

**EXPRESSÃO DE GENES DAS VIAS ANABÓLICAS E
CATABÓLICAS E DE miRNAs NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DO *Piaractus mesopotamicus* DURANTE PERÍODO DE JEJUM E
REALIMENTAÇÃO**

TASSIANA GUTIERREZ DE PAULA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, como requisito
para obtenção do título de Doutora no Programa
de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural
e Funcional*

Prof. Dra. Maeli Dal Pai



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EXPRESSÃO DE GENES DAS VIAS ANABÓLICAS E
CATABÓLICAS E DE miRNAs NO MÚSCULO ESQUELÉTICO
DO *Piaractus mesopotamicus* DURANTE PERÍODO DE JEJUM E
REALIMENTAÇÃO**

ALUNA: TASSIANA GUTIERREZ DE PAULA

PROF. DRA. MAELI DAL PAI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, como requisito
para obtenção do título de Doutora no Programa
de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural
e Funcional*

Prof. Dra. Maeli Dal Pai

**BOTUCATU – SP
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paula, Tassiana Gutierrez de.

Expressão de genes das vias anabólicas e catabólicas e de miRNAs no músculo esquelético do *Piaractus mesopotamicus* durante período de jejum e realimentação / Tassiana Gutierrez de Paula. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maeli Dal Pai
Capes: 20100000

1. Pacu (Peixe). 2. Sistema musculoesquelético.
3. Expressão gênica. 4. Jejum. 5. Nutrição.

Palavras-chave: Crescimento muscular; Pacu; Restrição alimentar.

Dedicatória

Dedico este trabalho para duas gurias encantadoras que a Pós Graduação me deu a oportunidade de conhecer.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha querida orientadora Maeli Dal Pai, um ser humado de luz que sempre coloca os alunos como prioridade. Maeli, você é uma orientadora exemplar e, eu não canso de ressaltar o quanto eu a admiro. A você minha querida professora, educadora, orientadora e, principalmente amiga, meu muito obrigada de coração. Poucos são privilegiados como eu por ter tido a sorte de conviver com uma pessoa tão generosa, dedicada, eficiente, objetiva e diligente como à senhora. Que eu tenha sabedoria o suficiente para levar comigo todos os ensinamentos que o nosso grupo me proporcionou nesses 7 anos de convivência. Obrigada por acreditar em mim SEMPRE! Você sabe o quanto isso fez toda a diferença! O resultado desse trabalho é nosso minha eterna Pro....hehehe.

A segunda pessoa que eu gostaria de agradecer é uma gurua pequena somente na altura, porque no conhecimento, na dedicação e na vontade de aprender ela é uma gigante. Bruna Zanella, muito obrigada por ter sido meu braço direito e esquerdo nessa etapa da minha vida! Quem diria que eu seria tão privilegiada com uma aluna como você fazendo parte do meu projeto, logo eu, que sempre bati pé que não queria aluno no meu projeto de Doutorado..rs Você me surpreendeu desde a primeira semana que entrou no laboratório e me surpreende até hoje! Aprendi e aprendo muito contigo diarimente! Amo as nossas conversas científicas sobre hipóteses de algum assunto, de vias de sinalização, etc, etc. Saiba que isso tudo que vivo diariamente contigo é a minha gasolina no laboratório e Graças a VOCÊ com tantas perguntas pertinentes que me deixavam e ainda me deixam em saia justa (rs) eu tenho a oportunidade de crescer mais e mais. Afinal, “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”. OBRIGADA POR TUDO BRUNA!Tenho certeza que você terá um futuro brilhante!

Agradecimentos especiais

Ao meu querido amigo Leonardo Naz[ário de Moraes, pelas risadas, ombro amigo, carinho, paciência e pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório. Léo, você foi um irmão que Botucatu me deu para a vida toda!

Ao meu querido amigo Ivan Vechetti pelo carinho, por toda energia positiva que sempre dedica aos que estão a sua volta, por sua humildade que encanta e pelos ensinamentos (nem a distância nos deixou desconectados né!! ehehe ..foram muitos WhatsApp e Skype trocados nesses quase dois anos). Obrigada por tudo Ivan!

A marbinha (Jéssica Silvino), pelo carinho, pela pessoa alegre que anima o ambiente diariamente e pelas marmitas inesperadas (rs).

Ao colegas que já seguiram seu destino (Carlos/Violeta, Juarez e Aninha) ou estão em intercâmbio (Jason) e que marcaram muito durante sua passagem pelo laboratório, meu muito obrigada galera!!!! Vocês fazem falta na salinha de estudos até hoje na hora do café, somente na hora do café viurs

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado e financiamento desse projeto (Processo n° 2013/25915-1).

Aos meus colegas e amigos do LBME (Laboratório de Biologia do Músculo Estriado) Leonardo Nazario de Moraes, Bruna Zanella, Jéssica Silvino, Bruno Fantinatti, Erika Perez, Sara Santiloni, Grasieli de Oliveira, Bruno Duran, Rafaela Nunes, Paula Paccielli Freire e Rondi Salomão por serem a minha segunda família e por fazerem me sentir tão bem no laboratório. Obrigada pelos momentos de alegria compartilhados, pelo companheirismo, pelos agradáveis e inesquecíveis momentos de convivência.

Ao professor Dr. Robson Carvalho, por sempre ser tão prestativo, pelo incentivo e profissionalismo.

Ao pesquisador Dr. Vander Bruno dos Santos por disponibilizar o seu laboratório para a realização da parte experimental deste projeto.

Ao pesquisador Edson Mareco pelo auxílio no trabalho de campo e análise de alguns dados.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Morfologia (UNESP/IBB/Botucatu), que participaram, positivamente, na minha formação acadêmico-científica.

Aos funcionários do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu por serem prestativos e estarem sempre presentes.

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

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, torceram por mim e contribuíram para a realização desta dissertação. Como fala Vinícius de Moraes: 'Você não faz amigos, você os reconhece'. A todos esses amigos e amigas meu muito obrigada de coração.

CERTEZA...

"De tudo ficaram 3 coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

*A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar...*

Portanto devemos:

Fazer da interrupção... um novo caminho...

Da queda... um passo de dança...

Do medo... uma escada...

Do sonho... uma ponte...

Da procura... um encontro..."

Fernando Pessoa

Sumário

| | |
|---|------|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1. Organização da musculatura estriada esquelética nos peixes..... | 9 |
| 1.2. Miogênese nos peixes..... | 11 |
| 1.3. Controle molecular da miogênese..... | 14 |
| 1.4. Crescimento muscular pós-embriônico em peixes..... | 17 |
| 1.5. Controle molecular do crescimento muscular..... | 20 |
| 1.6. Catabolismo muscular..... | 21 |
| 1.6.1 Sistema ubiquina/proteassoma-autofagia/lisossoma..... | 21 |
| 1.7. Anabolismo muscular..... | 25 |
| 1.7.1. Fatores de regulação miogênica (MRFs)..... | 25 |
| 1.7.2. Via de sinalização <i>igf</i> → <i>pi3k</i> → <i>akt</i> → <i>mtor</i> | 25 |
| 1.8. MiRNAS..... | 28 |
| 1.9. Restrição alimentar e o crescimento muscular..... | 30 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 32 |
| 3. HIPÓTESE | 32 |
| 4. OBJETIVOS | 32 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS | 38 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 39 |
| 8. CAPÍTULO 1 | 1-20 |
| 8.1. Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)..... | 1-20 |

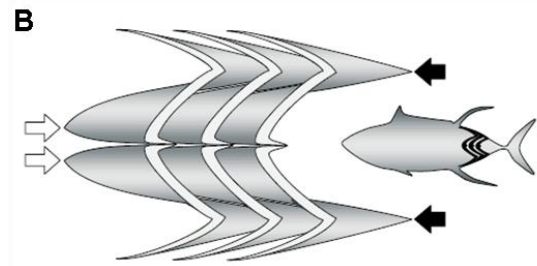
1. INTRODUÇÃO

1.1. Organização da musculatura estriada esquelética nos peixes

Nos peixes, a maior parte da massa corporal é representada pelo tecido muscular estriado esquelético que constitui de 40 a 75% do peso total do animal. Essa abundante massa muscular não representa apenas como mecanismo específico para a adaptação desses animais ao meio aquático (Bone, 1978), mas também como principal estoque de proteínas a serem utilizadas em atividades que requerem grande demanda de energia (Weatherley & Gill, 1985).

Os principais músculos locomotores, nos peixes, são representados pelos músculos esqueléticos miotomais laterais. Na maioria das espécies, a musculatura miotomal está organizada em unidades morfofuncionais, os miômeros, que se repetem ao longo do corpo do animal, e são separados por bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos (Johnston et al., 2011) (Figura 1A). Os miosseptos transmitem, por meio dos tendões, a força de contração das fibras musculares para o esqueleto axial e a nadadeira caudal, resultando na ondulação e propulsão do corpo (Sänger e Stoiber, 2001). Esse padrão de organização anatômica da musculatura maximiza a eficiência mecânica dos músculos em relação à limitada capacidade de flexões do corpo no plano lateral (Patrino et al., 1998).

