em peixes, uma vez que a expressão desse gene é mais intensa na fase adulta (JOHANSEN e OVERTURF 2005, PATRUNO et al. 2008).

A diferenciação entre a musculatura vermelha e branca ocorre no início do desenvolvimento embrionário devido a estímulos de glicoproteínas secretadas pela notocorda. Sob esses estímulos, células adaxiais migram para região superficial do miótomo para formar as fibras da musculatura vermelha (JOHNSTON e HALL 2004). Concomitantemente, outra população de células adaxiais ou células pioneiras que se alongam conectadas a notocorda originando o septo transversal, dividindo o miótomo

em duas regiões: epaxial e hipoaxial. A musculatura branca do embrião é formada a partir da fusão das demais células pré somáticas laterais dos miótomos (DEVOTO et al. 1996).

Assim, nos vertebrados, o crescimento muscular ocorre por dois mecanismos: hiperplasia e hipertrofia. No primeiro, há a formação de novas fibras musculares, tendo as células satélite como precursoras. No crescimento hipertrófico, o crescimento ocorre com o aumento em diâmetro das fibras musculares. Em peixes, o ocorrem os dois tipos de crescimento muscular (hiperplasia e hipertrofia), durante toda a vida. No entanto, a hiperplasia é mais evidente durante em fases iniciais de desenvolvimento e o crescimento hipertrófico mais intenso durante a fase adulta do animal (Almeida et al. 2010). Porém, esses processos de crescimento estão relacionados ao tamanho final que o peixe atinge em sua fase adulta. Em peixes que atingem maior tamanho final a hiperplasia é prolongada, o que gera maior número de fibras, que posteriormente, contribuirão para o crescimento hipertrófico.

A hiperplasia pode ser dividida em hiperplasia estratificada e em mosaico (ROWLERSON e VEGGETTI 2001; DAL PAI-SILVA et al. 2007). A primeira ocorre devido ao aumento em espessura das camadas musculares oriundas da proliferação de células nas regiões ventral e dorsal dos miômeros (ROWLERSON e VEGGETTI, 2001) e sua ocorrência é predominante nas fases iniciais do desenvolvimento de peixes teleósteos (JOHNSTON 2006). Já a hiperplasia em mosaico ocorre principalmente na fase juvenil dos peixes e caracteriza-se pela ocorrência de fibras pequenas entre fibras de maior diâmetro, proporcionando a aparência de um mosaico formado por fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação (JOHNSTON 1999). Na hipertrofia, ocorre a fusão entre células satélites e fibras musculares já existentes proporcionando o aumento do número de núcleos para a síntese de miofibrilas, ocasionando o aumento em diâmetro das fibras (JOHNSTON 1999; ROWERSON e VEGGETTI 2001).

Diferentemente do que ocorre em mamíferos, onde a hiperplasia cessa em um curto período de tempo após o desenvolvimento embrionário (GOLDSPINK 1972), em peixes, a hiperplasia e a hipertrofia contribuem por todo período de crescimento da musculatura (ALAMI-DURANTE et al. 1997). Assim, a má qualidade da dieta fornecida aos animais durante as fases iniciais e a restrição alimentar pode influenciar diretamente no crescimento do animal (JOHNSTON 1981). Estudo recente com larvas

de pacu bem e mal alimentadas demonstrou que há um atraso no desenvolvimento e celularidade muscular em larvas que receberam somente dietas inertes (LEITÃO et al. 2011). Segundo os autores, morfológicamente, essas larvas apresentaram fibras arredondadas, com a maioria dos núcleos centrais. Fibras musculares com estas características são indicativas de fibras muito jovens, como se observa em larvas recém eclodidas (ASSIS et al. 2004). Kojima (2012) manteve larvas de pacu em jejum após a eclosão durante 2, 4 e 6 dias e, em seu estudo, a autora não observou influência no crescimento hiperplásico após a realimentação com náuplios de artêmia durante 10 dias em laboratório e posterior cultivo em tanques externos.

Existem algumas diferenças na dinâmica de crescimento muscular entre várias espécies de peixes, sendo que o crescimento muscular não só é determinado pela genética da espécie, mas também pelas condições ambientais como temperatura da água, hipóxia, fotoperíodo e também privação alimentar e doenças (WEATHERLEY e GILL 1987; ASSIS et al. 2004, FAUCONNEAU e PABOEUF 2001). Esses fatores podem influenciar diretamente na regulação, diferenciação, degradação e síntese proteica no tecido muscular (JOHNSTON 2006). Ao contrário dos mamíferos, a musculatura dos peixes funciona como um órgão armazenador de proteína, e não como um órgão sintetizador de proteína, assim, os peixes têm capacidade para usar proteína muscular como uma fonte de energia durante a ausência de alimento e maturação das gônadas (WEATHERLEY e GILL 1987).

## **2.2 Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1)**

Os IGF's (*Insulin-like growth factor*) são um grupo de fatores que estão diretamente ligados à regulação do crescimento. Em mamíferos, parece que o IGF-I é o maior agente promotor de crescimento devido à sua habilidade de aumentar o acréscimo de proteínas através da estimulação da síntese proteica, além de reduzir a degradação de proteínas (DAVIS et al. 2002; SACHECK et al. 2004).

O IGF-1 (*"Insulin-like growth factor"*), IGF-2 e a Insulina são peptídeos que pertencem à mesma família de proteínas e possuem similaridades em relação à sua estrutura. Todos esses hormônios derivam de uma molécula ancestral comum, que ao longo da evolução passou por uma série de modificações e duplicações de genes e, atualmente, a sequência de aminoácidos dessas três moléculas de todos vertebrados é

conhecida e com alto grau de similaridade entre esses grupos (CHAN et al. 1993; REINECKE e COLLET, 1998). Segundo Peter e Marchant (1995) existe um alto grau de conservação na sequência de aminoácidos do IGF-I entre os vertebrados, indicando que há uma forte pressão evolutiva em manter a estrutura desse hormônio ao longo da evolução dos vertebrados. A insulina e os IGF's exercem suas atividades orgânicas ao se ligarem aos seus receptores específicos ancorados na membrana plasmática e, apesar das semelhanças estruturais com a insulina e receptores de IGF-I de mamíferos, os peixes apresentam características de ligação diferentes.

O IGF-I pode atuar de forma parácrina ou autócrina (KELLEY et al. 2002), promovendo crescimento muscular e diferenciação celular em diversos tecidos (CARNEVALI et al. 2006). Os IGFs já foram detectados em diversos tecidos dos peixes, como o muscular, hepático, pancreático e adiposo, e possuem ações no metabolismo e no crescimento celular (PETER e MARCHANT 1995).

Além disso, já foi demonstrado que a concentração de IGF-I no plasma é fortemente influenciada pelo estado nutricional (KETELSLEGERS et al. 1995). Em peixes, os níveis de IGF-I circulante desempenham um papel importante na regulação do crescimento e um dos fatores que mais influencia na concentração desse hormônio no plasma é o estado nutricional do indivíduo (DUAN e HIRANO 1992; DUAN et al. 1993; MORIYAMA et al. 1994).

### **2.3 Atrofia muscular**

Nos animais, em condições normais de nutrição, há um balanço entre a síntese e degradação do tecido muscular, e mobiliza as proteínas em um fluxo constante, denominado *turnover* proteico. Esse processo é responsável tanto pelo acréscimo do tecido muscular, no caso de animais bem nutridos, quanto pelo consumo desse tecido e gera a atrofia. A atrofia muscular é caracterizada pela redução do volume muscular devido ao aumento da degradação e diminuição da taxa de síntese proteica no músculo. Esse fato pode ser ocasionado por deficiências nutricionais, desnutrição ou condições patológicas (TEIXEIRA et al 2012).

Um dos principais estímulos atrofícos é o jejum, que leva à ativação de sistemas proteolíticos, sendo que a via da ubiquitina-proteassoma é a principal delas. Essa via

realiza o processo de proteólise intracelular de modo altamente seletivo e com gasto de energia (LECKER et al. 2006; GOLDBERG 2007). E, dentre as inúmeras funções que exerce, destaca-se a degradação de proteínas miofibrilares, proteínas mal formadas e/ou sem função biológica.

Há, principalmente, três sistemas de degradação proteica: (1) Proteases cálcio-ativadas (calpains ou caspases); (2) Degradação lisossomal e (3) Via proteassoma-ubiquitina (P-Ub), dependente de ATP (SEILIEZ et al. 2008). Muitas vezes, em situações em que a degradação proteica é aumentada, os três sistemas estão envolvidos. Porém, o papel desempenhado por cada sistema depende do tecido. No fígado, o sistema lisossomal é predominante e, no músculo esquelético, esse sistema é responsável por degradar apenas as proteínas sarcoplasmáticas, sendo as proteínas miofibrilares degradadas principalmente via proteassoma-ubiquitina. Em mamíferos, existem altas evidências de que a via predominantemente responsável pela atrofia muscular é a via dependente de ATP, ou seja, a ubiquitina-proteassoma (SEILIEZ et al. 2008). Porém, em peixes, pouco é conhecido sobre as estratégias proteolíticas de degradação muscular (WANG et al. 2010).

### **2.3.1 Vias de degradação**

- Proteases cálcio-ativadas (calpains ou caspases)

Esse sistema constitui uma via de degradação de proteínas de células eucarióticas composta de duas enzimas (calpaínas) e da calpastatina. Segundo Salvensen (2002) essas proteases estão envolvidas na morte celular programada (apoptose). No músculo desempenham uma parte menor da degradação que produz perda de massa muscular podendo estar mais envolvidas na etapa inicial da degradação. Apesar de não serem capazes de degradar as proteínas musculares, essas proteases clivam as proteínas que ancoram o complexo actina-miosina, liberando os componentes proteicos do sarcômero para serem degradados por outra via de proteólise (GOLL et al. 2008, TEIXEIRA et al. 2012).

- Degradação lisossomal

Os lisossomos, descobertos por De Duvene em 1956, são vesículas citoplasmáticas contendo cerca de 50 proteases, incluindo uma variedade de endopeptidases. A via de degradação lisossomal foi a primeira a ser identificada. Nessa via podem ocorrer dois processos proteolíticos, a macroautofagia e a microautofagia. No primeiro mecanismo ocorre a fusão de lisossomos com vacúolos denominados vacúolo autofágico ou fagossomo oriundos do complexo de Golgi e retículo endoplasmático liso. Devido ao citoplasma ser digerido em grandes quantidades esse processo é denominado "macroautofagia". Na microautofagia, as proteínas citoplasmáticas são fagocitadas diretamente por invaginações da membrana dos lisossomos e o conteúdo proteico sofre degradação no interior do lisossomo. Mortimore e Poso (1984) sugeriram que a microautofagia pode ser responsável pela degradação no estado basal e a macroautofagia é ativada principalmente no fígado, em períodos iniciais de jejum.

- Via ubiquitina – proteassoma (Ub-P)

A ubiquitina, identificada em 1971, é uma proteína que possui 76 resíduos de aminoácidos, presente em todas as células eucarióticas e é uma das proteínas mais conservadas em termos de sequência, diferindo muito pouco entre os eucariotos (VOGES et al. 1999).

O sistema de Ub-P é responsável pela degradação de uma ampla gama de proteínas em vários tecidos (HERSCHKO e CIECHANOVER, 1992) incluindo as proteínas miofibrilares. De particular interesse do ponto de vista fisiológico, encontra-se o aumento da degradação das proteínas do músculo esquelético em condições patológicas ou de privação alimentar.

As moléculas de ubiquitina se ligam aos substratos por meio de ligações isopeptídicas entre o resíduo de glicina C-terminal da ubiquitina e os grupos amino-épsilon de resíduos de lisina das proteínas. Cadeias de poli-ubiquitina se formam a partir da adição de moléculas de ubiquitina ao resíduo de lisina-48 de uma outra molécula de ubiquitina. (WATERLOW 2006). Essa via de degradação proteica envolve duas etapas. Primeiramente, várias moléculas de ubiquitina ligam-se covalentemente

ao substrato de uma proteína e então estas proteínas marcadas são degradadas pelo proteassomo. Esse processo requer ATP e envolve, três enzimas: as enzimas ativadoras de ubiquitina (E1), uma das enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2), e uma proteína ubiquitina-ligase (E3) responsável pelo o reconhecimento do substrato a ser degradado. Estudos recentes sugerem que o Muscle Atrophy F-box (MAF-box), também chamado de Atrogin-1 e o MuRF1 (Muscle RING Finger 1) são duas Ub-proteína ligase (E3) e são peças chave na regulação da atrofia muscular via ubiquitina-proteassoma em mamíferos (LECKER 1999). A expressão dessas enzimas de ligação à ubiquitina (E3) ocorre somente no músculo esquelético e estudos comprovaram que sua quantidade aumenta em múltiplas situações de atrofia (BODINE et al. 2001, NADER 2005).

Observou-se a importância desses atrogênes na perda da massa muscular através de estudos de ratos *knockout* (BODINE et al. 2001). Nesse estudo, a ausência de MAFbx ou MuRF1 reduziu a atrofia muscular induzida por desnervação. Segundo Attaix e Baracos (2010) esses genes tem dois papéis distintos na perda do tecido muscular: o MuRF1 parece estar diretamente envolvido na degradação das proteínas miofibrilares, enquanto que o MAFbx reduz as taxas de síntese proteica.

O tecido muscular é o mais representativo quando se considera a decomposição e síntese muscular (HIGUERA et al. 1999). Análises do tecido muscular e hepático em trutas em restrição alimentar demonstraram grupos de genes responsáveis pela síntese e outros pela degradação proteica em resposta ao jejum, o que evidencia respostas específicas na musculatura branca, incluindo a expressão de RNAm das vias catalíticas (CLEVELAND et al. 2009), e a importância do IGF-I, um dos potentes sinalizadores da cascata anabólica (SINGLETON et al. 2000). Outros autores acreditam que os hormônios anabólicos insulina e IGF-1 são os principais moduladores da atenuação do processo proteolítico (GREENHAFF et al. 2008). Assim, estudos modernos estão voltados à verificação da ação desse hormônio no tecido muscular durante a privação alimentar, já que parece que existe uma relação do IGF-I no *turnover* proteico. Conseqüentemente, o conhecimento dos genes responsáveis pelo catabolismo e os fatores que inibem sua expressão pode indicar estratégias de manejo alimentar que beneficiem o crescimento dos peixes cultivados.

## 2.4 Pacu

Dentre os peixes neotropicais, o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae) é uma espécie que se destaca por suas características favoráveis para o cultivo. Em termos de produção nacional, este peixe ocupa o terceiro lugar entre as espécies nativas, chegando a dezoito mil toneladas em 2009 (MPA, 2010). Devido à importância dessa espécie, muitos estudos vêm sendo conduzidos a fim de maximizar seu cultivo e minimizar os custos de produção (JOMORI et al., 2003).

O hábito alimentar onívoro do pacu adulto favorece sua aptidão para a aquicultura (JOMORI 1999; TESSER e PORTELLA 2006; PORTELLA et al 2012; PORTELLA et al. 2014). Entretanto, espécies neotropicais de desova total possuem larvas com características altriciais e esses animais, após a eclosão apresentam tamanho reduzido, natação vertical errática e ausência dos primórdios das nadadeiras peitorais (MACHADO-ALISSON, 1990), como é o caso do pacu (PORTELLA et al. 2012, 2014).