Os miômeros apresentam formato em “W” e cada um contém uma região superficial, em formato de cunha, disposta imediatamente abaixo da linha lateral, onde as fibras musculares têm disposição paralela ao eixo corporal, e uma região mais profunda, com as fibras musculares apresentando disposição em hélice, formando ângulos maiores que 40° em relação ao eixo corporal (Figura 1B). Esse padrão peculiar de orientação das fibras musculares está relacionado com a necessidade de todas as fibras contraírem na mesma velocidade, qualquer que seja a sua posição dentro dos miômeros, para resultar na flexão do corpo (Alexander, 1969; Patrino et al., 1998; Sänger e Stoiber, 2001).



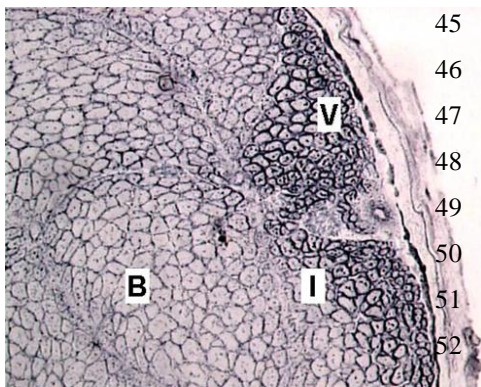
29

30 **Figura 1.(A)** Organização anatômica da musculatura estriada esquelética miotomal em miômeros,
 31 separados pelos miosseptos (imagem adaptada de <http://www.earthlife.net/fish/muscles.html>.) **(B)**
 32 Detalhe de três miômeros isolados, com formato em “W”, cada um apresentando uma região superficial
 33 (setas brancas) e profunda (setas em preto) (Katz, 2002).

34

35 Nos peixes, a extensão da força de contração da musculatura estriada
 36 esquelética é variável, dependendo do tipo de movimento executado, como
 37 movimentos sustentados ou de alta velocidade. Devido a essa capacidade funcional do
 38 sistema muscular, a musculatura estriada esquelética apresenta-se organizada em
 39 compartimentos ou camadas, contendo diferentes tipos de fibras musculares que
 40 possuem diferentes velocidades de contração (Rome et al., 1988; Sanger e Stoiber,
 41 2001). Os diferentes tipos de fibras musculares apresentam-se organizados nos
 42 compartimentos vermelho (superficial), intermediario e branco (profundo) (van
 43 Raamsdonk et al.,1978, 1980; Johnston, 1981) (Figura 2).

44



45 **Figura 2.** Corte transversal da musculatura estriada
 46 esquelética da tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).
 47 Compartimento vermelho superficial (V),
 48 compartimento intermediario (I) e compartimento branco
 49 profundo (B). Reaçao NADH-TR (nicotinamida-
 50 adenina-dinucleotideo-reduzido-tetrazolio-redutase)
 51 (Aguiar et al., 2005).

52
53

54 O compartimento vermelho, normalmente, corresponde a menos de 10% e
 55 nunca excede 30% de toda a musculatura miotomal (Greer-Walker e Pull, 1975;
 56 Sanger e Stoiber, 2001). Pode estar localizado na região subdermal, como uma camada
 57 fina e uniforme ao longo de todo o corpo do animal (Egginton e Johnston, 1982; Dal
 58 Pai-Silva et al., 1995) ou apresentar distribuio mais localizada, aparecendo somente
 59 na região do nervo da linha lateral, onde assume aspecto triangular (Hoyle et al., 1986;

60 Sanger e Stoiber, 2001). Esse compartimento  constituído por fibras musculares
61 vermelhas, de contrao lenta e metabolismo oxidativo. As fibras vermelhas
62 apresentam pequeno diâmetro (entre 25 e 45 μm), excelente suprimento sanguíneo,
63 grande concentrao de mioglobina, grande quantidade de mitocôndrias (na região
64 subsarcolemal e entre as miofibrilas) e muitas gotículas de lipídios (Bone, 1978;
65 Johnston, 1981; Sanger e Stoiber, 2001). As fibras vermelhas são recrutadas durante a
66 realizao de movimentos lentos e de sustento, como a migrao (Johnston et al.,
67 1977; Bone, 1978).

68 O compartimento branco corresponde de 70 a 90% do volume total do tecido
69 muscular (Weatherley e Gill, 1989; Kilarski, 1990).  formado por fibras musculares
70 brancas, de contrao rápida e metabolismo glicolítico (Driedzic e Hochachka, 1976).
71 Quando comparadas às fibras vermelhas, as fibras brancas apresentam maiores
72 diâmetros (entre 50 e 100 μm), menor suprimento sanguíneo, baixa concentrao de
73 mioglobina, poucas mitocôndrias e poucas gotículas de lipídios (Driedzic e
74 Hochachka, 1976; Bone, 1978; Sanger e Stoiber, 2001). Esse tipo de musculatura 
75 recrutada nos movimentos bruscos de natao, como a captura de alimento e fuga de
76 predadores (Johnston et al., 1977; Bone, 1978). Esse compartimento apresenta
77 importância na aquicultura, constituindo a principal parte comestível dos peixes
78 (Zhang et al., 1996). O aumento no tamanho corporal desses animais ocorre,
79 principalmente, devido ao crescimento das fibras musculares brancas (Zimmerman e
80 Lowery, 1999).

81 Entre os compartimentos vermelho e branco, encontra-se o compartimento
82 intermediário (musculatura intermediária), com fibras que apresentam propriedades
83 morfofisiológicas intermediárias entre as das fibras musculares brancas e vermelhas,
84 como contrao rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (Johnston et al., 1977;
85 Sanger e Stoiber, 2001).

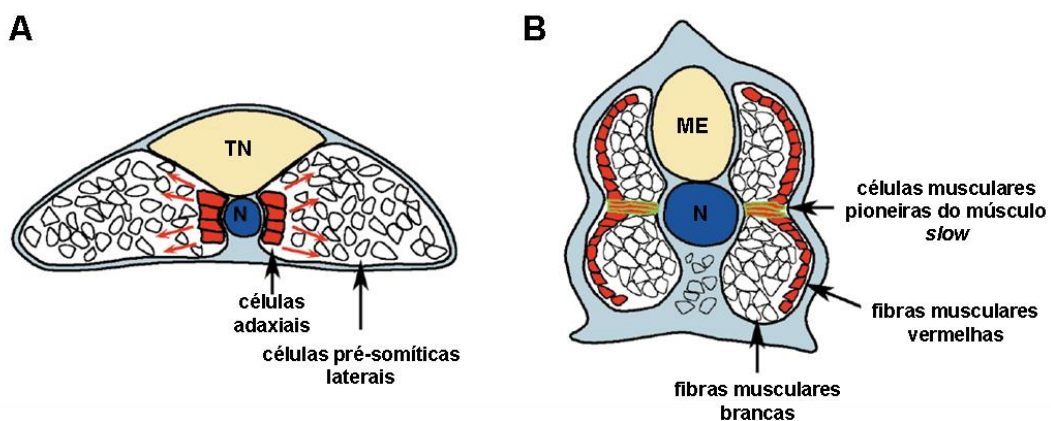
86

87 **1.2. Miogênese nos peixes**

88 A embriogênese do tecido muscular estriado esquelético, ocorre a partir do
89 mesoderma paraxial que sofre segmentao, na direo rostro-caudal do embrião,
90 formando os somitos, localizados lateralmente  notocorda e ao tubo neural. Cada
91 somito  subdividido nas regiões esclerótomo, miótomo e dermtomo, cada uma
92 contendo tipos celulares específicos (Devoto et al., 1996; Currie e Ingham, 2001). A
93 porão ventromedial do somito, o esclerótomo, dará origem ao esqueleto axial do
94 embrião. O dermtomo, de localizao dorsal, formar a derme, enquanto o miótomo,

95 originará os músculos do tronco e da cauda (Devoto et al., 1996; Currie e Ingham,
96 2001). Nos peixes, o esclerótomo é reduzido, pois, no ambiente aquático, o animal
97 apresenta maior facilidade em sustentar o peso do corpo. Dessa forma, a maior parte
98 do somito é constituída pelo miótomo (Bone, 1966; Currie e Ingham, 2001).

99 Nos miótomos, a população de células mesodérmicas dispõe-se em uma única
100 camada que flanqueia ambos os lados da notocorda. Pela morfologia e padrão de
101 expressão gênica, essas células são denominadas células adaxiais, células musculares
102 não-pioneiras do músculo *slow* ou mioblastos *slow* (Devoto et al., 1996; Currie e
103 Ingham, 2001). Sob o estímulo de glicoproteínas secretadas pela notocorda e pelo tubo
104 neural (Blagden et al., 1997), essas células sofrem alongamento e migram radialmente
105 em direção à superfície do miótomo, formando a monocamada de células musculares
106 localizadas logo abaixo da epiderme. As células adaxiais fundem-se umas às outras,
107 formando miotubos que se diferenciam em fibras musculares vermelhas, originando a
108 musculatura vermelha. Uma subpopulação de células adaxiais, denominadas células
109 musculares pioneiras do músculo *slow*, emite processos citoplasmáticos que as
110 mantêm conectadas à notocorda, possivelmente para orientar a migração das demais
111 células adaxiais em direção à superfície do miótomo (Devoto et al., 1996; Du et al.,
112 1997; Currie e Ingham, 2001). Nessa região medial, forma-se a estrutura especializada,
113 o miossepto horizontal, que divide o miótomo nas regiões ventral (hipoaxial) e dorsal
114 (epiaxial) (Bone, 1989). As demais células do miótomo, conhecidas como células
115 laterais pré-somíticas ou mioblastos *fast*, fundem-se para formar miotubos, dando
116 origem ao compartimento de músculo branco do embrião (Devoto et al., 1996; Du et
117 al., 1997; Currie e Ingham, 2001) (Figura 3).



118

119

120 **Figura 3.** Esquemas de secções transversais do embrião de *zebrafish* durante a miogênese. (A) Células
121 adaxiais flanqueiam a notocorda (N) e células pré-somíticas laterais apresentam disposição lateral em
122 relação às células adaxiais. As setas vermelhas indicam que as células adaxiais migrarão, entre as

123 células laterais pré-somáticas, em direção à superfície do miótomo. (B) Embrião de 24 horas. As células
124 adaxiais, localizadas na periferia do miótomo, dão origem às fibras musculares vermelhas. As células
125 musculares pioneiras do músculo *slow* adquiriram formato achatado durante o contato com a notocorda
126 e a superfície lateral do miótomo. Nessa região, será formado o miossepto horizontal, dividindo o
127 miótomo nas regiões hipo (ventral) e epiaxial (dorsal). As fibras musculares brancas estão localizadas
128 mais profundamente no miótomo. TN: tubo neural, N: notocorda, ME: medula espinhal (Du et al,
129 1997).

130

131 Durante a miogênese, as células precursoras miogênicas se diferenciam em
132 mioblastos, proliferam e fundem-se formando miotubos. Esses miotubos possuem um
133 ou mais núcleos em posição central, miofibrilas em posição periférica e características
134 morfológicas e fisiológicas próprias (Johnston et al., 1995; Johnston, 1999). Nos
135 miotubos, ocorre a organização das proteínas que irão constituir a unidade contrátil do
136 músculo, o sarcômero (Huxley, 1969, 1971).

137 Durante a diferenciação dos miotubos, ocorre a organização dos sarcômeros da
138 periferia em direção ao centro desse miotubo, enquanto os núcleos migram do centro
139 para a periferia e as miofibrilas passam a ocupar quase todo o sarcoplasma (Sänger et
140 al., 1990, Sänger, 1992). Paralelamente, ocorre o desenvolvimento do sistema de
141 membranas constituído por túbulos T e retículo sarcoplasmático, ambos envolvidos no
142 processo de contração muscular. Ao final desses processos, o miotubo passa a ser
143 chamado de fibra muscular adulta (Figura 4) (Schiaffino e Margreth, 1969; Kelly,
144 1971; Flutcher et al., 1992).

145

146

147

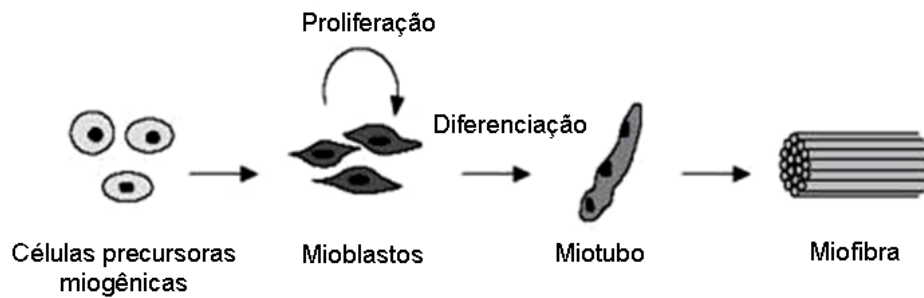
148

149

150

151

152



153 **Figura 4.** Esquema mostrando a formação de uma fibra muscular (miofibrila) durante a miogênese.
154 Células precursoras miogênicas, presentes nos somitos, tornam-se mioblastos, que iniciam a
155 proliferação formando um miotubo maduro/ fibra muscular adulta (adaptado de Watabe, 1999).

156

157

1.3. Controle molecular da Miogênese

158

159

160

161

162

163

164

165

166

Todos os eventos da miogênese são iniciados e controlados pela expressão diferencial de fatores transcricionais conhecidos como os fatores de regulação miogênica (*myogenic regulatory factors* ou MRFs), dos quais fazem parte a MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Weintraub, 1993; Watabe, 1999, 2001). Os MRFs compartilham um domínio altamente conservado, conhecido como *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH), que apresenta 80% de similaridade na sua sequência de aminoácidos (Edmonson e Olson, 1993). A região *Helix-Loop-Helix* é caracterizada por duas α -hélices separadas por um *loop*. A região básica (*basic*) compreende a extensão de uma das α -hélices da região HLH (Cole et al, 2004).

167

168

169

170

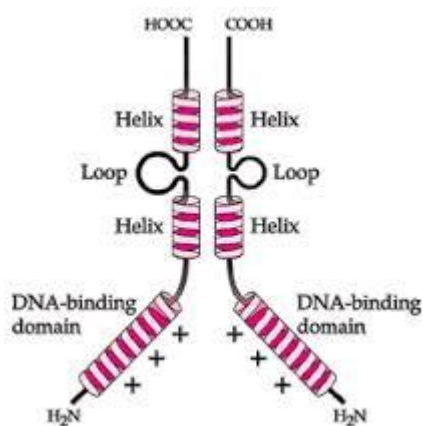
171

172

173

174

Os MRFs reconhecem, por meio de seu domínio básico, a sequência consenso no DNA conhecida como E-box (5'-CANNTG-3'), presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989; Blackwell e Weintraub1990). A região *Helix-Loop-Helix* dos MRFs constitui o domínio de ligação dessa molécula com proteínas E, como E12 e E47 (Murre et al., 1989). A ligação do heterodímero MRF-proteína E ou de homodímeros dos MRFs à sequência E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, determinando sua expressão (Murre et al., 1989, 1994; Lassar et al., 1991) (Figura 5).



175

176 **Figura 5.** Estrutura do complexo formado pelo dímero do fator transcricional da família *basic Helix-*
 177 *Loop-Helix* (bHLH) (Ma *et al.*, 1994).

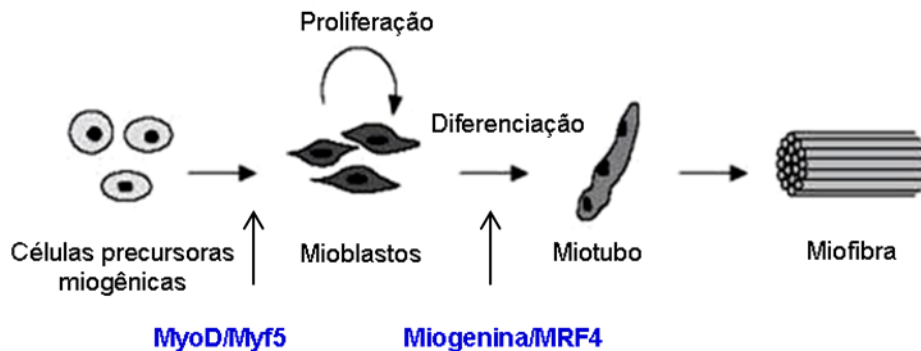
178

179 Em várias espécies de peixes, muitos estudos têm caracterizado as sequências
 180 codificantes completas dos RNAs mensageiros (RNAm) referentes à MyoD e à
 181 miogenina. Essas sequências apresentam alta similaridade com as mesmas sequências
 182 descritas em outras espécies de vertebrados, principalmente em relação ao domínio de
 183 ligação ao DNA bHLH. Na espécie *Cyprinus carpio* (carpa), a sequência nucleotídica
 184 completa da MyoD apresenta 93, 81, 73 e 71% de similaridade com a MyoD de *Danio*
 185 *rerio* (zebrafish) (Weinberg *et al.*, 1996), *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris)
 186 (Rescan *et al.*, 1994), *Xenopus embryos* (sapo) (Hopwood *et al.*, 1989) e *Gallus gallus*
 187 (galinha) (Lin *et al.*, 1989), respectivamente. A sequência nucleotídica completa da
 188 miogenina apresenta 69, 55 e 51% de similaridade com a miogenina da truta arco-íris
 189 (Rescan *et al.*, 1995), galinha (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1990) e *Mus musculus*
 190 (camundongo) (Edmondson *et al.*, 1994), respectivamente. A comparação da
 191 sequência de aminoácidos dos MRFs da carpa com a de outros vertebrados mostrou
 192 que a sequência da MyoD é mais conservada que a da miogenina, inclusive em relação
 193 ao domínio bHLH (Kobiyama *et al.*, 1998). No Laboratório de Biologia do Músculo
 194 Estriado (LBME), Departamento de Morfologia, UNESP-Botucatu, foram obtidas as
 195 sequências nucleotídicas referentes à MyoD e miogenina expressas no músculo
 196 estriado esquelético do pacu através do Transcriptoma (European Nucleotide Archive
 197 número de acesso: PRJEB6656). Essas sequências apresentaram alta similaridade com
 198 as mesmas sequências descritas em outras espécies de vertebrados, incluindo
 199 teleósteos.