Ao iniciarem a alimentação exógena, as larvas altriciais ainda não apresentam o sistema digestório completamente formado, com o intestino anterior morfológicamente indiferenciado e sem glândulas gástricas, sendo então incapazes de aproveitar os nutrientes das dietas formuladas (PORTELLA e DABROWSKI 2008; MENOSSI et al 2012; PORTELLA et al. 2014). Devido a essas características, faz-se necessário o fornecimento de alimento vivo no início da alimentação exógena. Entretanto, essa prática encarece o cultivo, uma vez que o principal insumo utilizado são os náuplios de artêmia, cujos cistos possuem alto valor no mercado. A substituição do alimento vivo pelo formulado para larvas de pacu é um processo delicado, e muitas pesquisas já foram desenvolvidas visando a compreensão e otimização desse processo (TESSER 2002; TESSER e PORTELLA 2006; JOMORI et al. 2003; JOMORI 2005; JOMORI et al., 2008; LEITÃO et al. 2011, MENOSSI et al. 2012, PORTELLA et al 2014) Porém, a diminuição do fornecimento de alimento vivo nos primeiros estágios de alimentação quando realizada muito precocemente, pode resultar em redução da taxa de crescimento dos peixes, comprometendo assim o ganho em massa muscular (JOMORI 2005; LEITÃO et al. 2011; KJØRSVIK et al. 2011; MENOSSI et al 2012) .

Recentemente, Leitão et al. (2011) mostraram os efeitos diferenciais que a nutrição pode causar ao crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares em larvas de pacu. Em larvas bem alimentadas (que receberam alimento vivo, náuplios de artêmia) ocorreu predomínio da hiperplasia, contribuindo para maior recrutamento de novas fibras musculares, enquanto que em peixes que tiveram a taxa de crescimento reduzida devido à substituição precoce do alimento vivo por dietas formuladas, verificou-se antecipação do processo hipertrófico das fibras musculares. Kojima (2012) também observou sinais atróficos em larvas de pacu mantidas em jejum e sua influência na homogeneidade do crescimento posterior. Tendo em vista os numerosos estudos sobre os efeitos dos fatores de crescimento muscular após o jejum, foi proposto este estudo visando fornecer informações básicas para compreender a relação entre a expressão dos genes de atrofia e de crescimento muscular durante o jejum prolongado em juvenis de pacu.

### **3. HIPÓTESE**

Considerando que o jejum é um dos principais estímulos atróficos e sabendo-se que os genes MuRF1-a e MAFbx estão envolvidos com controle da degradação do tecido muscular em situação de atrofia, a hipótese desse trabalho foi verificar se a expressão desses atrogenes e dos genes de crescimento (MyoD1-a, Miogenina , Miostatina-b, IGF-I) são alterados durante períodos crescentes de jejum na fase inicial de desenvolvimento do pacu. A segunda hipótese foi verificar se os efeitos do jejum causam alterações no fígado e se comprometem o crescimento somático, a celularidade das fibras musculares, e o crescimento hiperplásico da musculatura. Para tanto, realizaram-se acompanhamento do crescimento dos peixes e avaliações histológicas e moleculares do tecido muscular e do fígado durante o jejum e sua posterior recuperação após o período de realimentação.

### **4. OBJETIVOS**

#### *Objetivo geral*

Este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos do jejum e posterior realimentação sobre o desenvolvimento inicial de larvas e juvenis de pacu, as

alterações hepáticas e a expressão dos genes envolvidos no crescimento (MyoD, miogenina, miostatina-b e IGF-I) e no catabolismo muscular (MAFbx e MuRF-1a).

#### *Objetivos específicos*

- Acompanhar as variáveis de crescimento (peso, comprimento, ganho em peso, taxa de crescimento específico), e sobrevivência de juvenis de pacu submetidos a diferentes períodos de jejum e realimentação;
- Avaliar o crescimento muscular hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares durante os diferentes períodos de jejum e após a realimentação;
- Avaliar as alterações no fígado dos juvenis submetidos ao jejum e posterior realimentação;
- Avaliar a expressão dos genes de crescimento (MyoD1-a, miogenina, miostatina e IGF-I) e catabolismo muscular (MuRF1-a e MAFbx) após o jejum.

#### **5. MATERIAL E MÉTODOS**

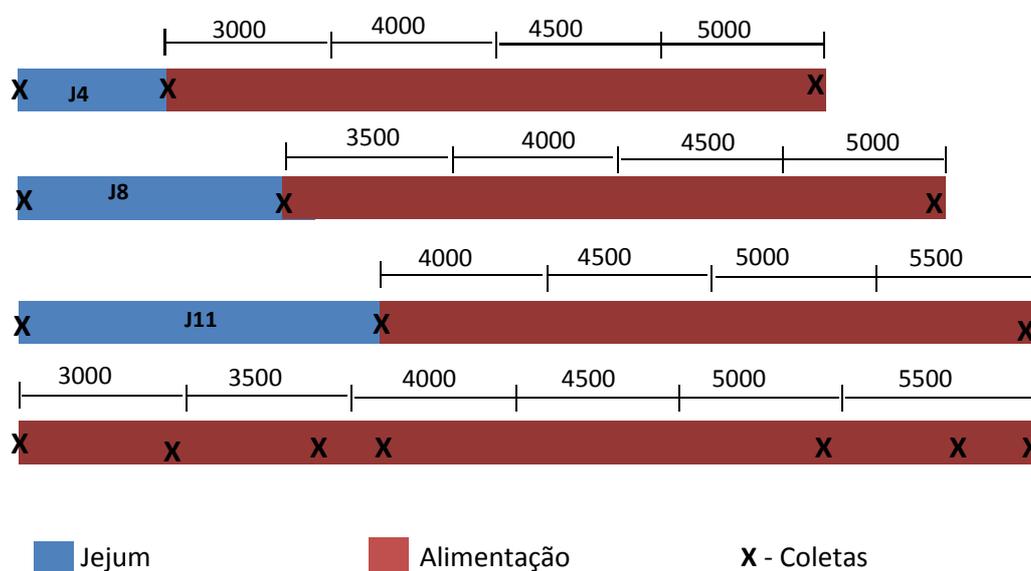
O experimento realizou-se no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp – Jaboticabal/SP. Em uma fase pré-experimental larvas de pacu com aproximadamente quatro dias e iniciando a alimentação exógena, foram mantidas em tanques de polietileno com capacidade de 100L e alimentadas com náuplios de artêmia até atingirem o tamanho desejado para o início do experimento ( $90,3 \pm 4,1$  mg). Após esse período, os peixes, então já apresentando características de juvenis (*sensu* Kendall et al. 1984) foram redistribuídos em tanques com volume de 50L com aeração e fluxo de água constantes, na densidade de 10 juvenis/L. Durante o período experimental a média de oxigênio dissolvido manteve-se em  $6,3 \pm 0,2$  mg/L e as de temperatura da água no período da manhã e tarde foram de  $28,2 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$  e  $29 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos com quatro réplicas cada. Três períodos de jejum foram testados além de um foram utilizados como controle positivo (animais alimentados por todo

período experimental) e como controle negativo, (larvas mantidas em jejum, JJ por todo período experimental). (Figura 1).

O alimento vivo oferecido aos animais na realimentação e aos do controle positivo foi fracionado em cinco vezes ao dia (às 8, 11, 14, 17 e 20 horas). Após a alimentação das 8 horas, era realizado o sifonamento das caixas para retirada dos restos alimentares do dia anterior e quantificação dos peixes mortos.

O início da restrição alimentar ocorreu simultaneamente em todos os tratamentos que envolveram o jejum (Figura 2). Entretanto, para avaliar a recuperação das fibras musculares, as coletas foram realizadas de forma que o período de realimentação (20 dias) fosse o mesmo para os tratamentos J4, J8 e J11. Dessa forma o encerramento de cada tratamento ocorreu em dias diferentes.



**Figura 2.** Esquema experimental indicando os períodos de jejum avaliados, as coletas e a quantidade de náuplios de artêmia fornecidos durante o experimento.

### Análises do crescimento, sobrevivência, mortalidade e canibalismo aparente

Para avaliação do crescimento, ao final do jejum e da realimentação, ao final do período de jejum e após a realimentação foram coletados 5% dos juvenis de cada unidade experimental, eutanasiados por exposição prolongada em anestésico (benzocaína 0,05%), fixados em formol tamponado 10% por 24 horas e preservados em álcool 70%. Posteriormente, os peixes foram medidos (comprimento total) e pesados individualmente.

Ao final do experimento todos os peixes foram individualmente contados e então calculadas as taxas de sobrevivência, de mortalidade e de canibalismo aparente. Considerou-se canibalismo aparente os juvenis desaparecidos ou canibalizados por meio da relação entre o número de juvenis inicialmente estocados, juvenis sobreviventes e os que foram contabilizados como mortos durante a limpeza dos tanques.

A sobrevivência foi calculada por meio da seguinte expressão:

$$\text{Sobrevivência} = \frac{N_f}{N_i - N_c} \times 100, \text{ onde:}$$

$N_f$  = número de animais o final do experimento;

$N_i$  = número de animais ao início do experimento;

$N_c$  = número de animais coletados ao longo do experimento para as biometrias e encontrados mortos durante a limpeza dos tanques.

O Canibalismo aparente foi calculado por meio da seguinte expressão:

$$\text{Taxa de canibalismo aparente (\%)} = 100 - [\text{sobrevivência (\%)} + \text{Mortalidade (\%)}]$$

A partir dos dados biométricos foi calculada a taxa de crescimento específico, o ganho em peso e o fator de condição de Fulton.

A taxa de crescimento específico (TCE) foi calculada por meio da seguinte expressão:

$$\text{TCE} = \frac{\ln Pf - \ln Pi}{\Delta t} \times 100, \text{ onde}$$

$\ln Pf$  = logaritmo do peso final;

$\ln Pi$  = logaritmo do peso inicial;

$\Delta t$  = Duração em dias entre os intervalos de biometria.

O ganho em peso (GP) em miligramas foi calculado por meio da expressão:

$$\text{GP} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

O fator de condição (K) de Fulton foi determinado por meio da fórmula:  $K$

$$K = \frac{\text{peso}}{\text{comprimento}^b}$$

O valor de **b** foi obtido por meio da logaritimização dos dados de peso e de comprimento total de todos os animais amostrados em todas as biometrias. Esses dados foram plotados em gráfico e o valor de **b**, foi obtido por meio da equação linear:

$$y = a + bx$$

### **Análises histológicas, morfologia e morfometria**

Simultaneamente à coleta para a biometria, após os animais serem eutanasiados, foram coletadas amostras (n=8) para as análises. Os animais selecionados para essas análises encontravam-se dentro da média de peso e comprimento apresentada pelo tratamento.

- **Tecido muscular**

As amostras do músculo branco foram obtidas da região epiaxial foram fixadas em solução de Karnovsky modificada (paraformoldeído 20%, glutaraldeído 20%, tampão fosfato de Sorensen 0,2M pH 7,2) durante 24 horas, mantidas em solução tampão fosfato por três dias e então preservadas em solução alcoólica 70%. As amostras fixadas foram incluídas em Histoiresina® (Leica, Germany) seguindo as recomendações do fabricante e então foram obtidos cortes histológicos transversais (Leica, modelo RM 2245), com três micrômetros de espessura, corados com hematoxilina-floxina B a 0,5 %.

Posteriormente, as lâminas foram observadas em microscópio óptico para mensuração do diâmetro de 200 fibras musculares do compartimento profundo da musculatura epaxial dos animais para avaliar a celularidade dos juvenis. Para mensuração das fibras, utilizou-se um sistema de análise de imagens (CellSens – Olympus) e foi considerado o menor diâmetro de cada fibra. As fibras musculares foram distribuídas nas seguintes classes, de acordo com seu diâmetro (d,  $\mu\text{m}$ ), classe 10 =  $d \leq 10$ ; classe 20 =  $10 < d \leq 20$ ; classe 30 =  $20 < d \leq 30$ ; classe 40 =  $30 < d \leq 40$ ; e classe 50 =  $d > 40$ , baseando-se na metodologia utilizada por Assis et al. (2004).

- **Fígado**

As amostras da região ventral dos juvenis de pacu foram fixadas em solução de paraformoldeído 4% durante 24 horas e mantidas em solução tampão (fosfato de

Sorensen 0,2M pH 7,2). As amostras foram incluídas em Histoiresina® segundo recomendações do fabricante com modificações. Depois de retiradas da solução de fixação, foram lavadas em água e pré-infiltradas por 4 horas com solução de glicol-metacrilato + ativador (Embedding kit®, Leica) e água destilada (1:1 v/v), em seguida seguiu-se com o método indicado. O uso da água em substituição ao álcool teve a intenção de preservar o conteúdo lipídico das estruturas.

Após a inclusão foram obtidos cortes histológicos longitudinais (Leica, modelo RM 2245), com três micrômetros de espessura, corados com hematoxilina-floxina B a 0,5 % e ácido periódico de Schiff (PAS) para observação do glicogênio hepático.

Posteriormente, as lâminas foram observadas e microfotografadas em microscópio óptico (câmera Olympus DP73®) para avaliação da histologia geral do fígado (CelSens Stardart, Olympus®).

### **Análises da Expressão Gênica**

Paralelamente às coletas para análise histológica e morfométrica das fibras musculares, foram amostrados fragmentos da musculatura dorsal (n=8 peixes/unidade experimental) para análise da expressão gênica. Estes foram cuidadosamente retirados, congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C. Para a avaliação quantitativa da expressão gênica na musculatura esquelética do pacu realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR) dos genes MURF-1, MAFbx, MyoD1-a, Miogenina, IGF-I e Miostatina-b, foram utilizadas as amostras coletadas após o fim do período de jejum e comparadas ao controle positivo alimentado.

### **Extração do RNA total**

Para a análise os tecidos que estavam congelados em nitrogênio líquido foram homogeneizados com o homogeneizador de tecidos (IKA Ultra Turrax/T-25) em 1ml de TRIzol para cada 100 mg tecido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, adição de 0,2 mL de clorofórmio e incubação por 3

minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12000xg por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa formada foi separada. O RNA foi precipitado com 0,5 mL de álcool isopropílico por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4°C. O pelete de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7500xg por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante removido cuidadosamente. O pellet de RNA foi seco em temperatura ambiente e dissolvido em água ultrapura.

Uma alíquota de 2 µl da solução de RNA total extraído foi quantificado, com auxílio de um espectrofotômetro NanoVue (ND-1000 - Thermo Scientific). A integridade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, após eletroforese de 1 µg de RNA em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Após essa análise, observou-se que o tratamento J11 não apresentava integridade necessária para a realização da RT-qPCR. Sendo assim, esse tratamento foi excluído das análises moleculares.

#### **Tratamento do RNA com DNase**

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

#### **Transcrição Reversa (RT)**

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o Kit High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), onde 2 µg de RNA total obtido do músculo esquelético foram acrescidos de 10 µl de tampão de transcriptase reversa (10X RT buffer), 4 µL de dNTP (25X), 10 µL de Randon Primers (10X), 5 µL de enzima transcriptase reversa (50 unidades/µl), 5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT (40 unidades/µL) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o

volume final da reação ajustado para 100 µL com água ultrapura. As amostras foram incubadas durante duas horas no termociclador: 10 minutos à 95° C, 40 ciclos de 15 segundos para denaturação à 95° C e anelamento a 55° C e extensão à 72° C por uma hora. Em seguida, os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C.