200

201 Durante a miogênese, o programa miogênico é sinalizado pela expressão dos
 202 MRFs (Currie e Ingham, 2001). A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores
 primários, sendo expressos na fase de proliferação dos mioblastos, enquanto os fatores

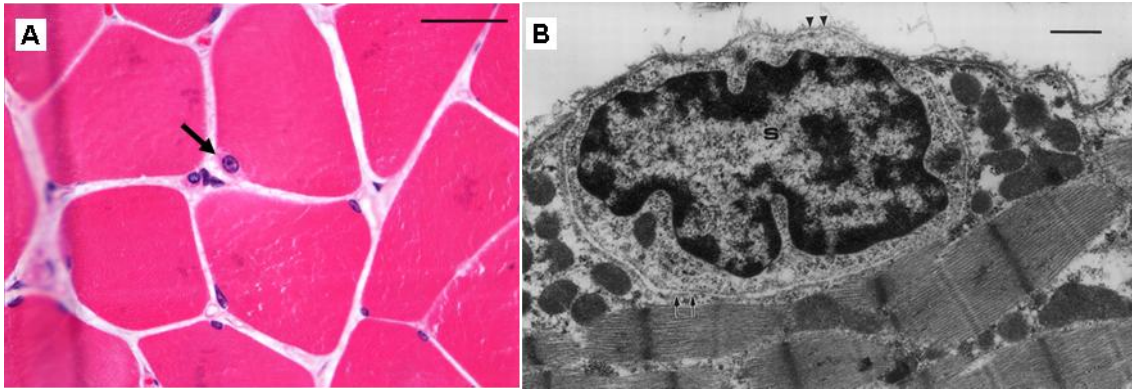
203 secundários, miogenina e MRF4, são expressos em mioblastos nas fases de fusão e
 204 diferenciação em fibras musculares maduras (Megeny e Rudnicki, 1995; Rudnicki e
 205 Jaenisch, 1995; Watabe, 1999) (Figura 6).



206
 207 **Figura 6.** Esquema mostrando a formação da fibra muscular (miofibra) durante a miogênese, sob o
 208 controle dos fatores de regulação miogênica. Células precursoras miogênicas, presentes nos somitos,
 209 tornam-se mioblastos, que iniciam a proliferação. Esses eventos são controlados pela expressão dos
 210 MRFs primários MyoD e Myf-5. A expressão de miogenina e MRF4 controla a diferenciação dos
 211 mioblastos em miotubos que, posteriormente, diferenciam-se para formar as miofibras maduras
 212 (adaptado de Watabe, 1999).

213
 214 Durante o desenvolvimento embrionário, o padrão de expressão dos MRFs, nas
 215 células precursoras miogênicas do músculo estriado esquelético, é variável de acordo
 216 com a espécie considerada (Watabe, 2001). Por exemplo, em camundongos (*Mus*
 217 *musculus*), o primeiro MRF a ser expresso é o Myf-5, seguido pela expressão
 218 sequencial da miogenina, MyoD e MRF4 (Ott et al., 1991). Na codorna (*Coturnix* sp.),
 219 o primeiro MRF a ser expresso é a MyoD, seguido pela expressão de Myf-5 e, por
 220 último, de miogenina (Pownall e Emerson, 1992). No *zebrafish* (*Danio rerio*),
 221 diferentemente do observado em camundongos, a expressão de MyoD antecede a de
 222 miogenina (Ticho et al., 1996). Na carpa, o padrão de expressão dos MRFs é
 223 semelhante ao descrito em *zebrafish* e codornas (Kobiyama et al., 1998).

224 Alguns mioblastos não se fundem durante o processo da miogênese,
 225 permanecendo como células indiferenciadas no tecido muscular. Esse tipo celular é
 226 referido como mioblasto adulto ou célula satélite (Mauro, 1961). Nos mamíferos, essas
 227 células quiescentes estão localizadas na periferia da fibra muscular, entre a lâmina
 228 basal e o sarcolema (Campion, 1984). Apresentam pequeno tamanho (menores que 5
 229 μm), com citoplasma reduzido e núcleo contendo grande quantidade de
 230 heterocromatina (Campion, 1984) (Figura 7).



231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

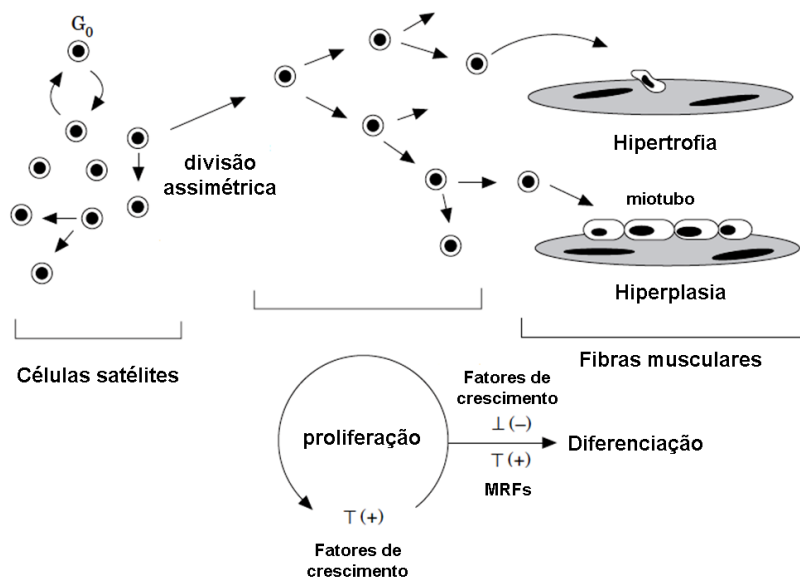
258

Figura 7. (A) Secção transversal de músculo estriado esquelético de rato, mostrando uma célula satélite (seta), na periferia da fibra muscular. Coloração: hematoxilina-eosina. Barra: 50 μ m (Fonte: coleção didática do Departamento de Morfologia, UNESP, Botucatu/SP). (B) Eletromicrografia de uma célula satélite (S) associada a uma fibra muscular estriada esquelética. Notar a grande quantidade de heterocromatina no núcleo da célula satélite, indicando sua quiescência. A célula satélite está localizada entre o sarcolema e a lâmina basal da fibra muscular. Barra: 1 μ m (eletromicrografia obtida de Sinha-Hikim et al., 2003).

Nos mamíferos, as células satélites estão uniformemente distribuídas ao longo da fibra muscular (Campion, 1984), enquanto, nos peixes, geralmente estão concentradas em múltiplos locais da fibra muscular (Koumans et al, 1991; Fauconneau e Paboeuf, 2001). Em algumas espécies de peixes, durante as fases de crescimento larval e juvenil, as células satélites também podem ser observadas no tecido conjuntivo do endomísio, entre as fibras musculares já diferenciadas (Veggetti et al., 1990; Koumans e Akster, 1995; Stoiber e Sängner, 1996; Fauconneau e Paboeuf, 2001).

1.4. Crescimento muscular pós-embrionário em peixes

O crescimento pós-embrionário da musculatura estriada esquelética em peixes é dependente da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites, que são responsáveis pelos mecanismos de crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans e Akster, 1995). Na hiperplasia, a fusão entre células satélites ativadas resulta na formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em novas fibras musculares. Na hipertrofia, as células satélites ativadas fundem-se com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, determinando o aumento na área da fibra muscular (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowlerson e Veggetti, 2001) (Figura 8).



259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

Figura 8. Esquema mostrando o crescimento pós-embriônico hipertrófico e hiperplásico das fibras musculares, em peixes, a partir das células satélites. As células satélites são quiescentes e indiferenciadas, permanecendo na fase G₀ do ciclo celular. Quando ativadas, sofrem divisão celular assimétrica, sendo que uma célula-filha continua indiferenciada para manter constante o número de células satélites quiescentes na fibra muscular e, a outra célula-filha, torna-se comprometida com a diferenciação e o crescimento muscular. As células satélites ativadas podem sofrer fusão a uma fibra muscular existente, caracterizando a hipertrofia, ou podem fundir-se a outras células satélites, na superfície da fibra muscular, formando um miotubo que se diferencia em uma nova fibra muscular, caracterizando a hiperplasia. A proliferação e diferenciação das células satélites ocorrem sob o controle da expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs) e de fatores de crescimento (adaptado de Johnston, 1999).