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

Os primers utilizados nesse trabalho (genes MyoD, Miogenina, IGF-Ia, Miostatina-b, MURF1a e MAFbx e para o gene de referência hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (hprt1), foram desenhados utilizando os dados do projeto “Caracterização do transcriptoma do músculo estriado esquelético do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)” sob orientação da Profa. Dra. Maéli Dal Pai Silva da (Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu) pesquisadora colaboradora do presente estudo (Tabela 1).

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos genes MyoD, Miogenina, IGF-Ia, Miostatina-b, MuRF1a e MAFbx foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real com a utilização do Kit *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para cada amostra muscular, utilizou-se 2 µL cDNA (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 µL de *Power SYBR<sup>®</sup> Green Mix (2,5X)*, 1,5 µL de primers “sense” e 1,5 µL de primer “anti-sense” e 7,5 µL de água ultrapura, suficiente para um volume final de 25 µL de solução. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de *qPCR* foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento. Os valores obtidos de “corrida” foram normalizados pelos valores obtidos dos genes de referência hprt1 e ao término de cada PCR foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

**Tabela 1.** *Primers* usados para a RT-PCR quantitativa em tempo real para a amplificação dos genes MyoD1a, miogenina, miostatina-b, IGF-I, MAFbx, MuRF1a e do gene de referência hprt1.

Gene	Sequência do primer
MyoD1a	F: TGCTTGCCTTCTCTACGAT
	R: GCGAAAGTCCTCAACCTCAG
Miostatina-b	F:TGGGACCCTCTGAGATTTTG
	R:CGGGGATCGAGATAAATGC
Miogenina	F:CCGCCTACAACCTCACTCAT
	R:TAGCCTCTGTGCCTGTGATG
IGF-I	R:ATTTAGCAAGCCAACAGGT
	F:CGCACAATACATCTCAAGTCG
MAFbx	R:TCTTTGGTGCTCCCTTGTG
	F:TAAAACCGAGGACGGCTGG
MuRF1a	R:CCATTGATGCCTTGTTGC
	F:CCTTCTCGTCCTGCTCTTTG
hprt1pacu	F:TGGGCTAAAGGAAGGATGAG
	R:TACAAAGCGTGAGGTGGCTA

### Análises estatísticas

Aos resultados de crescimento e de sobrevivência das larvas foram aplicados análise de variância ou teste t, ao nível de 5% de probabilidade, para comparação entre as amostras (tratamento e respectivo controle) sendo os dados analisados pelo programa SAS System versão 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA). Os resultados percentuais foram transformados em *arcoseno* antes da aplicação da ANOVA e todas as variáveis foram avaliadas quanto à normalidade (Cramer Von Mises) e homocedasticidade das variâncias (Levene).

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

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Sobrevivência, Mortalidade e Canibalismo aparente

O jejum afetou negativamente a sobrevivência dos juvenis de pacu; a sobrevivência foi menor quanto maior o período do jejum (Figura 3). Após o período de realimentação, não houve diferença estatística para esse parâmetro entre os

animais mantidos em jejum durante quatro dias (J4) e o controle positivo (ART). Já para os outros tratamentos, a sobrevivência foi menor quanto maior o período de jejum.

Consequentemente, a mortalidade foi maior no tratamento em que os animais ficaram onze dias em jejum (Figura 4), sendo que nesse tratamento o pico de mortalidade ocorreu próximo ao 10º dia da fase de restrição alimentar. O controle negativo apresentou mortalidade total entre o 13º e 14º dia experimental.

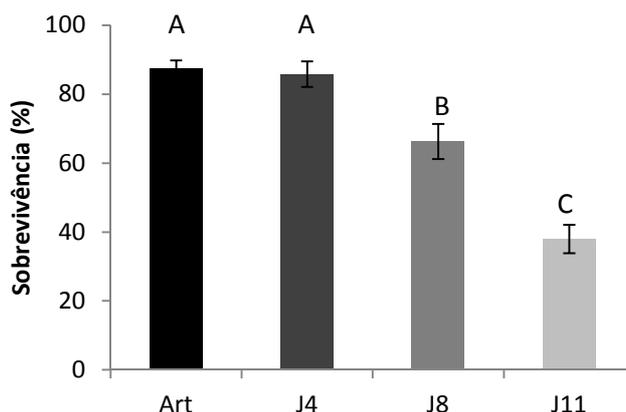


Figura 3. Sobrevivência ao final do experimento (médias  $\pm$  desvio padrão) de juvenis de pacu submetidos a diferentes períodos de jejum: J4: quatro dias; J8: oito dias; J11: onze dias, e o controle positivo (Art) em que foram alimentados por todo o período experimental.

\* Letras diferentes demonstram diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ) em cada parâmetro analisado.

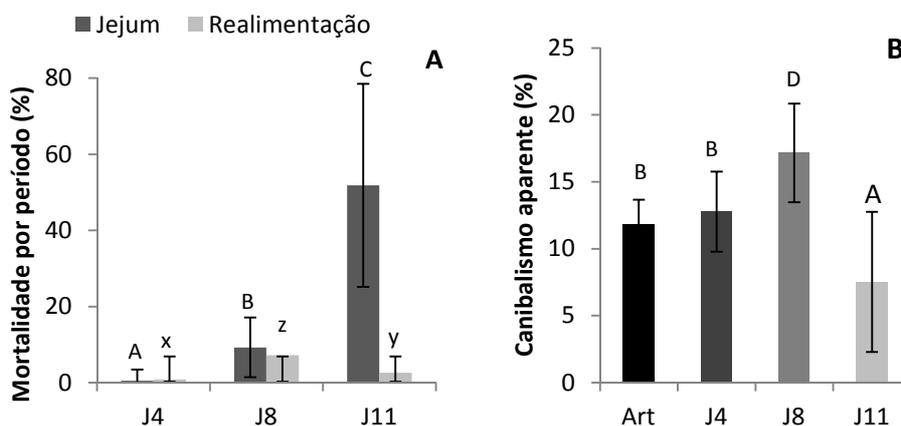


Figura 4. **A**: Mortalidade por período (jejum e realimentação) e **B** canibalismo aparente de juvenis de pacu submetidos a diferentes períodos de jejum: J4: quatro dias; J8: oito dias; J11: onze dias, Art representa o controle positivo em que os juvenis foram alimentados por todo o período experimental. Letras diferentes demonstram diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

## 8. 2. Crescimento

O crescimento em peso e em comprimento total também foi afetado pela privação alimentar. Observou-se diferença estatística ( $P<0,05$ ) entre os animais mantidos em jejum durante quatro, oito e onze dias e o respectivo controle positivo (Tabela 2). Essa diferença se manteve até o final do experimento nos peixes dos tratamentos J4 e J8. Porém, no presente estudo, após o período de realimentação, não houve diferença estatística entre o peso final dos peixes em jejum por onze dias e o controle (Tabela 2).

Antes do início do experimento, o peso médio dos juvenis era  $90,03 \pm 4,07$  e acentuada perda de peso foi observada conforme o jejum foi se prolongando (Tabela 2). A taxa de crescimento específico, durante o período de jejum, foi maior no controle positivo. A TCE manteve-se negativa nos tratamentos J4, J8 e J11. No período de realimentação (20 dias), houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) para a TCE entre os peixes mantidos por oito (J8) dias em jejum e o controle positivo (ART), diferentemente do observado entre os tratamentos J4 e J11 seus respectivos controle positivo, onde essa taxa foi estatisticamente igual.

Tabela 2. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão do comprimento total (CT, mm), peso ( P, mg), taxa de crescimento específico (TCE), ganho em peso (GP, mg) e fator de condição de Fulton (FC) de juvenis de pacu submetidos aos diferentes períodos de jejum e seu respectivo controle, ao final do período restrição alimentar e ao final do experimento. Peso dos animais ao início do experimento:  $90,30\text{mg} \pm 4,07$  mg.

Fim do Jejum						
	ART	J4	ART	J8	ART	J11
CT	21,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>	19,5 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>	22,2 $\pm$ 0,42 <sup>A</sup>	19,5 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>	22,5 $\pm$ 0,4 <sup>A</sup>	19,5 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>
P	147 $\pm$ 12,1 <sup>A</sup>	83,7 $\pm$ 5,1 <sup>B</sup>	169,9 $\pm$ 18,3 <sup>A</sup>	80,1 $\pm$ 4,6 <sup>B</sup>	183,1 $\pm$ 20,4 <sup>A</sup>	76,8 $\pm$ 7,4 <sup>B</sup>
GP	57,4 $\pm$ 12,1 <sup>A</sup>	-5,3 $\pm$ 3,4 <sup>B</sup>	79,9 $\pm$ 18,87 <sup>A</sup>	-9,9 $\pm$ 4,6 <sup>B</sup>	93,0 $\pm$ 20,4 <sup>A</sup>	-13,2 $\pm$ 7,5 <sup>B</sup>
TCE	12,2 $\pm$ 2,0 <sup>A</sup>	1,5 $\pm$ 1,1 <sup>B</sup>	7,8 $\pm$ 1,9 <sup>A</sup>	-1,5 $\pm$ 1,1 <sup>B</sup>	6,4 $\pm$ 1,0 <sup>A</sup>	-1,5 $\pm$ 0,8 <sup>B</sup>
FC	15 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>	11,3 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>	15,4 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	10,8 $\pm$ 1,5 <sup>B</sup>	15,9 $\pm$ 0,8 <sup>A</sup>	10,2 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>
Fim do experimento						
CT	25,00 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	23,3 $\pm$ 0,5 <sup>B</sup>	26,7 $\pm$ 1,9 <sup>A</sup>	25,2 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>	29,5 $\pm$ 1,7	29,3 $\pm$ 3,4
P	326,6 $\pm$ 82,7 <sup>A</sup>	198,8 $\pm$ 10,5 <sup>B</sup>	377,3 $\pm$ 20,7 <sup>A</sup>	209,2 $\pm$ 28,4 <sup>B</sup>	419,4 $\pm$ 67,9	440,9 $\pm$ 203,2
GP	178,7 $\pm$ 75,1 <sup>A</sup>	114,1 $\pm$ 13,7 <sup>B</sup>	207,3 $\pm$ 37,2 <sup>A</sup>	129,1 $\pm$ 28,6 <sup>B</sup>	236,1 $\pm$ 77,9 <sup>B</sup>	289,1 $\pm$ 177,9 <sup>A</sup>
TCE	31,6 $\pm$ 6,03	31,6 $\pm$ 6,0	17,9 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>	10,5 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>	13,9 $\pm$ 1,5	14,5 $\pm$ 3,8
FC	16,8 $\pm$ 0,7	15,8 $\pm$ 1,7	24,2 $\pm$ 1,3 <sup>A</sup>	13,0 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>	16,3 $\pm$ 1,6	17,9 $\pm$ 2,4

\*As médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente (teste-t,  $p<0,05$ ) comparadas entre o tratamento e seu respectivo controle.

### **8.3 Morfometria das fibras musculares**

As análises morfométricas das fibras musculares de juvenis de pacu demonstraram que houve diferença estatística entre os juvenis mantidos em jejum por quatro dias e o controle positivo (alimentadas) apenas nas fibras da classe 40. Já em relação aos peixes mantidos em jejum por oito dias (J8), houve um aumento das fibras de menor diâmetro nos tratamentos J8 (classe 20) e J11 (classes 10 e 20) quando comparados com o tratamento controle positivo (Figura 5A).

Nos animais que permaneceram maior tempo em jejum (J11) houve maior incidência de diminuição do diâmetro das fibras musculares (Figura 5B), revelada pelo aumento das frequências de fibras das classes 10 e 20, comparadas com os tratamentos J4 e J8. Ainda, nos tratamentos em que as larvas ficaram em jejum por oito e onze dias, a frequência de fibras das classes de maior tamanho (classes 40 e 50 em J8, e classes 30, 40 e 50 em J11) foi menor.

Avaliando-se as 5 fibras de maior e menor diâmetro observou-se que ao final do período de jejum os tratamentos J8 e J11 apresentaram as menores médias de diâmetro das fibras, devido ao consumo do tecido muscular (Figura 6 A)

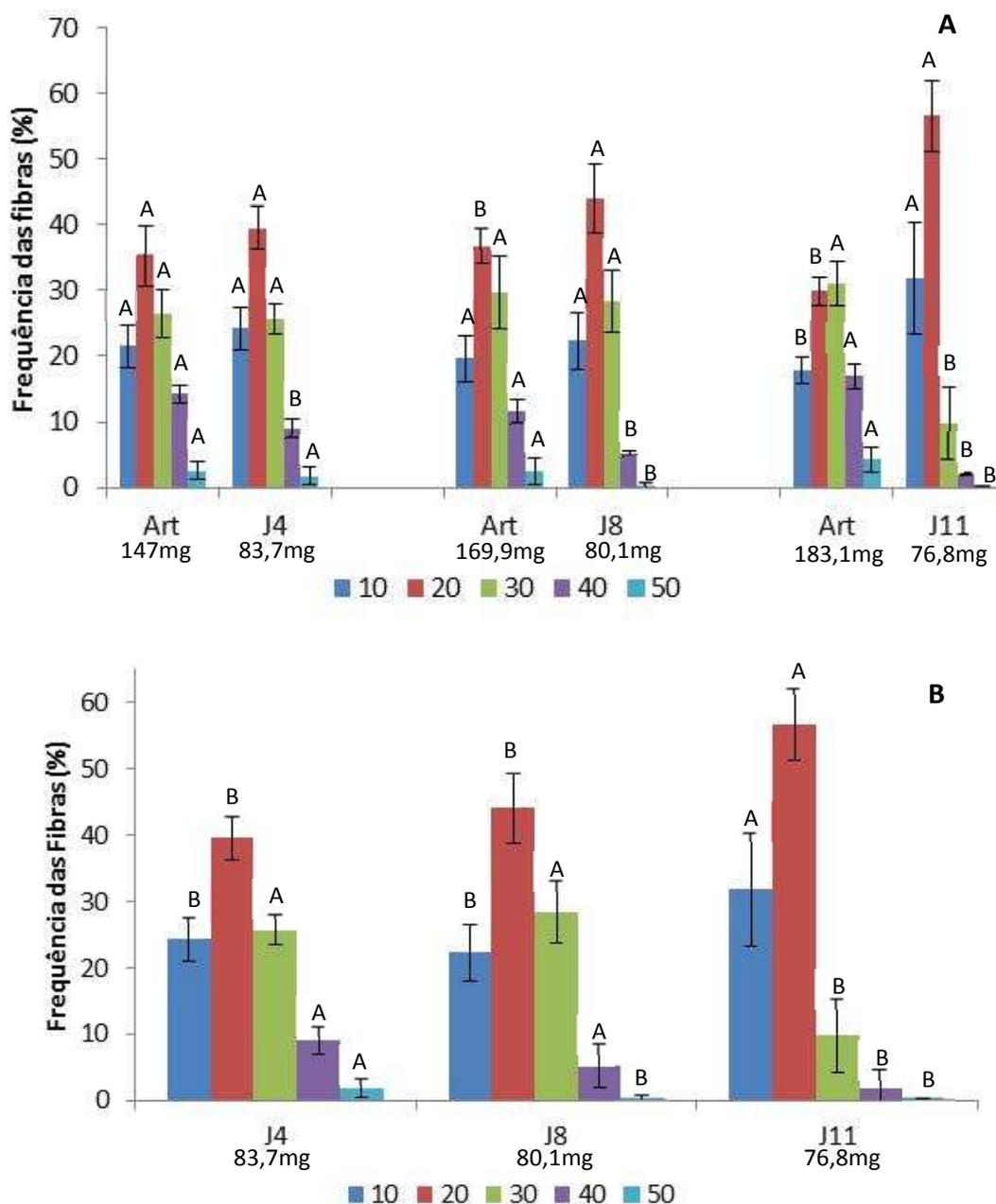


Figura 5. Distribuição das fibras musculares do compartimento profundo de acordo com o diâmetro ( $d$ ,  $\mu\text{m}$ ) e peso médio de juvenis de pacu ao final do período de restrição alimentar. (A) Juvenis com quatro (J4), oito (J8) e onze (J11) dias em jejum e seus respectivos controles (ART). (B) Comparação da frequência de fibras dos diferentes diâmetros entre os tratamentos em jejum ao final de cada período de restrição alimentar. Classes de diâmetro: classe 10 =  $d \leq 10$ , classe 20 =  $10 < d \leq 20$ ; classe 30 =  $20 < d \leq 30$ , classe 40 =  $30 < d \leq 40$ , classe 50 =  $D > 40$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Em 5A a comparação é pelo teste-t entre as classes de fibras do tratamento e seu respectivo controle. Em 5B a comparação é por ANOVA entre as classes nos diferentes tratamentos em jejum.