O crescimento muscular hiperplásico ocorre em duas fases sucessivas. A primeira fase, denominada hiperplasia estratificada, é continuação da miogênese embrionária e ocorre no final do desenvolvimento embrionário e durante todo o período larval da maioria das espécies de peixes. Esse tipo de hiperplasia inicia-se com a formação de novas fibras musculares em zonas de proliferação de mioblastos, localizadas imediatamente abaixo da monocamada de fibras vermelhas e estendendo-se dorsalmente do septo horizontal até o ápice do miótomo (Figura 9A). A hiperplasia estratificada resulta no espessamento dos três compartimentos musculares (Rowlerson e Veggetti, 2001).

Após o período larval, inicia-se a segunda fase de hiperplasia, denominada hiperplasia em mosaico, sendo que a formação de novas fibras musculares não é mais restrita às zonas de proliferação de mioblastos, mas ocorre por toda a extensão do miótomo a partir da proliferação, fusão e diferenciação das células satélites. Quando

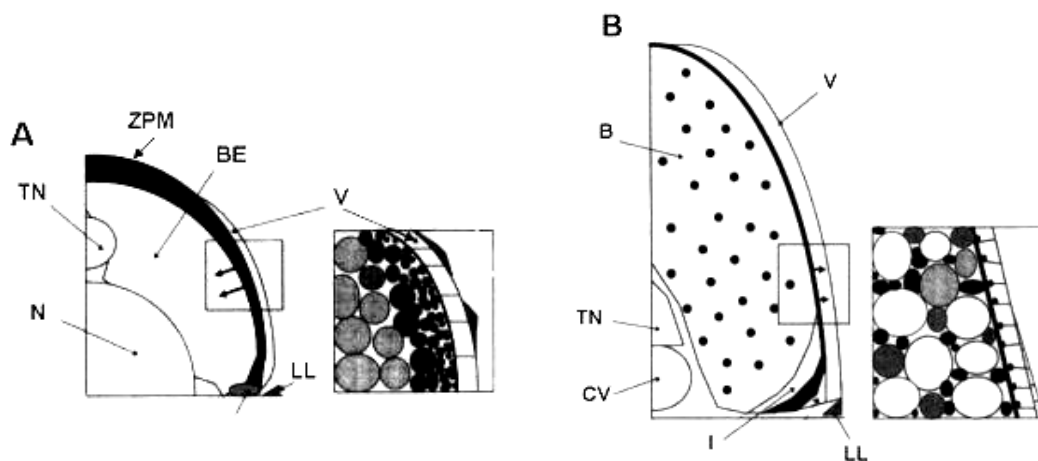
285 esse tipo de hiperplasia está ocorrendo, observa-se, em cortes transversais do músculo
 286 esquelético, um mosaico de fibras de diferentes tamanhos e estágios de diferenciação,
 287 melhor observado na musculatura branca (Johnston, 1999; Rowleron e Veggetti,
 288 2001) (Figura 9B). A hiperplasia em mosaico ocorre, principalmente, durante o
 289 período juvenil e contribui para o crescimento muscular de espécies de peixes de
 290 interesse comercial na aquicultura, como aquelas que atingem grande tamanho final
 291 (Rowleron e Veggetti, 2001).

292

293).

294

295



296

297 **Figura 9.** Representação esquemática da hiperplasia estratificada (A) e hiperplasia em mosaico (B)
 298 durante o crescimento da musculatura estriada esquelética. (A) Na hiperplasia estratificada, novas fibras
 299 musculares são formadas a partir das zonas de proliferação de mioblastos (ZPM), resultando no
 300 espessamento dos compartimentos musculares (detalhe à direita). (B) Na hiperplasia em mosaico, novas
 301 fibras musculares originam-se por todo o miótomo, a partir das células satélites, resultando em um
 302 mosaico de fibras de diferentes tamanhos (detalhe à direita). Abreviações: TN = Tubo neural, N =
 303 notocorda, BE = fibras musculares brancas embrionárias, V = monocamada de fibras musculares
 304 vermelhas, LL = linha lateral, CV = Coluna vertebral, B = fibras musculares brancas, I = fibras
 305 musculares intermediárias (Rowleron e Veggetti, 2001).

306

307 Entre todos os vertebrados, os peixes apresentam característica peculiar,
308 principalmente em relação ao crescimento muscular. Com poucas exceções, muitas
309 espécies de peixes tendem a apresentar crescimento indeterminado, pois a hiperplasia
310 e a hipertrofia contribuem por todo o período de crescimento pós-embriônico da
311 musculatura estriada esquelética (Mommsen, 2001). Diferentemente, na maioria dos
312 outros vertebrados, o crescimento muscular pós-natal ocorre exclusivamente por
313 hipertrofia. Nos mamíferos, por exemplo, a hiperplasia cessa em um curto período
314 após o desenvolvimento embrionário (Mommsen, 2001; Rowleron e Veggetti, 2001).

315 Nos peixes, as contribuições da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento
316 muscular são variáveis, dependendo da fase de crescimento e da espécie considerada.
317 Nas espécies que atingem tamanho final de poucos centímetros, o crescimento
318 muscular envolve, principalmente, a hipertrofia de fibras formadas nas fases iniciais da
319 embriogênese e o período de crescimento hiperplásico é mais curto. Nas espécies que
320 atingem tamanho final maior, como aquelas de interesse para a aquicultura, novas
321 fibras musculares são continuamente recrutadas em todas as fases do crescimento
322 (Weatherley et al., 1988; Alami-Durante et al., 1997; Rowleron e Veggetti, 2001).

323 Muitos trabalhos têm mostrado que a contribuição da hiperplasia para o
324 crescimento muscular diminui com a idade (Alfei et al., 1994; Almeida et al., 2008,
325 2010). Alguns estudos sugerem que a hiperplasia cessa quando o animal atinge 44%
326 do seu tamanho final, podendo variar de acordo com a espécie; a partir desse período,
327 o crescimento muscular ocorre por hipertrofia das fibras musculares (Johnston et al.,
328 2003; Weatherley et al., 1988; Zimmerman e Lowery, 1999). Entretanto, em termos
329 comerciais, para a maioria das espécies na aquicultura, não há tamanho final fixo e
330 determinado. Alguns trabalhos desenvolvidos no Laboratório (LBME/IBB/Depto
331 Morfologia), têm caracterizado as contribuições da hiperplasia e hipertrofia para o
332 crescimento muscular do pacu. Nessa espécie, a hiperplasia e a hipertrofia são
333 observadas durante todo o período de crescimento, sendo registrada hiperplasia mais
334 intensa na fase alevinos/juvenil e a hipertrofia, na fase juvenil/adulta (Dal Pai., et al.,
335 2000; Dal Pai Silva et al., 2003; Almeida et al., 2008, 2010, Duran et al., 2016).

336

337 **1.5. Controle molecular do crescimento muscular**

338 Durante o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura, é observada
339 a retomada dos eventos ocorridos durante a miogênese. Por outro lado, todo esse
340 processo, bem como a manutenção do fenótipo muscular é controlado positiva e
341 negativamente pela ativação ou inibição de vias de sinalização, responsáveis pelo

342 controle da atividade das vias catabólicas e anabólicas do tecido muscular (Bonaldo e
343 Sandri, 2013; Johnston et al., 2011). Entre as moléculas que desempenham papel
344 crucial na miogênese, no crescimento e manutenção da massa muscular, pode-se
345 destacar os componentes envolvidos com as vias do catabolismo (*atg12* (*Ubiquitin-*
346 *Like Protein/Autophagy Related 12*), *bcl2* (*Apoptosis Regulator*), *fbxo25* (*F-Box*
347 *Protein 25/ubiquitin protein*), *mafbx* (*Muscle Atrophy F-box or atrogen*),
348 *murf1A/murf1B* (*Muscle Ring Finger protein-1*)), anabolismo (*myod* (*Myogenic*
349 *Differentiation*), *miogenina* (*Myogenic Factor*), *igf-I* (*insulin-like growth factor-I*),
350 *pik3* (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*), *mtor* (*Mechanistic Target Of Rapamycin Of*
351 *MTOR Complex 1*), *raptor* (*Regulatory Associated Protein Of MTOR Complex 1*),
352 *mlst8* (*MTOR Associated Protein Subunit Of MTOR Complex 1*) e metabolismo
353 energético (*sdha* (*Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A*), *pgc1-α*
354 (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha*), *pparβ/δa*
355 (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta A*), *pparβ/δb* (*Peroxisome*
356 *Proliferator Activated Receptor Delta B*).

357

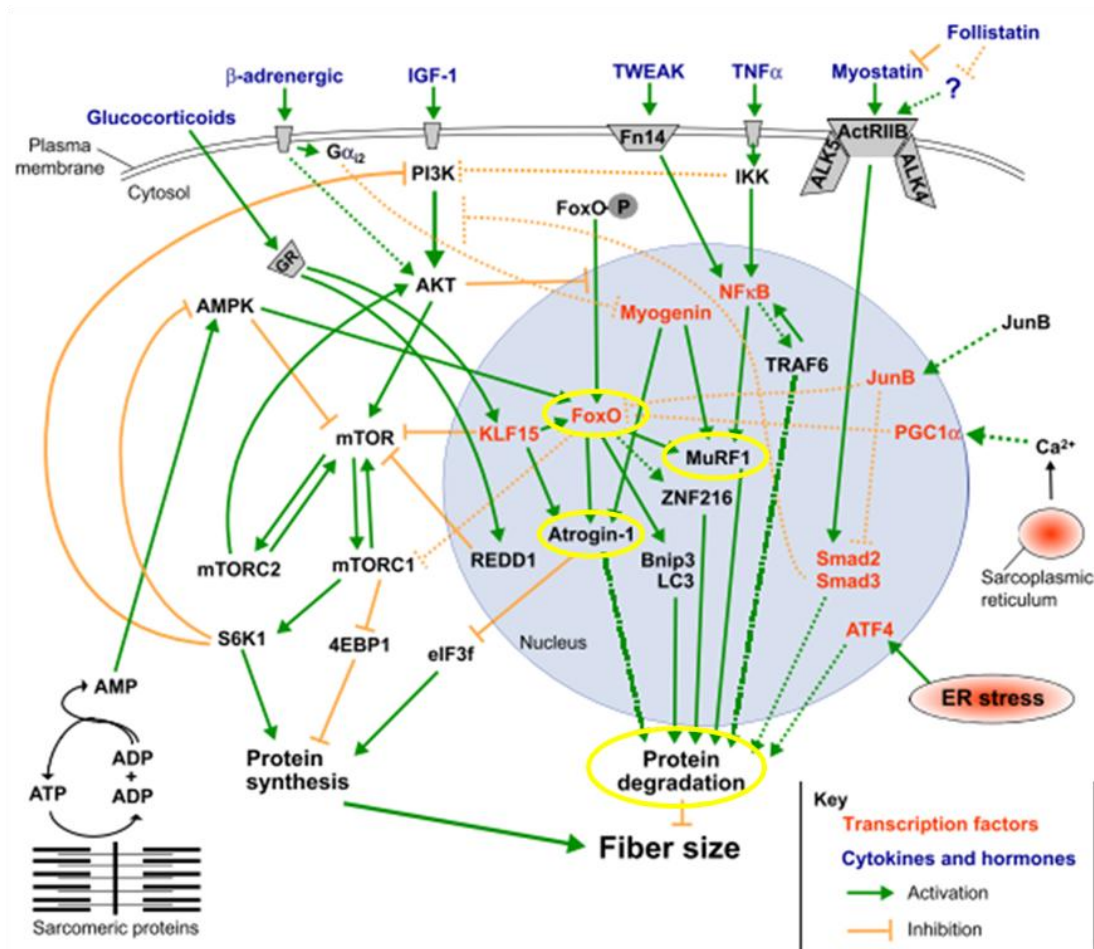
358 **1.6. Catabolismo muscular**

359

360 **1.6.1 Sistema ubiquina/proteassoma-autofagia/lisossoma**

361 O catabolismo proteico na musculatura esquelética em peixes, pode ser
362 desencadeado por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, como a qualidade da água,
363 temperatura, estágio de desenvolvimento, distribuição geográfica e a disponibilidade
364 de alimentos (Johnston et al., 2011). Situações de estresse ativam o sistema
365 proteolítico ubiquitina-proteassoma (USP- ubiquitin proteasome system),
366 particularmente as ubiquitinas-ligases (Bower et al., 2010; Fuentes et al., 2012) e a via
367 da autofagia (Seiliez et al., 2008)

368 O sistema USP é constituído por ubiquitinas ativadoras de enzimas (E1),
369 ubiquitinas transportadoras de proteína (E2) e ubiquitinas de conjugação de enzimas
370 (E3 ubiquitina ligases), responsáveis pelo reconhecimento, ubiquitinação e degradação
371 de proteínas musculares (Fuentes et al., 2012). Dentre as USPs pode-se destacar *murf*,
372 *fbxo25* e *mafbx* (Fuentes et al., 2012), genes importantes pela participação no controle
373 do turnover proteico e manutenção da função do músculo esquelético (Sarbasov et al.,
374 2005; Wullschleger et al., 2006) (Figura 10).



375
 376 **Figura 10.** Representação esquemática das principais vias de sinalização que controlam o tamanho da
 377 fibra muscular. É possível observar a atividade da via Ubiquina/Proteassoma (*murf*, *foxo*, *atrogin-*
 378 *1/mafbx*) durante a degradação proteica e da via *mtorc1* durante a síntese proteica (Bonaldo e Sandri,
 379 2013).

380

381 A degradação proteica via Sistema Ubiquina/Proteassoma se inicia com a
 382 ligação das proteínas a serem degradadas a cadeia de moléculas de ubiquitinas,
 383 processo denominado ubiquitinação, mediado por enzimas E3 ubiquitina-ligases,
 384 responsáveis por catalisar a transferência das proteínas da forma ativa da molécula de
 385 ubiquitina para a molécula de ubiquitina carreadora (classificada como E2);
 386 posteriormente essas proteínas são carreadas até o proteassoma 26S onde são
 387 degradadas (Bower & Johnston, 2010; Fuentes, et al., 2012; Tacchi et al., 2010;
 388 Tacchi, e tal., 2012).

389 Sabe-se que em peixes os níveis de expressão dos genes catabólicos como
 390 *mafbx*, *fbxo25* e *murf*, normalmente, aumentam significativamente durante o período
 391 de jejum e diminuem após a fase de realimentação (Cleveland e Evenhuis, 2010;
 392 Fuentes et al., 2012; Cleveland e Weber, 2013). No entanto, os níveis de expressão
 393 podem variar de acordo com a espécie estudada e o tempo de jejum

394 considerado (Cleveland e Evenhuis, 2010; Fuentes et al., 2012; Cleveland e Weber,
395 2013)

396

397 Estudos têm demonstrado que a atividade dos genes catabólicos pode ser
398 modulada por fatores transcricionais por ações diretas ou indiretas por meio da
399 interação com outros fatores transcricionais como o *pgc1 α* (do inglês: peroxisome
400 proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha), cofator essencial para a
401 biogênese mitocondrial, como estratégia de suporte energético, via aumento do
402 número de mitocôndrias e síntese de ATP (Fuentes et al., 2013). Acredita-se que a
403 manutenção de altos níveis de *pgc1 α* durante condições catabólicas ocorra como
404 possível adaptação do animal na tentativa de manter os processos metabólicos basais
405 do tecido em situações de desequilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo muscular (
406 Wende et al., 2005; Puigserver et al., 2003).

407 Além desse mecanismo, outros sistemas de proteólise, tais como a via da
408 autofagia são ativados para a degradação de proteínas musculares (Yamano et al.,
409 2016).

410 A autofagia, considerada via de degradação de componentes celulares não
411 seletiva, é um sistema de reciclagem intracelular que desempenha papéis importantes
412 na manutenção da homeostase do músculo esquelético (Kim et al., 2011; Fuentes et
413 al., 2012). Durante condições de estresse, o aumento nos níveis da autofagia é
414 importante para que as células se adaptem às mudanças nutricionais e energéticas
415 exigidas (Kim et al., 2011; Fuentes et al., 2012). No entanto, a ativação excessiva
416 dessa via, pode promover a morte celular (Kim et al., 2011; Fuentes et al., 2012). O
417 *bcl2* é uma proteína anti-autofágica e anti-apoptótica que interage com as proteínas
418 pro-apoptóticas e pró-autofágicas em condições de limitação nutricional, evitando a
419 apoptose do tecido muscular. He et al., (2012), descreveram em ratos mutantes para
420 *bcl2* (um modelo de exercício/jejum), aumento nos níveis autofágicos do tecido
421 muscular. Em mamíferos, é descrito e já estabelecido um controle pós transcricional
422 da via autofágica, por meio da sua inibição com a ativação do complexo *mtorc1*
423 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) (Figura 10) (Seiliez et al., 2008b; Kim et
424 al., 2011; Valente et al., 2012; Fuentes et al., 2013). A *mtorc* é componente constituído
425 por dois complexos, *mtorc1* (formado por *mtor*, *mlst8* e *raptor*) e *mtorc2* (formado
426 por *mtor*, *mlst8* e *rictor*) (Nobukuni et al., 2005; Bower et al., 2008). A ativação dos
427 complexos *mtorc* resulta na regulação de genes-chave que induzem o ganho de massa
428 muscular (Sarbasov et al., 2006). Sob condições basais, *mtorc1* inibe a proteína *ulkl*