De maneira geral, os dados mostram que a celularidade dos juvenis após o período de realimentação foi bastante semelhante ao grupo controle (ART), o que

confirma a recuperação do crescimento. Nessa fase, nota-se que os peixes mantidos em jejum durante 4 dias não demonstraram diferença significativa quando comparados ao controle positivo para as fibras das classes 10 e 30. Já para as fibras da classe 20 houve maior frequência no tratamento J4 (Figura 6A). Já os tratamentos que permaneceram em jejum por 8 e 11 dias (J8 e J11), apresentaram menor frequência de fibras da classe 10 (Figura 6B).

Em relação ao diâmetro das cinco menores e maiores fibras, após o período de realimentação, não houve diferenças estatísticas em relação ao diâmetro das maiores fibras entre os tratamentos e seu respectivo controle positivo. Porém, em relação ao diâmetro das menores fibras, o tratamento J11 diferiu estatisticamente do controle alimentado (Figura 7C), demonstrando maior incidência de fibras de menor diâmetro, indicativo de hiperplasia, nos tratamentos onde não houve a privação alimentar, ou ela foi feita por menor período.

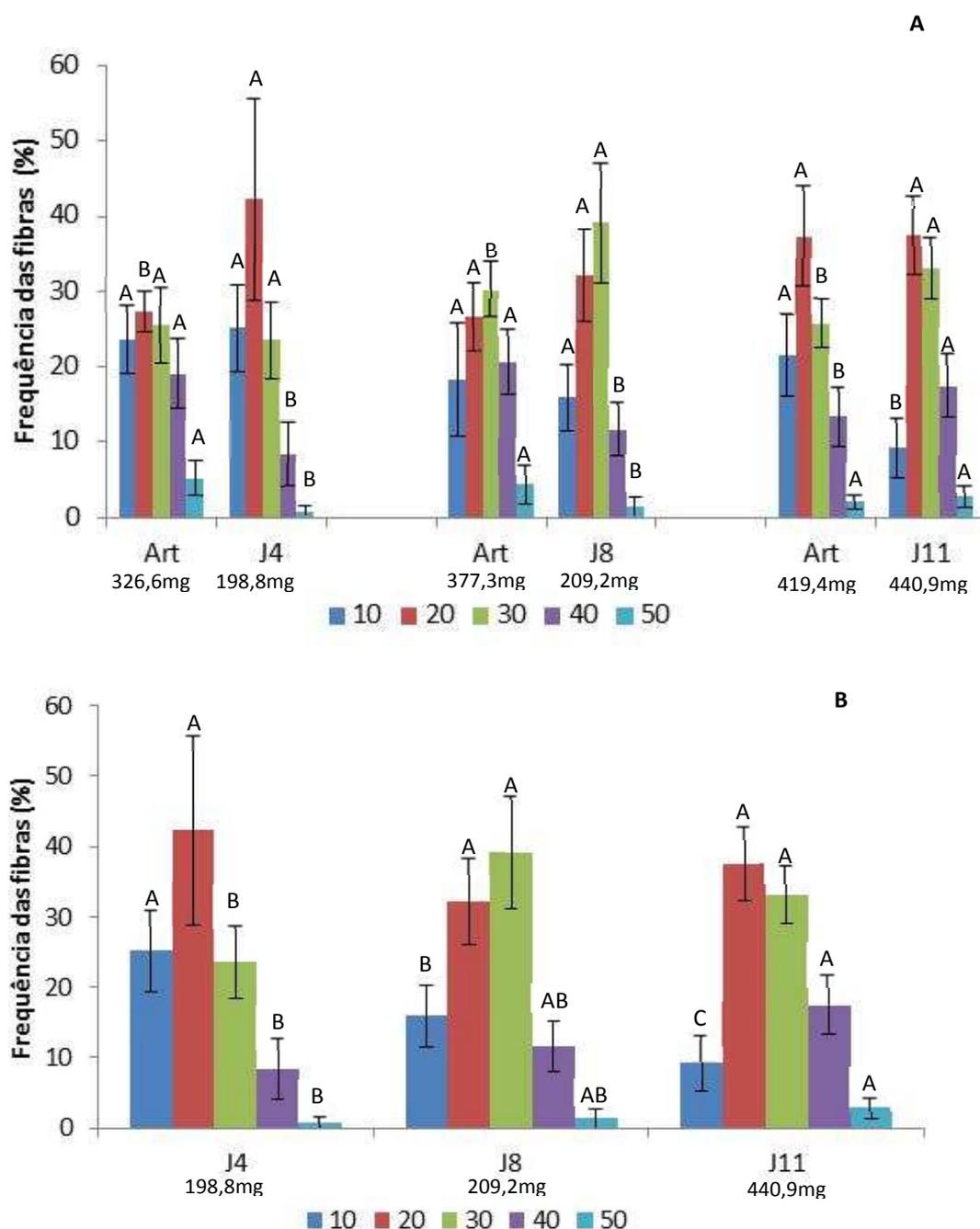


Figura 6: Distribuição das fibras musculares do compartimento profundo de acordo com o diâmetro ( $d$ ,  $\mu\text{m}$ ) e peso médio de juvenis de pacu ao final do experimento. **(A)** Juvenis com quatro (J4), oito (J8) e onze (J11) dias em jejum e seus respectivos controles (ART). **(B)** Comparação da frequência de fibras dos diferentes diâmetros entre os tratamentos em jejum ao final do experimento.

Classes de diâmetro: classe 10 =  $d \leq 10$ , classe 20 =  $10 < d \leq 20$ ; classe 30 =  $20 < d \leq 30$ , classe 40 =  $30 < d \leq 40$ , classe 50 =  $D > 40$ . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p > 0,05$ ). Em 6A a comparação é pelo teste-t entre as classes de fibras do tratamento e seu respectivo controle. Em 6B a comparação é por ANOVA entre as classes nos diferentes tratamentos em jejum.

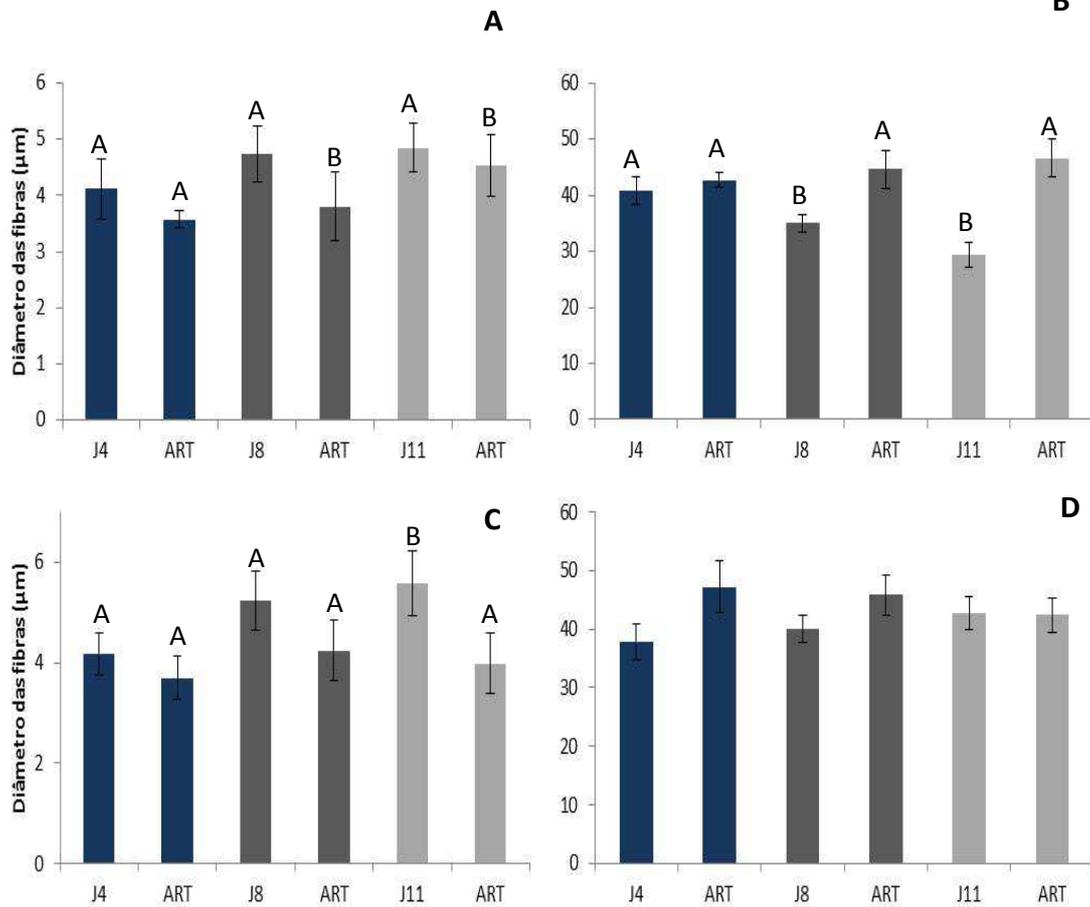


Figura 7. Diâmetro médio das cinco fibras musculares de menor e maior diâmetro. Em (A) e (C), fibras de menor diâmetro ao final do período de jejum e ao final do experimento, respectivamente. Em (B) e (D), fibras de maior diâmetro ao final do período de jejum e ao final do experimento, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (teste-t,  $p > 0,05$ ) na comparação entre os tratamentos e seus respectivos controles.

### Morfologia das fibras musculares

Aos quatro dias de jejum não foram observados sinais de atrofia muscular nos cortes histológicos quando comparadas ao tratamento controle (Figuras 8A e 8B). Já com 8 e 11 dias em jejum (Figuras 8C e 8E), houve a degradação do tecido muscular caracterizado por: preenchimento do espaço intersticial por tecido conjuntivo, e localização periférica extrema dos núcleos, desorganização das estruturas celulares e perda de miofibrilas (Figuras 8D e 8F).

Ao final do período de realimentação as fibras musculares dos animais mantidos em jejum por quatro, oito e onze dias (Figuras 9A, 9C e 9E) estavam semelhantes ao controle alimentado por todo experimento (Figuras 9B, 9D e 9F), com recuperação da forma e diâmetro das fibras.

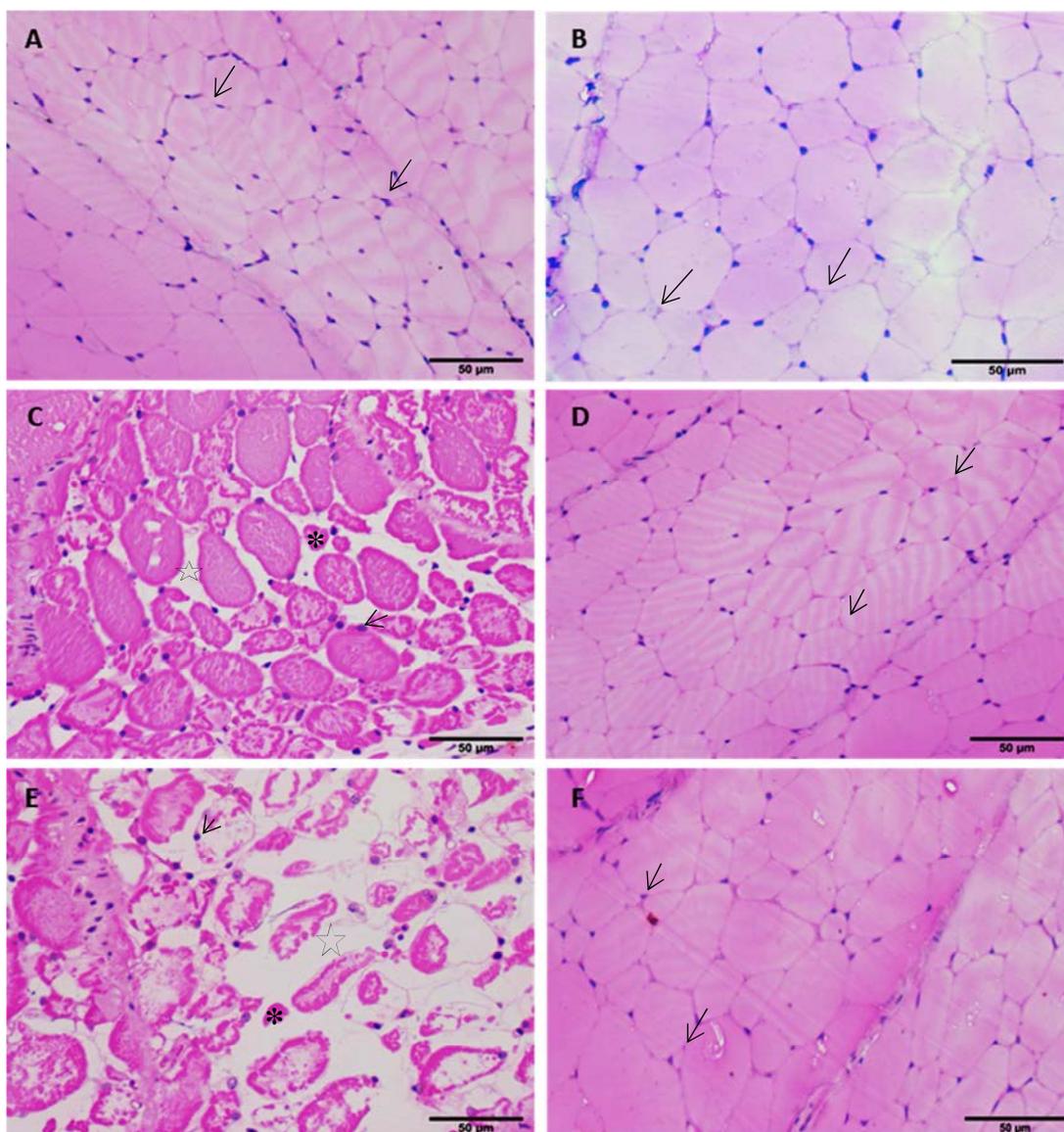


Figura 8. Fotomicrografia dos cortes histológicos da musculatura epaxial de juvenis de pacu. A, C e E: Peixes em jejum por quatro (J4), oito (J8) e onze (J11) dias, respectivamente. Seta curta: núcleos periféricos, estrela: infiltração tecido conjuntivo no espaço intersticial, (\*) fibras da classe 10 devido à perda da massa muscular. B, D e F: Peixes do tratamento controle (alimentado) dos respectivos tratamentos em jejum: quatro (J4), oito (J8) e onze (J11) dias. J4, J8 e J11, ao final do período jejum. Seta longa: fibras pequenas rodeadas por fibras grandes. Coloração: Hematoxilina-floxina-B.