429 (*Like Autophagy Activating Kinase 1*), quinase envolvida na via da autofagia em
430 resposta a restrição alimentar. Jamart et al., (2013) estudaram o complexo *ulk1* em
431 ratos submetidos a um período de jejum e exercício e observaram que a ativação do
432 complexo *ulk1* depende da inibição do complexo *mtorc1*, o que também foi observado
433 por Desgeorges et al., (2014) em cultura celular (C2C12) sob condições de restrição
434 alimentar.
435

436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467

1.7. Anabolismo muscular

1.7.1. Fatores de regulação miogênica (MRFs)

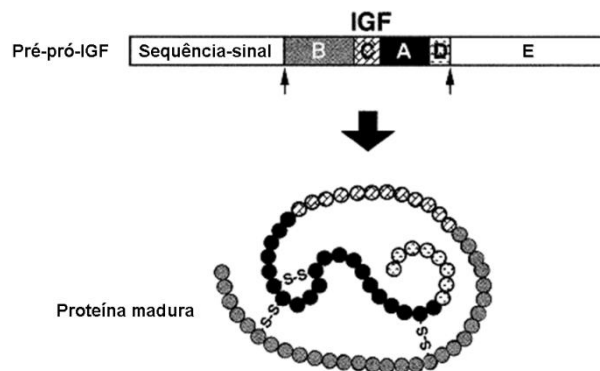
Nos peixes, o crescimento pós-natal da musculatura ocorre pela ativação e proliferação das células satélites, eventos iniciados e controlados pela expressão diferencial de diversos fatores, entre eles os fatores transcricionais músculo-específicos, os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs): *myod*, *miogenina*, *myf5* e *mrf4* (Rescan, 2001).

A *myod* e o *myf5* são conhecidos como fatores primários, sendo expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a de diferenciação, enquanto que a *miogenina* e o *mrf4* são expressos em células na fase de fusão e diferenciação em fibras musculares imaturas (Megenev & Rudnicki, 1995; Watabe, 1999).

1.7.2. Via de sinalização *igf* → *pi3k* → *akt* → *mtor*

A via do *igf-I* tem sido descrita como uma das principais vias envolvidas no crescimento muscular (Schiaffino et al., 2013). A interação do *igf-I* (*insulin like growth factor I*) ao seu receptor leva à estimulação da síntese proteica por meio da ativação de *pi3k* (*phosphatidylinositol-3 kinase*), que promove um sítio de ligação à membrana para *akt* (*serine-threonine kinase*). Quando ativa, essa quinase leva a fosforilação de *mtor* (*mammalian target of rapamycin*) que atua estimulando a síntese proteica pela ativação da proteína *p70s6k* (Schiaffino et al., 2013). O sistema *igf*, constituído pelos *igfs* (*I e II*), seus receptores e pelas proteínas de ligação ao *igf* (*IGFBPs: igf binding proteins*), é essencial para a formação, crescimento e manutenção do músculo esquelético (Funkenstein et al., 2006).

A proteína *igf-I* é bastante conservada entre os vertebrados (Barton, 2006). Inicialmente, o *igf-I* é sintetizado como molécula precursora, denominada pré-pró-*igf-I* que contém (1) uma sequência sinal na região N-terminal, (2) a região madura, constituída pelos domínios A, B, C e D, e (3) uma porção denominada de domínio E, localizada na região C-terminal (Moriyama et al., 2000). A sequência sinal e o domínio E são removidos do pré-pró-*igf-I*, por proteólise, liberando a porção madura do *igf-I*, contendo 70 aminoácidos. A estrutura terciária da porção madura é mantida por pontes dissulfeto (Moriyama et al., 2000) (Figura 11).



468

469 **Figura 11.** Representação esquemática do pré-pró- *igf-I* e da proteína madura correspondente. A
 470 sequência-sinal e o domínio E são removidos, enquanto a proteína madura é constituída pelos domínios
 471 A, B, C e D. Entre os domínios A e B são estabelecidas pontes dissulfeto entre resíduos de aminoácidos
 472 cisteína (adaptado de Moriyama et al., 2000).

473

474 O *igf-I*, produzido nos tecidos, é liberado na corrente sanguínea, onde
 475 permanece complexado a proteínas de ligação específicas, as *IGFBPs*. As *IGFBPs*
 476 transportam as moléculas de *igf-I* pelo plasma, controlam o seu efluxo na circulação,
 477 além de prolongarem sua meia-vida e modularem a sua interação com receptores
 478 específicos, de forma a controlar indiretamente suas ações biológicas (Jones &
 479 Clemmons, 1995).

480 As ações biológicas do *igf-I* são mediadas pelo receptor de *igf-I* (*igf-Ir*),
 481 expresso em uma variedade de tipos celulares. O *igf-Ir* apresenta estrutura tetramérica,
 482 sendo formado por duas subunidades α e duas β ($\alpha_2\beta_2$) unidas por pontes dissulfeto.
 483 As subunidades α são extracelulares e constituem o domínio de ligação ao *igf-I*; as
 484 subunidades β possuem uma região extracelular, uma região transmembrana e um
 485 domínio tirosina-quinase na região citoplasmática (Jones & Clemmons, 1995).

486 O *igf-I* está envolvido com a regulação do metabolismo celular de proteínas,
 487 lipídios, carboidratos e minerais, com a proliferação e diferenciação celular e com o
 488 crescimento corporal (Moriyama et al., 2000). A ampla variedade de tecidos, como
 489 cérebro, músculo, rins e intestino produzem *igf-I* localmente, embora o fígado seja o
 490 sítio primário de sua produção, fornecendo aproximadamente 75% de todo o *igf-I*
 491 circulante do corpo (Schwander et al., 1983). A importância do *igf-I* para o
 492 crescimento normal foi demonstrado em modelos de animais *knockout*. Camundongos
 493 *knockout* para o *igf-I* mostraram retardo severo no crescimento, já os animais que não
 494 expressavam o receptor do *igf-I* não sobreviveram após o nascimento (Barton, 2006).
 495 Entretanto, em outros experimentos, nos quais somente a produção de *igf-I*
 496 proveniente do fígado foi interrompida após o nascimento, não foi observada

497 deficiência no crescimento corporal (Sjögren et al., 1999), mostrando que a produção
498 local de *igf-I*, por outros tecidos, e sua ação autócrina ou parácrina é suficiente para
499 garantir o crescimento normal (Barton, 2006).

500 As funções do *igf-I* sobre o músculo esquelético são bem estabelecidas em
501 mamíferos, sendo já descrito entre os vertebrados o alto nível de conservação das
502 proteínas envolvidas nessa via. O *igf-I* está envolvido com a regulação do
503 desenvolvimento e crescimento muscular devido às suas potentes ações metabólica e
504 mitogênica (Reinecke et al., 1997; Reinecke & Collet, 1998). O *igf-I* regula as vias
505 anabólicas do músculo esquelético, determinando aumento ou manutenção da massa
506 muscular (Otto & Patel, 2010). Esse aumento da massa muscular (hipertrofia) pode
507 ocorrer pela incorporação de núcleos de células satélites, após sua proliferação, às
508 fibras musculares em crescimento ou em regeneração (Florini et al., 1993, 1996) e
509 pelo aumento nos níveis de proteínas dentro da fibra muscular (Otto & Patel, 2010).
510 Para essas ações, a ligação do *igf-I* ao seu receptor pode resultar na ativação de duas
511 principais vias de sinalização. Primeiramente, o *igf-I* pode estimular a cascata de
512 sinalização mediada pela *mapk* (*mitogen activated protein kinase*) que resulta na
513 proliferação de mioblastos, durante a miogênese, ou de células satélites, durante o
514 crescimento muscular (Halevy & Cantley, 2004). A segunda via de sinalização que
515 pode ser ativada, é mediada pelas proteínas *pi3k/akt/mtor* (*phosphoinositide-3-kinase -*
516 *protein kinase B* ou *akt – mammalian target of rapamycin*), que determinam a ativação
517 de diferentes proteínas-alvo, resultando no aumento da síntese de proteínas do
518 músculo esquelético e hipertrofia (Lai et al., 2004) (Figura 10). A manutenção da
519 massa muscular, mediada pelo *igf-I*, ocorre pela inibição das vias da atrofia muscular,
520 impedindo a degeneração e a perda de massa muscular (Otto & Patel, 2010).