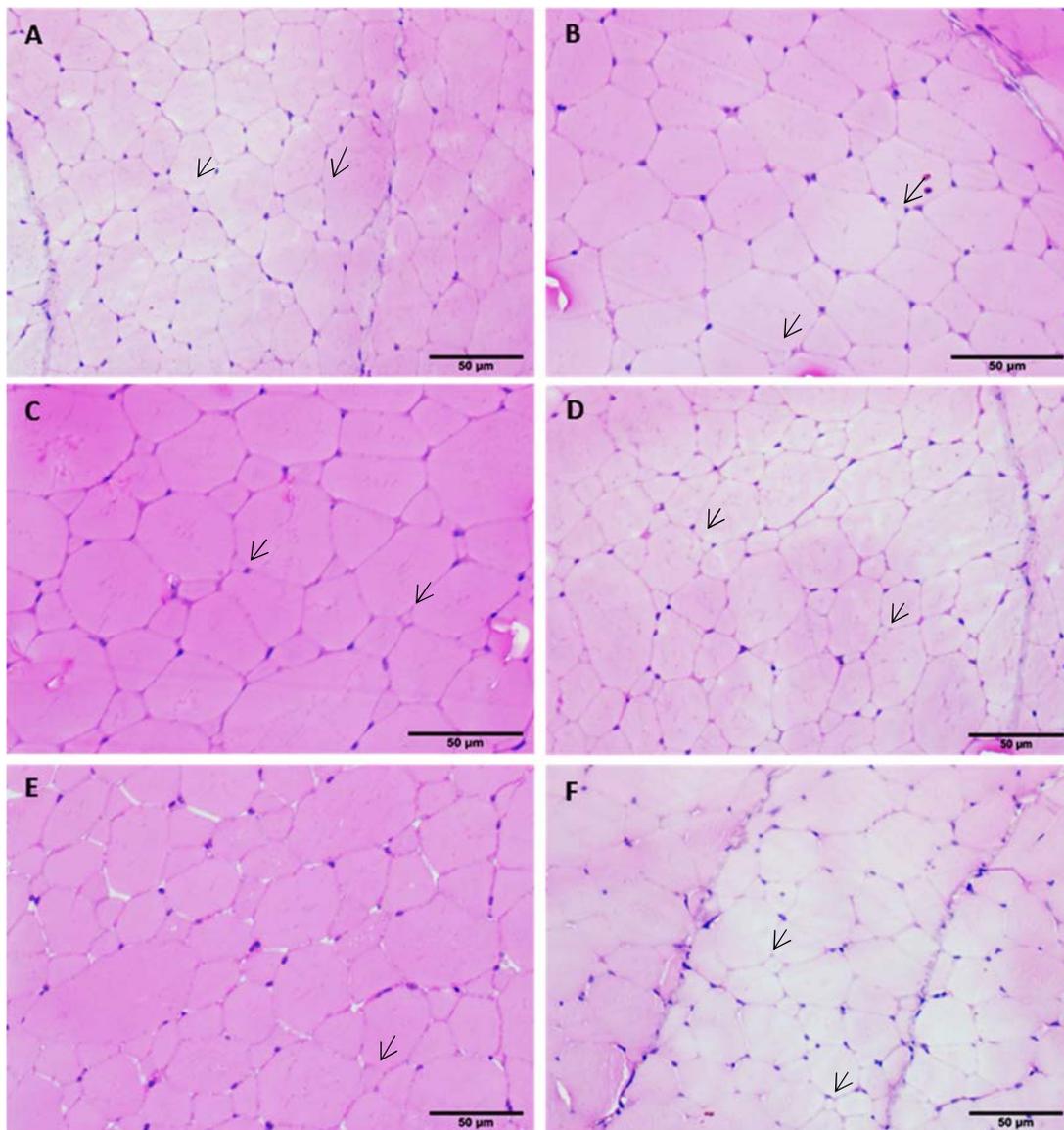


Figura 9. Fotomicrografia dos cortes histológicos da musculatura epaxial de juvenis de pacu. A, C e E: Peixes ao final do experimento que passaram pelo jejum de quatro (J4), oito (J8) e onze (J11) dias, respectivamente; B, D e F: Peixes do tratamento controle (alimentado) dos respectivos tratamentos: J4, J8 e J11 ao final do experimento. Seta: fibras menores rodeadas por fibras maiores. Coloração: Hematoxilina-floxina-B.

### 8.5 Efeitos no fígado

Ao final dos períodos de restrição alimentar, a análise microscópica de fragmentos de fígado revelou discreto desarranjo cordonal dos hepatócitos devido à vacuolização observada nas células hepáticas dos fígados dos juvenis do tratamento controle, alimentado durante todo o período (Figura 10D). Observou-se que o fígado desses animais apresentava muitas granulações PAS positivas durante todo período experimental (Figura 10H). Já para os animais mantidos em jejum, a vacuolização era menos evidente (Figuras 10 B,C), portanto com arranjo cordonal mais característico (Figuras 10 B,C,D). Nos tratamentos J8 e J11, foram observadas áreas de necrose e infiltração de tecido conjuntivo (Figuras 10 B,C). A reação ao PAS foi menos intensa nesses tratamentos, principalmente nos tratamentos J8 e J11 (Figuras 10 F,G). O tratamento J4 ainda apresentava alguma reação positiva ao PAS (Figura 10H).

Após o período de realimentação, os fígados dos peixes de todos os tratamentos mantidos em jejum (J4, J8 e J11) apresentaram características morfológicas similares ao controle positivo (Figuras 11 A,B,C,D, respectivamente). Em todos os grupos foi observado deslocamento do núcleo do hepatócito para periferia e reação positiva ao PAS (Figuras 11 E,F,G,H, respectivamente).

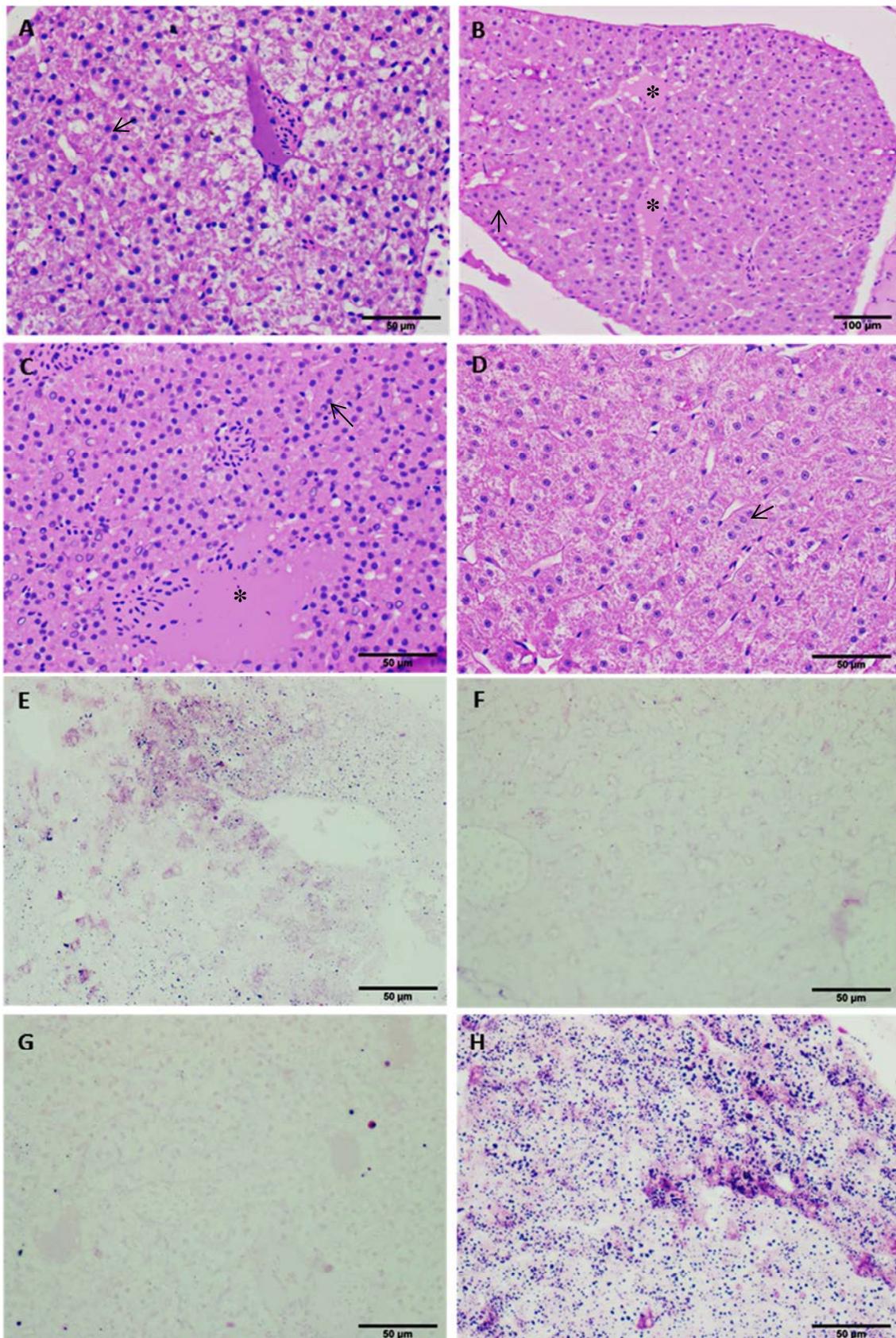


Figura 10. Fotomicrografias do fígado de juvenis de pacu ao final do período de jejum. (A) Jejum 4 dias: hepatócitos em arranjo cordonal (seta longa) com núcleos deslocados para periferia devido ao acúmulo de glicogênio (seta curta); (B) jejum 8 dias: hepatócitos em arranjo cordonal (seta longa) e (\*) infiltração do tecido conjuntivo; (C) jejum 11 dias: hepatócitos em arranjo cordonal (seta longa) e (\*) infiltração do tecido conjuntivo e aumento da vacuolização hepática (seta vazada); (D) controle alimentado: hepatócitos com núcleos deslocados para periferia devido ao acúmulo de glicogênio (seta curta). Coloração: H-F. (E) Jejum 4 dias: presença de glicogênio nos hepatócitos (estrela); (F) jejum 8 dias: reação negativa ao PAS; (G) jejum 11 dias: reação negativa ao PAS; (H) controle alimentado: reação negativa ao PAS (estrela). Coloração: PAS.

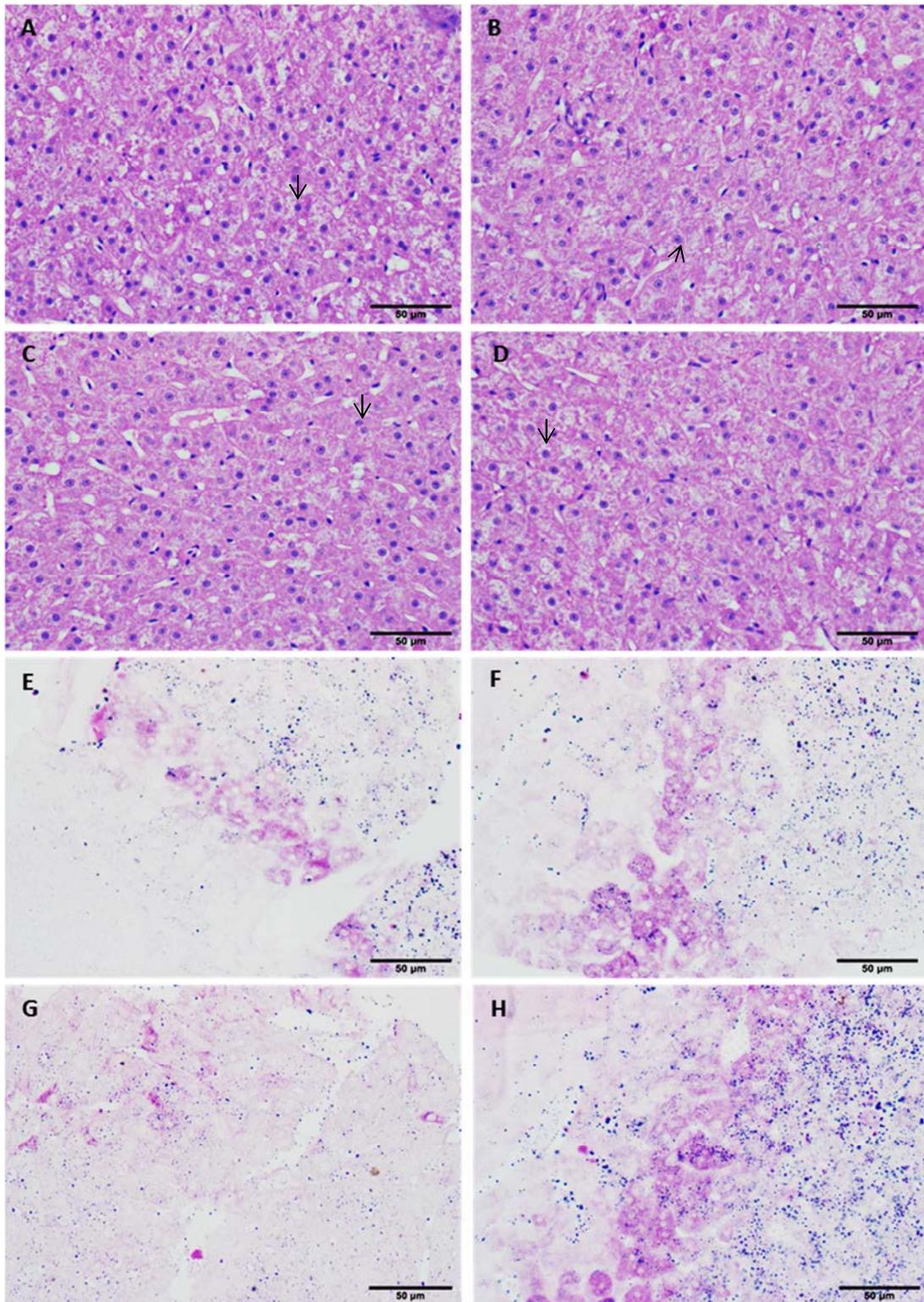


Figura 11. Fotomicrografias do fígado de juvenis de pacu ao final do experimento (realimentados por 20 dias). (A) Juvenis mantidos em jejum por 4 dias; (B) Juvenis mantidos em jejum por 8 dias; (C) Juvenis mantidos em jejum por 11 dias; (D) Controle alimentado por todo período experimental. Seta: hepatócitos com núcleos deslocados para periferia devido ao acúmulo de glicogênio. Coloração: H-F. (E) Juvenis mantidos em jejum por 4 dias; (fr) Juvenis mantidos em jejum por 8 dias; (G) Juvenis mantidos em jejum por 11 dias; (H) Controle alimentado por todo período experimental. Reação positiva ao PAS evidenciando acúmulo de glicogênio hepático. Coloração: PAS.

## 8.6 Expressão gênica

Observou-se que a expressão do MAFbx e MuRF1 a foi maior no tratamento J8, diferindo estatisticamente do tratamento J4 e, ambos diferindo estatisticamente do controle positivo (alimentado por todo o período), que apresentou menor taxa de expressão desses genes (Figura 12). Para a miostatina-b, não houve diferença entre o tratamento J4 e o controle, apresentando resultados superiores ao tratamento J8.

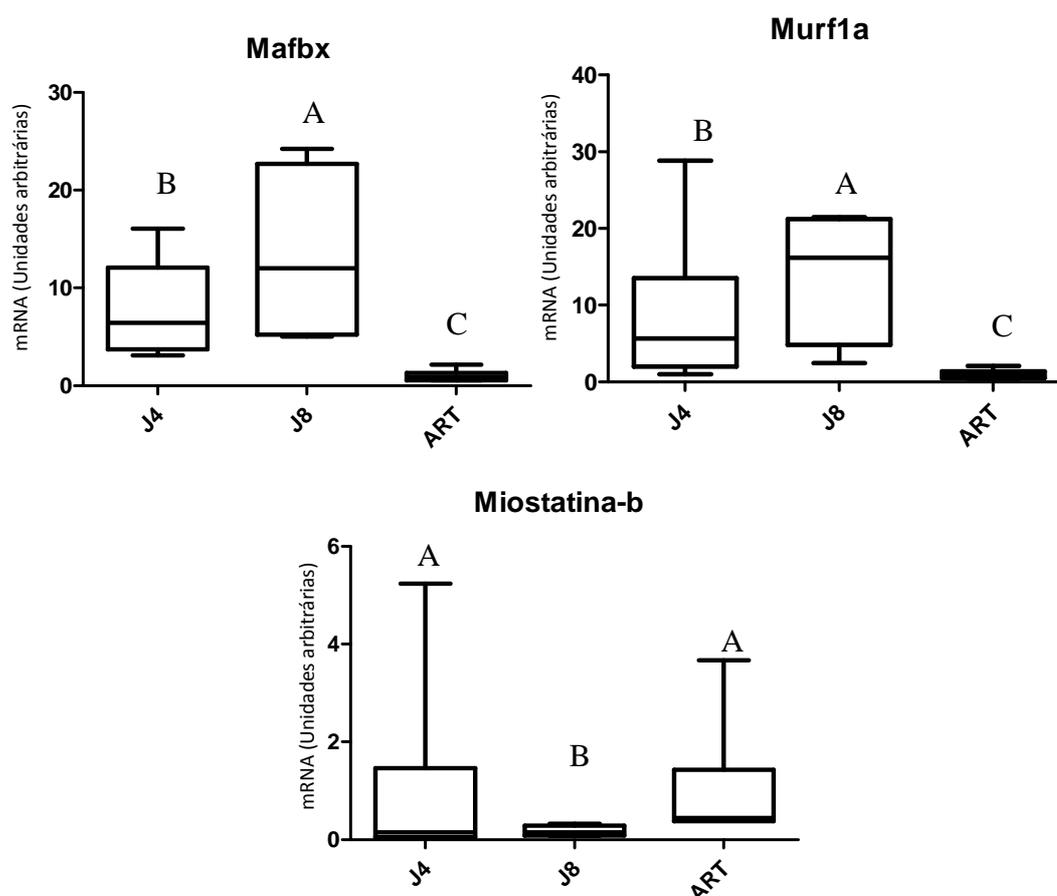


Figura 12. Avaliação quantitativa de uma RT-PCR de genes relacionados à atrofia e regulação do crescimento muscular realizada no tecido da musculatura branca de juvenis de pacu mantidos por 4 e 8 dias em jejum e o controle positivo alimentado por 4 dias. Os dados foram expressos como mínimo 1º quartil, mediana, 3º quartil e valores máximos. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste este de Dunn a 5%.

Em relação aos genes relacionados ao crescimento muscular, não houve diferença estatística entre os tratamentos em jejum e o controle positivo para a expressão da miogenina. Para a Myod, observou-se maior expressão nos peixes em

jejum quando comparados ao controle positivo ART. Já para o IGF-1A, observou-se que a expressão foi maior ( $P < 0,05$ ) no tratamento alimentado. E, entre os tratamentos mantidos em jejum, não houve diferença significativa (Figura 13).

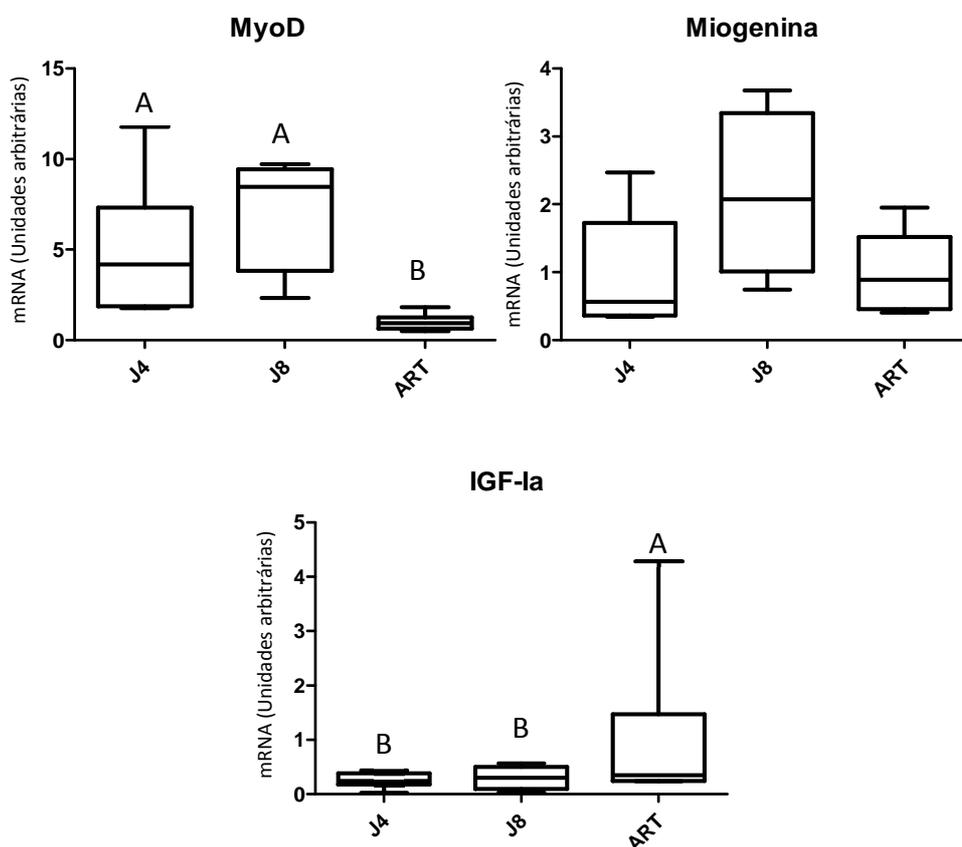


Figura 13. Avaliação quantitativa de uma RT-PCR de relacionados ao crescimento muscular realizada no tecido da musculatura branca de juvenis de pacu mantidos por 4 e 8 dias em jejum e o controle positivo alimentado por 4 dias. Os dados foram expressos como mínimo 1º quartil, mediana, 3º quartil e valores máximos. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste este de Dunn a 5%.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo, o jejum afetou negativamente o desempenho e a sobrevivência dos juvenis de pacu, e a mortalidade total dos animais mantidos em jejum ocorreu por volta de 13 dias em jejum. Em uma fase anterior do desenvolvimento, Kojima (2012) observou a mortalidade de larvas de pacu com cerca de oito dias em jejum (13 dias pós eclosão). Já Menossi et al. (2012) observaram

mortalidade com cerca de 19 dpe (14 dias em jejum), Leitão et al. (2011) com 18 dpe (13-14 dias em jejum) e Tesser et al. (2005a) com 16 dpe (11-12 dias em jejum). Primariamente, esse tratamento visava manter os animais em jejum por 12, mas devido à grande mortalidade ocorrida, optou-se por adiantar um dia e coletar os animais para as análises e já iniciar a realimentação. A resistência das larvas ao jejum está intimamente ligada à qualidade dos ovos (RANA 1985; ZHAO et al. 2001), temperatura e a fase de desenvolvimento em que os animais se encontram (SHAN et al. 2008). Por outro lado, estudos dos efeitos do jejum em outras espécies de peixe como carpa (FORGATI 2011) e tilápia-do-nilo (NEBO et al. 2013) demonstram que a privação alimentar não afetou tão drasticamente a sobrevivência dos animais, uma vez que esses estudos foram conduzidos com animais maiores, com cerca de  $35,6 \pm 29,4$  mm de comprimento total e  $0,6 \pm 0,19$  g.

O crescimento dos juvenis de pacu também foi afetado pelo jejum e crescimento compensatório total não foi observado ao final da fase de realimentação nos tratamentos J4 e J8, uma vez que os indicadores de crescimento dos animais mantidos em jejum foram menores quando comparados ao controle alimentados. Entretanto, os peixes do tratamento J11 exibiram crescimento superior ao controle no final do experimento. Esse resultado pode ser um indicativo de capacidade de crescimento compensatório, mas os possíveis efeitos da menor densidade de estocagem (decorrente da maior mortalidade) e da ingestão incidental de peixes moribundos (por canibalismo) também precisam ser considerados. Segundo Sumpter et al. (1991), os efeitos da privação alimentar são mais evidentes em peixes mais jovens devido a maior taxa de crescimento dos animais durante essa fase, quando comparada aos peixes adultos, levando a um consumo maior das reservas armazenadas. Além disso, os autores também afirmam que peixes adultos e de grande porte têm maior quantidade de massa muscular armazenada em seu organismo do que peixes jovens. No presente estudo, os juvenis de pacu dos tratamentos J4, J8 e J11 apresentaram TCE negativas durante o período de jejum, sendo um indicativo que as reservas nutricionais estavam sendo consumidas.

A mortalidade foi acentuada no período de jejum, assim como a taxa de canibalismo aparente. Embora o pacu tenha hábito alimentar onívoro e não possua comportamento agressivo (URBINATI et al. 2010), durante o período experimental foi

observada atividade canibal entre os peixes, com maior ocorrência conforme mais prolongado o período de privação alimentar. Menores taxas de sobrevivência com o aumento do período de jejum também foi observado por Folkvord (1991) com juvenis de *Gadus morhua*.

Durante o jejum pode-se observar alterações na atividade metabólica, sendo que, durante este período, processos essenciais são mantidos à custa das reservas energéticas endógenas, o que resulta em perda de massa corpórea (ZAMAL e OLLEVIER 1995). Neste estudo, observou-se extensa perda do tecido muscular dos juvenis de pacu submetidos ao jejum mais prolongado, evidenciada pela morfometria e morfologia das fibras, taxa de crescimento específico negativa e redução do crescimento. Já foi observado em larvas de pacu mantidas em laboratório a diminuição do peso na fase de transição alimentar, quando se substitui o alimento vivo (geralmente náuplios de artêmia) pela dieta inerte (LEITÃO et al. 2011, MENOSSI et al. 2012). Esse fato pode ocorrer devido ao fato da larva não reconhecer as partículas da ração como alimento, uma vez que estas nem sempre são atrativas (i.e. liberam substâncias quimioatrativas), ou então a larva ingere a partícula, porém não é capaz de digerir-la eficientemente, resultando em má nutrição.

No presente estudo, houve acentuada diminuição de peso devido ao consumo de tecido muscular gerado pelo jejum imposto aos peixes. Como pode ser observado nos cortes histológicos da musculatura esquelética, quanto maior o período de jejum, maiores foram os sinais de atrofia do tecido muscular. Em algumas fases do desenvolvimento, como nas migrações para maturação gonadal, a degradação da proteína muscular supera a síntese, levando à atrofia (JOHSNTON 2011), mas, após a normalização da ingestão de alimentos, o tecido muscular tende a se recuperar, fato também observado nos juvenis de pacu.

Além de afetar o desempenho zootécnico dos peixes, os efeitos deletérios do jejum também foram verificados no tecido muscular. Os animais que passaram por 4 dias em jejum aparentemente não tiveram o crescimento hiperplásico influenciado pela privação alimentar, situações observadas tanto no final do jejum quanto no de realimentação. Porém, no final do jejum, os animais dos tratamentos J8 e J11 apresentavam maior quantidade de fibras nas classes menores (10 e 20) devido ao consumo do tecido muscular. Mas, ao fim do experimento, os peixes do J11

apresentavam menor frequência de fibras da classe 10, e maior frequência das fibras das classes 30 e 40 que o controle, sugerindo menor investimento no crescimento hiperplásico, já iniciando investimento em hipertrofia. Em peixes, o crescimento muscular nas fases iniciais ocorre por hiperplasia (DAL PAI et al.2007; AGUIAR et al. 2005; ALMEIDA et al. 2008; OSTASZEWSKA et al. 2008;) e é também influenciado pelas condições nutricionais (LEITÃO et al. 2011, KOJIMA 2012). Leitão et al. (2011) observaram que larvas de pacu alimentadas com dietas formuladas desde o início da alimentação exógena apresentavam características musculares semelhantes as larvas mantidas em jejum. Em seu estudo, larvas mantidas em jejum por 18 dias exibiram as fibras musculares angulares com grande perda de massa muscular, semelhante ao ocorrido no presente estudo.

Observaram-se menores diâmetros médios das cinco menores e cinco maiores fibras musculares dos animais mantidos em jejum por 8 e 11 quando comparados aos tratamentos controle, devido ao consumo do tecido muscular. Porém, após a fase de realimentação, na avaliação das cinco menores fibras, os peixes do tratamento J11 apresentaram as 5 menores fibras com maior diâmetro médio maior que o controle, indicando que as fibras pequenas já estavam aumentando em diâmetro. Esse fato sugere que menor quantidade de fibras novas estavam sendo recrutadas para o crescimento pelo processo de hiperplasia, como poderia estar ocorrendo no controle. Porém, os peixes do J11 eram maiores que os do controle e também já poderiam estar numa fase diferente de crescimento, com maior investimento em hipertrofia das fibras. As possíveis consequências desse fato nas etapas subsequentes da criação precisam ser investigadas, uma vez que o menor recrutamento de novas fibras, ocasionado pelo jejum, pode comprometer o crescimento futuro desses peixes, quando o processo de hipertrofia for mais ativo. Diferentemente dos animais mantidos em jejum por 8 e 11 dias que apresentavam fibras de menor diâmetro em razão de atrofia, os animais do controle positivo apresentavam fibras saudáveis. Portanto, a distribuição nas classes de menor tamanho no controle estava relacionada com o processo hiperplásico, ou seja, a formação de novas fibras musculares.

O jejum promove alterações metabólicas e fisiológicas ativando reações catabólicas a fim de obter energia a partir de reservas corporais armazenadas. Como em peixes o tecido muscular é uma das fontes de energia armazenada, o processo

atrófico oriundo do consumo desse tecido ficou mais pronunciado conforme maior o período de jejum uma vez que o músculo foi degradado para fins energéticos (MOMMSEN e MOON, 2001). Em peixes, o músculo é o maior reservatório de proteínas e serve como uma reserva primária de aminoácidos (KETTELHUT et al. 1988).

A presença de fibras menores entre as fibras de maior diâmetro é característica do processo de crescimento muscular por hiperplasia em mosaico (JOHNSTON, 1999; ALMEIDA et al. 2008). Nesse estudo, pela morfometria das fibras musculares, observou-se que o jejum prolongado afetou o crescimento muscular posterior dos juvenis de pacu. O jejum por 4 dias não afetou o crescimento hiperplásico, uma vez que não houve diferenças estatísticas na frequência das fibras da classe 10 entre os animais mantidos em jejum e controle alimentado. Contrariamente, os períodos de 8 e 11 dias em jejum afetaram a distribuição das fibras musculares. Em larvas de pacu, Kojima (2012) não observou diferença estatística na frequência das fibras de menor classe após a fase de cultivo em tanques externos durante trinta dias, apesar de grande heterogeneidade nos tratamentos que passaram por maior tempo em jejum. Em seu estudo, a autora não observou influência no crescimento das fibras musculares, conseqüentemente, o crescimento muscular parece não ter sido influenciado, contrariamente ao que foi observado no presente estudo.

A diminuição do diâmetro das fibras deve-se ao consumo das proteínas da musculatura branca e, segundo Johnston et al. (1981), a degradação primária desse tecido deve-se à sua relativa abundância, quando comparado ao musculatura vermelha e intermediária. Assim como no presente estudo, Kojima (2012), ao trabalhar com larvas de pacu mantidas em jejum também observou a mesma correlação entre diminuição do peso e maior abundância de fibras das menores classes na musculatura branca, relacionando esse fato à atrofia muscular.

Os resultados de expressão gênica dos genes relacionados à atrofia muscular nos peixes dos tratamentos mantidos em jejum corroboraram as análises de crescimento e histológicas. Esses animais apresentaram diminuição acentuada de peso, sinais de atrofia nas fibras musculares e maior expressão dos genes relacionados à atrofia muscular, MAFbx e MuRF1a.

Maior expressão dos genes relacionados à atrofia muscular (MuRF e MAFbx) ocorreu nos pacus mantidos em jejum. O RNAm de MuRFs é expresso em maior

abundância no músculo branco e sua expressão está intimamente modulada pelo jejum (TACCHI et al. 2011). A maior expressão desses genes também foi relatada por Bower et al. (2009) e Tacchi et al. (2010) em peixes que estavam em estado de proteólise. Em relação ao MAFbx, observou-se a mesma tendência de maior expressão nos juvenis de pacu mantidos em jejum. Bower et al. (2010) também observaram aumento da expressão em salmões do Atlântico (*Atlantic salmon*) mantidos em jejum, sendo que após 24 horas da realimentação, as taxas de expressão desse gene decaíram significativamente.

Em salmões, a expressão dos genes MuRF foi estudada em oito diferentes tecidos que mostram que todas as isoformas e MuRF1 MuRF2 foram expressas em outros tecidos (como cardíaco, rim e brânquias), porém, foi maior no músculo branco (TACCHI et al. 2012). A expressão desses genes atróficos em outros tecidos dos peixes pode ser um indicativo que esses tecidos também codificam proteínas que são utilizadas como substratos durante situações de privação alimentar (TACCHI et al. 2012). Mareco et al. (2014) também observaram altas taxas de expressão de MuRF e MAFbx em juvenis de pacu maiores (~15 g) submetidos ao jejum de quatro dias e, após 24 horas da realimentação, os níveis de expressão desses genes já se aproximavam do normal, não apresentando diferenças significativas aos níveis detectados no início do experimento, quando os peixes estavam em condições normais.

A expressão do IGF-I está correlacionada com o estado nutricional e a taxa de crescimento (IMSLAND et al. 2007). Neste experimento notou-se que em juvenis de pacu bem nutridos a expressão desse gene foi maior do que os mantidos em jejum. Assim como no presente estudo, Hagen et al. (2009) também observaram maior taxa de expressão do IGF-I em trutas arco-íris alimentadas do que nas que estavam em jejum. Os IGF's no tecido muscular estimulam a proliferação, diferenciação e hipertrofia, além de inibir a atrofia muscular (GLASS 2003, 2005). Bower et al. (2011) observaram que células musculares tinham seus níveis de expressão de MAFbx-b diminuídos na presença de aminoácidos ou tratamento com IGF-I. Uchida et al. (2003) e Dyer et al. (2004) também relataram o relação positiva da expressão do IGF-I e a taxa de crescimento de peixes.

Em relação aos genes estudados relacionados ao crescimento muscular (MyoD, Miogenina e Miostatina), a miogenina não apresentou diferença significativa entre os

animais mantidos em jejum e o controle, sendo que, as maiores taxas de expressão foram encontradas nos animais mantidos em jejum. Isso contrariou as expectativas, uma vez que se espera menor expressão desses genes em condições de jejum e atrofia muscular. Segundo Johansen e Overturf (2005), mesmo que observado um pequeno crescimento muscular durante o jejum, a diminuição dos genes que promove o crescimento muscular era esperada. Nesse estudo, realizado com trutas (~300 g de peso médio) os autores também não encontraram diferenças estatísticas ao analisar a expressão do TMyoD2 durante o período de jejum. Da mesma maneira, foi inesperada a baixa expressão de miostatina nos juvenis de pacu em jejum por oito dias, uma vez que esse gene regula negativamente o crescimento muscular, inibindo a expressão de MyoD, miogenina e Myf5 (RÍOS et al. 2002, JOULIA et al. 2003), o que não ocorreu no presente estudo.

Nos animais mantidos em jejum observou-se também o decréscimo do glicogênio hepático armazenado nos hepatócitos. Quando os peixes permaneceram por oito e onze dias em jejum, além da ausência de glicogênio, pode-se notar áreas de necrose no fígado. Como revisado por Gisbert et al. (2008), a privação de alimento mobiliza primariamente o glicogênio hepático e lipídios. Ainda, segundo Lazzo et al. (2011), a organização histológica do fígado é particularmente sensível à privação de alimento e jejum. Essas características fazem que o fígado seja um bom biomarcador da condição nutricional e peixes, tanto em relação aos diferentes manejos alimentares quanto à qualidade da dieta, fato comprovado com os resultados da presente pesquisa. Segundo Lazo et al. (2011), em boas condições nutricionais o fígado deve apresentar hepatócitos com os núcleos distintos e frequentemente deslocado lateralmente, citoplasma levemente manchado e vacuolizados além do destaque dos limites dos hepatócitos. No presente estudo, observam-se essas características, indicando que os 20 dias de realimentação foram suficientes para recuperação do tecido hepático, não sendo notadas diferenças histológicas entre os animais que foram mantidos em jejum e os alimentados por todo período experimental.

No presente estudo, após o período de realimentação, dentre os períodos de jejum avaliados, apenas o J11 não apresentou diferença estatística para o peso final, comprimento total, taxa de crescimento específico e fator de condição em relação ao controle alimentado, diferindo estatisticamente somente em relação ao ganho em

peso, que foi superior resultado aparentemente inesperado. Apesar da quantidade de náuplios de artêmia ter sido proporcional ao número de juvenis de pacu vivos no tanque, esses peixes estavam em menor densidade e esse fato pode ter influenciado o crescimento compensatório desses animais. Menossi (2007) também observou maior crescimento de juvenis de pacu estocados em menor densidade. Mesmo com as taxas de crescimento maiores em baixas densidades, em termos práticos esta se torna inviável, pois apresenta menor produtividade final, podendo minimizar os lucros do produtor (GOMES et al 2000).

Segundo Jobling (1993), em alguns casos os animais realimentados podem apresentar rápida recuperação do crescimento devido a uma melhor conversão alimentar, mesmo não se tornando hiperfágicos. Os outros tratamentos podem não ter alcançado o peso final dos peixes do controle (alimentados) pois, após períodos de jejum, os animais priorizam a restauração dos componentes corporais e das reservas energéticas ao invés do crescimento do tamanho corporal (RIOS et al. 2002).

Em síntese, o jejum prolongado afetou o crescimento e a sobrevivência de juvenis de pacu bem como a celularidade das fibras musculares, ocasionando prejuízo no crescimento hiperplásico ao final do período de realimentação. O jejum também afetou diretamente a atrofia muscular, e a expressão dos genes MAFbx e MURF-1a aumentou nesse período. Além disso, no fígado, observaram-se alterações hepáticas como diminuição do glicogênio hepático, necrose e áreas de infiltração de tecido conjuntivo. Porém, após o período de realimentação, as fibras musculares e o tecido hepático estavam recuperados demonstrando a plasticidade desses tecidos em função de alimentação adequada.

A compreensão dos fatores que regulam a atrofia muscular é necessária, pois o jejum pode afetar o crescimento posterior dos peixes. Particularmente no caso de peixes com larvas altriciais como o pacu, na fase de substituição alimentar apresentam certa resistência para aceitar a dieta inerte, que pode causar diminuição do peso e atrofia das fibras musculares. Assim, ao se conhecer os efeitos do jejum sobre a celularidade e desempenho dos juvenis, pode-se utilizá-lo como uma técnica de manejo emergencial. Além disso, esse estudo abre novas perspectivas para a utilização de substâncias e dietas que possam causar um desbalanço positivo no *turnover*

proteico, visando aumentar a síntese do tecido muscular influenciando no lucro final do produtor.

## 8. CONCLUSÕES

- O jejum afeta negativamente a sobrevivência e o desempenho dos juvenis de pacu e, quanto maior o período de jejum, menor a sobrevivência.
- Mesmo apresentando crescimento satisfatório, peixes mantidos em jejum por quatro e oito dias não alcançam desempenho similar ao controle positivo, .
- A expressão dos atrogenes MuRF1a e MAFbx é influenciada pelo jejum, sendo mais acentuada de acordo com o prolongamento do jejum.
- O IGF-Ia apresenta menor expressão nos animais em jejum.
- A expressão da Myod, Miogenina não foi influenciada pelo jejum.
- O glicogênio acumulado no fígado de animais em jejum diminui à medida que o jejum se prolonga ocasionando áreas de necrose e infiltração de tecido conjuntivo.
- Nos peixes mantidos em jejum por oito e 11 dias, a alta frequência de fibras da classe 10 e 20 ao fim do período de jejum é um indicativo de atrofia das fibras musculares. Vinte dias de realimentação são suficientes para regeneração do tecido muscular em juvenis de pacu submetidos aos períodos de jejum testados.
- A privação alimentar afeta o crescimento muscular posterior. Juvenis de pacu do tratamento controle e os mantidos em jejum por quatro dias apresentam maior crescimento hiperplásico quando comparados aos privados de alimento por oito e onze dias.
- Assim, observa-se que longos períodos de jejum em juvenis de pacu pode comprometer a formação de novas fibras musculares e o crescimento futuro dos animais.
- Em situações emergenciais, jejum de até 4 dias pode ser utilizado como estratégia de manejo em juvenis de pacu pois não compromete a sobrevivência e o crescimento hiperplásico das fibras musculares.

## 9. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. H. *et al.* Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal of Fish Biology**, v. 67, p. 1287-1298, 2005.
- ALAMI-DURANTE, H., FAUCONNEAU, B., ROUEL, M., ESCAFFRE, A. M. and BERGOT, P. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate. **Journal of Fish Biology**. v. 50, p. 1285-1302. 1997.
- ALEXANDER, R. Mc, N. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. **Journal of Marine Biology Association**, U.K., v. 49, p. 263-290, 1969.
- ALMEIDA, F.L.A., CARVALHO, R.F., PINHAL, D., PADOVANI, C.R., MARTINS, C., DAL PAI-SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron** 39, 1306–1311. 2008.
- ASSIS, J. M. F. de; CARVALHO, R. F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C. A.; DAL PAI-SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 237, p. 251-267, 2004.
- ATTAIX, D.; BARACOS, V.E. MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of muscle proteolysis. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, p. 223–224. 2010.
- BODINE, S.C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V.K.M.; NUNEZ, L.; CLARKE, B.A.; POUYMIROU, W.T.; PANARO, F.J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z.Q.; VALENZUELA, D.M.; DECHIARA, T.M.; STITT, T.N.; YANCOPOULOS, G.D.; GLASS, D.J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v.294, n.5547, p.1704-1708, 2001.
- BOWER, N. I; LA SERRANA, D.G. JOHNSTON, I. Selection of reference genes for expression studies with fish myogenic cell cultures. **BMC Mol. Biol.** 10. 2009.
- BOWER, N. I; LA SERRANA, D.G. JOHNSTON, I. Characterisation and differential regulation of MAFbx/Atrogin-1  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 265–271. 2010.
- BOWER, N.I.; LA SERRANA, D. G.; JOHNSTON, I. Characterisation and differential regulation of MAFbx/Atrogin-1  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 265–271. 2011

CARNEVALI, O.; VIVO, L.; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S.; CRESCI, A. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, p. 430-438, 2006.

CHAN, S.J., Q.-P. CAO, S. NAGAMATSU, D.F. STEINER. Insulin and insulin-like growth factor genes in fishes and other primitive chordates. In P. Hochachka, T. Mommsen (eds.) **Biochemistry and molecular biology of fishes**, Vol. 2. Elsevier, Amsterdam. 1993.

CLARKE, B.A.; DRUJAN, D.; WILLIS, M.S.; MURPHY, L.O.; CORPINA, R.A.; BUROVA, E.; RAKHILIN, S.V.; STITT, T.N.; PATTERSON, C.; LATRES, E.; GLASS, D.J. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. **Cell Metabolism**, v.6, n.5, p.376-385, 2007.

CLEVELAND, B. M.; WEBER, G. M.; BLEMINGS, K. P.; SILVERSTEIN, J. T. Insulin-like growth factor-I and genetic effects on indexes of protein degradation in response to feed deprivation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297. p.R1332–R1342, 2009.

COOK, J. T.; SUTTERLIN, A. M.; McNIVEN, M. A. Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.188, p.47-63, 2000.

CURRIE, P.D., INGHAM, P.W., Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: Johnston IA (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, pp. 1-17. 2001.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.36, *suplemento especial*, p.21-31, 2007.

DAVIS, T.A; FIOROTTO, M.L; BURRIN, D.G; VANN, R.C; REEDS, P.J; NGUYEN, H.V; BECKETT, P.R; BUSH, J.A. Acute IGF-I infusion stimulates protein synthesis in skeletal muscle and other tissues of neonatal pigs. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**. v. 283 p.638–647, 2002.

DEVOTO, S.H., MELANÇON, E., EISEN, J.S., WESTERFIELD, M., Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. **Development** v. 122, p. 3371-3380. 1996.

DUAN C., HIRANO T. Effects of insulin-like growth factor-I and insulin on the in vitro uptake of sulfate by eel branchial cartilage: evidence for the presence of independent hepatic and pancreatic sulfation factors. **Endocrinology**, v. 133, p. 211-219, 1992.

DUAN C., DUGUAY S. J., PLISETSKAYA E. M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family peptides. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 11, p. 371-379, 1993.

DYER A. R., UPTON Z., STONE D., THOMAS P. M., SOOLE K. L., HIGGS N. Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels. **General and Comparative Endocrinology**. 135, 268. 2004.

FAUCONNEAU, B.; PABOEUF, G. Muscle fiber diversity and plasticity. In: **Muscle Development and Growth**, JOHNSTON, I. A. (Ed) London: Academic Press, 318 p. 2001.

FOLKVORD, A. Growth, survival and cannibalism of cod juveniles *Gadus morhua*: effects of feed type, starvation and fish size. **Aquaculture**,v. 97, p.41-59, 1991.

FORGATI, M. **Crescimento muscular compensatório e metabolismo energético de *Cyprinus carpio* realimentados após privação de alimento**. Dissertação. 77p. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. 2011.

FUNKENSTEIN, B. and REBHAN, Y. Expression, purification, renaturation and activation of fish myostatin expressed in *Escherichia coli*: facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. **Protein Expression and Purification**, . v. 54, p; 54-65. 2007.

GISBERT ,E.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; SARASQUETE. C. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. **Histology and Histopathology** v. 23, p. 1525-1539. 2008.

GLASS, D.J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* v. 5, p. 87–90. 2003.

GLASS, D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v.37, p. 1974-1984, 2005.

GOLDBERG, A.L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. **Biochemical Society Transactions**, v.35, n.1, p.12-7, 2007.

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

Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains. *J Anim Sci* 2008; 86(14 suppl):E19–35.

GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B.; SENHORINI, J. A. Effect of stocking density on water quality, survival, and growth of larvae of matrinxã, *Brycon cephalus* (Characidae), in ponds. **Aquaculture**, v.183, p.73-81, 2000.

GREENHAFF, P.L.; KARAGOUNIS, L.G.; PEIRCE, N.; SIMPSON, E.J.; HAZELL, M.; LAYFIELD, R.; WACKERHAGE, H.; SMITH, K.; ATHERTON, P.; SELBY, A.; RENNIE, M.J. Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.295, n.3, p. 595-604, 2008.

HAGEN, O.; FERNANDES, J.M.O.; SOLBERG, C.; JOHNSTON, I.A. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.152, p. 47-53, 2009.

HERSCHKO, A. ; CIECHANOVER, A . The ubiquitin system for protein degradation. [Annu Rev Biochem.](#) 61:761-807. 1992.

HIGUERA, M.; AKHARBACH, H.; HIDALGO, M. C.; PERAGÓN,J.; LUPIÁÑEZ, J. A.; GARCÍA-GALLEGO, M. Liver and white muscle protein turnover rates in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of dietary protein quality. **Aquaculture**, v. 179, p. 203-216, 1999.

HINITIS, Y.; HUGHES, S.M. Mef2s are required for thick filament formation in nascent muscle fibres. *Development*. v. 134, p. 2511–2519. 2007

HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, p. 1356-1365, 1969.

IBAMA. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: Ibama, 2008.

IMSLAND, A. K.; BJÖRNSSON, B. T.; GUNNARSSON, S.; FOSS, A. STEFANSSON, S. O. Temperature and salinity effects on plasma insulin-like growth factor-I concentrations and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, v. 271, p. 546–552. 2007

JOBLING, M. Bioenergetics: feed intake and energy partitioning. Cap. 1 p. 1-44, in: ANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (Ed). **Fish Ecophysiology**. Londres: Chapman e Hall, 421 pp. 1993.

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

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

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

JOHNSTON, I. A.; HOME, Z. Immunocytochemical investigations of muscle differentiation in the Atlantic herring (*Clupea harengus*, Teleostei). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 74, p. 79-91, 1994.

JOHNSTON, I. A.; VIEIRA, V. L. A.; ABERCROMBY, M. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring, *Clupea harengus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1389-1403, 1995.

JOHNSTON, I. A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. **Aquaculture**, v. 177, p. 99-115, 1999.

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

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

JOHNSNTON, I. A.; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. REVIEW Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology** 214, 1617-1628. 2011

JOMORI, R. K. **Estudos sobre a alimentação de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) com náuplios de *Artemia* e a sua substituição por dieta artificial**. 70 f. (Trabalho de graduação em Zootecnia.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, p. 277-287, 2003.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M. I. E. G.; PORTELLA, M. C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v. 243, p. 175-183, 2005.

JOMORI, R. K. **Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono (d13C) e nitrogênio (d15N) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval.** 121 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

JOMORI, R. K., DUCATTI, C., CARNEIRO, D. J., PORTELLA, M. C. Stable carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) isotopes as natural indicators of live and dry food in the *Piaractus mesopotamicus* larval tissue. **Aquaculture Research**, v.39, p.370 - 381, 2008.

JOULIA, D.; BERNARDI, H.; GARANDEL, V.; RABENOELINA, F.; VERNUS, B.; CABELLO, G. Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. **Experimental Cell Research**, v. 286, n. 2, p. 263-275, 2003.

KELLEY, K.M.; SCHMIDT, K.E.; BERG, L.; SAK, K.; GALIMA, M.M.; GILLESPIE, C.; BALOGH, L.; HAWAYEK, A.; REYES, J.A.; JAMISON, M.. Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. **J. Endocrinology**, v. 175, p. 3– 18, 2002.

KETELSLEGERS, J-M; MAITER, D; MAES, M; UNDERWOOD, L.E; THISSEN, J-P. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I. **Metabolism**, v. **44**, p. 50–57, 1995.

KETTELHUT, I.C., WING, S.S., GOLDBERG, A.L., 1988. Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab Rev* 4, 751–772.

KJØRSVIK E, GALLOWAY TF, ESTEVEZ A, SÆLE Ø, MOREN M. Effects of Larval Nutrition on Development. In: *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell, 219-248. 2011.

KOJIMA, J.T. Ponto-de-não-retorno e períodos de restrição alimentar nos parâmetros zootécnicos e no desenvolvimento muscular de larvas de pacu. 62 f. Dissertação Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2012

LAND, S.C., BERNIER, N.J. Estivation: mechanisms and control of metabolic suppression. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier Science, Amsterdam, , Vol. 5. p.381–412. 1995.

LAZO, J.P., DARIAS, M.J., GISBERT, E. Ontogeny of the digestive tract. In: Holt, G.J. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell, West Sussex, pp. 3–46. 2011.

LECKER S.H, SOLOMON V, MITCH, W.E, GOLDBERG A.L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin–proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr* 129. p.227S–237. 1999.

LECKER, S.H.; GOLDBERG, A.L.; MITCH, W.E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **Journal of American Society of Nephrology**, v. 17, p. 1807-1819, 2006.

LEITÃO, N.J., PAI-SILVA, M., ALMEIDA, F.L.A., PORTELLA, M.C., 2011. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture* 315, 78–85.

MACHADO-ALLISON, A. Ecología de los peces de las areas inundables de Los Llanos de Vezuela. **Interciencia**, v. 15, p. 411-423.

MACKENZIE, D.; VANPUTTE, C.; LEINER, K. Nutrient regulation of the endocrine function in fish. **Aquaculture**. v.161, p.3-25, 1998.

MARECO, E. A. Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem Gift. 66 f. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 2012.

MARECO, E. A.; SANTOS, V. B.; SALOMÃO, R. A. S.; SANTOS, R. S.; PAULA, T. G.; DAL PAI, M. Jejum e realimentação promovem alteração nos níveis de expressão de genes relacionados a atrofia muscular em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). IN: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA . Universidade Federal do Espírito Santo Vitória ES, 2014.

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

MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 73, p. 723-732, 1995.

MEHNER, T.; WIESER, W. Energetics and metabolic correlates of starvation in juvenile perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Fish Biology**, v.45, p.325-333, 1994.

MENOSSE, O.C.C. **Desempenho de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holberg, 1887) em diferentes densidades de estocagem e estratégias alimentares na larvicultura intensiva**. 46 f. Trabalho de Iniciação Científica do curso de Ciências Biológicas (Modalidade: Bacharelado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

MENOSSE, O.C.C., TAKATA, R., SANCHES-AMAYA, M.I., FREITAS, T. M., YÚFERA, M., PORTELLA, M.C. Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente. *Rev. Bras. Zootec.* v.41,p. 1-10, 2012.

METÓN, I., FERNÁNDEZ, F., BAANANTE, I.V. Short and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis– gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, v. 225, p. 99–107. 2003.

MOMMSEN, T.P., MOON, T.W. Hormonal regulation of muscle growth In: Johnston IA, editor. *Fish Physiology Vol.18, Muscle Development and Growth*, San Diego: Academic Press. 251–308. 2001.

MORIYAMA S., SWANSON P., NISHI M., TAKAHASHI A., KAWAUCHI H., DICKHOFF W. W., PLISETSKAYA E. M. Development of a homologous radioimmunoassay for coho salmon insulin-like growth factor-I. **Genral and Comparative Endocrinology**, v. 96, p. 149-161, 1994.

MORTIMORE, G. & POSO, A. Lysosomal pathways in hepatic protein degradation: regulatory role of amino acids, *Fed. Proc.* v. 43, p. 1289- 1294. 1984.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura **2011**. Brasília 2013. 60p. Available: [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL4.doc)

NADER, G.A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.37, n.10, p.1985-1996, 2005.

NEBO, C. PORTELLA, M.C.; CARANI, F. R.; ALMEIDA, F. L.; PADOVANI, C. R. CARVALHO, R. F. DAL PAI SILVA, M. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 164. 268–274. 2013.

OSTASZEWSKA, T., DABROWSKI, K., WEGNER, A. and KRAWIEC, M. The effects of feeding on muscle growth dynamics and the proliferation of myogenic cells during pike perch development (*Sander lucioperca*). *J. World Aquaculture Soc.* 39(2):184-195. 2008

PATRUNO, M., MACCATROZZO, L., FUNKENSTEIN, B., e RADAELLI, G. 2006. Cloning and expression of insulin-like growth factors I and II in the shi drum (*Umbrina cirrosa*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry e molecular biology*, v.144(2), p. 137-51. 2006.

PATRUNO, M., SIVIERI, S., POLTRONIERI, C., SACCHETTO, R., MACCATROZZO, L., MARTINELLO, T., FUNKENSTEIN, B., et al. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell and tissue research*, v. 331(3), p. 643-58. 2008.

PETER, R.E.; MARCHANT, T.A. The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture*, v. 129, p. 299– 321, 1995.

PORTELLA, M.C.; JOMORI, R. K.; LEITÃO, N. J.; MENOSSI, O. C. C.; FREITAS, T.M.; KOLIMA, J. T.; LOPES, T. S.; CLAVIJO-AYALA, J. A.; CARNEIRO, D. J. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review. *Aquaculture*.

PORTELLA, M.C.; LEITÃO, N.J.; TAKATA, R.; LOPES, T.S. Alimentação e nutrição de larvas. In: FRACALLOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. (Eds.). *Nutriaqua: Nutrição e Alimentação de Espécies de Interesse para Aquicultura Brasileira Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática*, p.185-216, 2012.

Portella, M.C., Dabrowski, K. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and digestive functions in fishes*, Science Publisher, New Hampshire, pp. 227–279. 2008.

RANA, K. J. (1985) Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return, and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry. *Aquaculture* 46, 119–131.

REINECKE M.; COLLET C The phylogeny of the insulin-like growth factors. *International Review of Cytology* 183 1–94. 1998.

RIOS, F.S.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of Fish Biology*, v.61, p.85-95, 2002.

ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: *Muscle Development and Growth*, JOHNSTON, I. A. (Ed). Academic Press, 318 p. 2001.

RUDNICKI, M. A. e JAENISCH, R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays*, v. 17, p. 203-209. 1995.

SACHECK, J.M.; OHTSUKA, A.; MCLARY, S.C.; GOLDBERG, A.L. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**. v. 287, p.591–601, 2004.

SALVESEN, G. S. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem*, v. 38,p.9-19. 2002.

SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: **Muscle Development and Growth**, Johnston, I.A. Ed. Academic Press, London, 318p, 2001.  
SEILIEZ et al. 2008

SHAN, X. J; QUAN, H. F, DOU, S. Z. Effects of delayed first feeding on growth and survival of rock bream *Oplegnathus fasciatus* larvae. *Aquaculture* 277, 14–23. 2008

SINGLETON, J.R.; BAKER, B.L.; THORBURN, A. Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signalling and potentiates myoblast apoptosis. **Endocrinology**, v.141, n.8, p.294, 2000.

SINGLETON, J.R.; BAKER, B.L.; THORBURN, A. Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signalling and potentiates myoblast apoptosis. **Endocrinology**, v.141, n.8, p.294, 2000..

SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: *Muscle Development and Growth*, Johnston, I.A. Ed. Academic Press, London, 318p, 2001.

SUMPTER, J. P.; LE BAIL, P.Y.; PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CARRAGHER, J.F. The effect os starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* v. 83, p. 94-102. 1991.

TACCHI L.; BICKERDIKE R.; SECOMBES, C.J.; MARTIN, S.A.M. Muscle-Specific RING Finger (MuRF) cDNAs in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Their Role as Regulators o Muscle Protein Degradation. **Mar Biotechnol**. v. 14, p. 35–45. 2011.

TAKATA, R. **Dietas desbalanceadas em aminoácidos indispensáveis e a adoção de estratégias na utilização de nutrientes para o pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 108 f. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

TEIXEIRA, V. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia *Rev. Bras. Reumatol.* v.52 p. 252-259. 2012.

TESSER, M.B. 2002. **Desenvolvimento do trato digestório e crescimento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) em sistemas de co-alimentação com náuplios de *Artemia* e dieta microencapsulada.** Dissertação. Caunesp. Universidade Estadual de São Paulo. Jaboticabal, Sao Paulo, Brazil, 59 pp.

TESSER, M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887), larvae with *Artemia* nauplii and a microencapsulated diet. *Journal of Applied Aquaculture* 17, n. 2, 47-59. 2005a.

TESSER, M.B., M.C. PORTELLA. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1887-1892. 2006.

UCHIDA, K., KAJIMURA, S., RILEY, L.G., HIRANO, T., AIDA, K., GRAU, E.G.. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 134, p. 429–439. 2003.

URBINATI, E.C.; GOLÇALVES, F.; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. (Org) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2010. p. 205-244.

Videler, J. J. An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. *Fish physiology and biochemistry* v. 37(2), p. 337-43. 2011.

VOGES, D., ZWICKL, P. e BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annual review of biochemistry*, v. 68, p.1015-68. 1999.

WANG, O.; ZHANG, Y.; YANG, C.; XIONG, H.; LIN, Y.;YAO, J.; LI, H.; XIE, L.; ZHAO, W.; YAO, Y.; NING, Z; ZENG, R.; XIONG, Y.; GUAN, K.; SHIMIN, Z.; ZHAO, G. Acetylation of Metabolic Enzymes Coordinates Carbon Source Utilization and Metabolic Flux. *Science*, v. 327, p. 1004-1007. 2010.

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

WATERLOW, J.C. Protein Turnover. Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing, 2006, 301 p.

WEATHERLEY, A.H. e H.S. GILL. **The Biology of Fish Growth.** London, Academic Press, 443p. 1987.

ZAMAL, H.; OLLEVIER, F. Effect of feeding and lack of food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile catfish. **Journal of Fish Biology**. v. 46, p. 404-414, 1995. ZHAO et al. 2001

ZHAO, Y.; CHEN, Y.; ROWN, J. A. Impacts of egg and larval size on survival and growth of Atlantic cod under different feeding conditions. *Journal of Fish Biology*, v. **59**, p. 569–581. 2001.