521 Nos teleósteos, as vias de sinalização ativadas pelo *igfs* (*I e II*) ainda
522 apresentam lacunas que necessitam melhor compreensão para o entendimento da
523 contribuição dessa via durante crescimento muscular. No *zebrafish*, o *igf-I* estimula a
524 proliferação de mioblastos em cultura de células por meio da ativação das vias *mapk* e
525 *pi3k/akt* (Pozios et al., 2001). Em cultura de mioblastos de truta arco-íris (Castillo et
526 al., 2006) e de salmão (Bower & Johnston, 2010), a ativação de uma ou ambas as vias
527 de sinalização, pelo *igf-I*, é dependente do estágio de desenvolvimento dessas células.
528 Nos mioblastos em proliferação e diferenciação da truta, o *igf-I* ativa as vias da *mapk* e
529 *pi3k/akt*; nos miotubos em diferenciação, ocorre ativação da via da *pi3k/akt* (Castillo et
530 al., 2006). No pacu (*Piaractus mesopotamicus*), no estágio juvenil de
531 desenvolvimento, foi observado aumento nos níveis de *igf-I* e *igf-II* no músculo *fast*

532 durante condições de restrição alimentar (~ 2 dias de jejum) e um decréscimo nos
533 níveis de expressão após 24 horas de realimentação (Mareco et al., 2015) . Em juvenis
534 de salmão (*Salmo salar*), Valente et al., (2012), observaram após 3 semanas de jejum
535 diferença no padrão de expressão de *igf-I* e *igf-II*, com aumento de *igf-I* e decréscimo
536 na expressão de *igf-II*, após períodos de realimentação. Fuentes et al., (2011) também
537 descreveram decréscimo gradual nos níveis plasmáticos de *igf-I* em juvenis de
538 linguado (*Paralichthys adspersus*) durante longo tempo de jejum (4 semanas), sendo
539 que, após o período de realimentação, os níveis de *igf-I* diminuíram,
540 significativamente.

541 Observa-se que nas vias catabólicas, anabólicas e do metabolismo energético,
542 os níveis de expressão do *igf* e demais componentes envolvidos nessa via variam
543 durante condições normais ou de restrição alimentar no músculo esquelético de
544 acordo com a espécie e estágio de desenvolvimento analisado.

545

546 **1.8. MiRNAS**

547 Diversos estudos tem evidenciado que as vias de sinalização envolvidas no
548 desenvolvimento e manutenção do fenótipo muscular são controladas por microRNAs
549 (miRNAs) (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Doench& Sharp, 2004). Os miRNAs são
550 pequenos RNAs reguladores não codificantes com tamanho variando de 17 a 25
551 nucleotídeos que reprimem pós-transcricionalmente a expressão gênica pelo
552 reconhecimento de locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus
553 RNAs mensageiros (mRNAs) alvos (Ambros, 2004, Bartel, 2004). Estima-se que cada
554 miRNA possa se ligar a muitos RNAs mensageiros, e que os mRNAs mensageiros
555 podem ter sua estabilidade ou tradução regulada por mais de um miRNA (Doench&
556 Sharp, 2004). Os alvos de miRNAs reguladores parecem trabalhar de forma
557 orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum (Bartel, 2004).

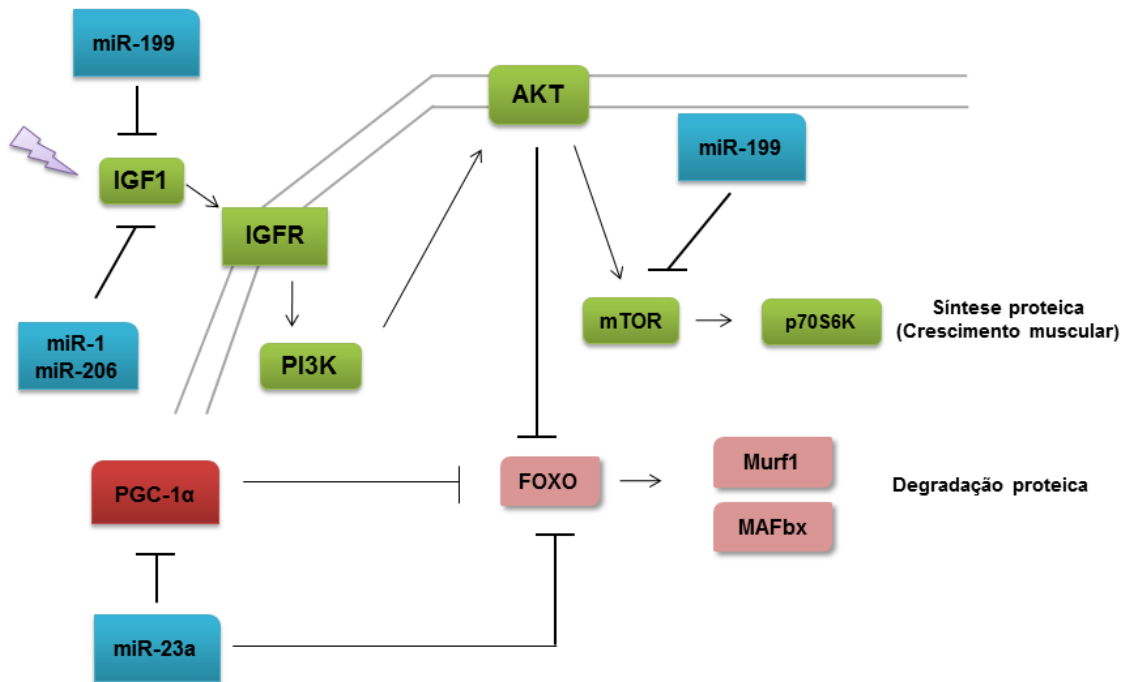
558 Em relação as suas contribuições nas vias de sinalização, estudos realizados
559 demonstram sua importância no controle da homeostasia celular. Por exemplo, os
560 miRNAs 1 e 206, ambos regulam negativamente a expressão de *igf-I*. Em cultura de
561 células musculares cardíacas e esqueléticas, Elia et al., (2009), observaram que a
562 superexpressão do miR-1 resultou em inibição da expressão de *igf-I*, em ambas as
563 culturas de células. Yan et al., (2013), descreveram padrão de expressão inverso entre
564 o miR-206 e o *igf-I* em *Oreochromis niloticus* (tilápias) transfectadas com esse
565 miRNA, indicando inibição desse gene pelo miR-206. Além desses dois miRNAs,
566 também foi demonstrado em cultura de células C2C12 atuação do miR-199 inibindo a

567 via do *igf-I* e o crescimento muscular, suprimindo tanto a expressão de *igf-I*, quanto a
568 expressão de *mtor*, outro componente da via do *igf-I* (Jia et al., 2014).

569 Outro miRNA que vem sendo descrito em processos envolvidos com a atrofia e
570 a hipertrofia muscular é o miR-23a (Wang, 2013). Safdar et al., (2009), observaram
571 associação entre a diminuição na expressão do miR-23a e o aumento, tanto dos níveis
572 proteicos quanto de mRNA, do gene *pgc-1 α* no músculo esquelético de ratos
573 submetidos ao exercício físico, indicando que o miR-23a pode regular negativamente a
574 expressão desse gene. Além dessa regulação, esse miRNA, em condições normais,
575 inibe também a expressão de atrogenes como o *mafbx* e o *murf*; a superexpressão deste
576 miRNA resultou em resistência a atrofia, tanto em ratos adultos, quanto em cultura de
577 células submetidas a tratamento com dexametasona (Wada et al., 2011).

578 Protocolos envolvendo modelos de jejum e realimentação em peixes tem sido
579 utilizados para investigar o envolvimento dos miRNAs no controle da massa muscular
580 durante o balanço entre o catabolismo e o anabolismo muscular (Yan et al., 2013, Zhu
581 et al., 2015). Zhu et al., (2015), após construir uma biblioteca de miRNAs para a
582 espécie de peixe *Siniperca chuatsi*, destacaram que 21 miRNAs apresentaram alta
583 abundância no músculo esquelético. Os autores analisaram a expressão desses 21
584 miRNAs em juvenis desta espécie, após período de jejum seguido de realimentação e
585 observaram padrão variado de expressão dos miRNAs entre os períodos analisados.

586 Percebe-se que o comportamento de atuação dos miRNAs diferem entre os
587 tecidos, em situações normais e de jejum de acordo com a espécie e fase de
588 desenvolvimento estudada (Figura 12).



589

590 **Figura 12:** Vias de sinalização envolvidas na síntese (em verde) e degradação proteica (em rosa).
 591 miRNAs estão representados em azul. Estímulo intrínseco ou extrínseco (roxo) induz a liberação de *igf-*
 592 *I*, que se liga ao receptor na superfície celular e ativa eventos por meio da via *pi3k* --> *akt* --> *mtor* -->
 593 *p70s6k*, aumentando a síntese proteica e inibindo fatores envolvidos com a via de degradação. A
 594 inativação da via *akt* leva à desfosforilação do *foxo* que regula a transcrição de fatores atrogênicos,
 595 como o *murf* e o *maf**bx*, desencadeando a degradação proteica. Quando ativo, *pgc-1α* inibe *foxo*,
 596 desestimulando a ativação dos fatores atrogênicos e estimulando a biogênese mitocondrial. Os miRNAs
 597 atuam inibindo os diferentes genes, influenciando tanto nas taxas de síntese quanto de degradação
 598 proteica. (Adaptado: Bonaldo e Sandri 2013).

599

600 1.9. Restrição alimentar e o crescimento muscular

601 O crescimento e o desenvolvimento muscular podem aumentar ou diminuir em
 602 função de certos parâmetros, conhecidos como fatores moduladores do crescimento.

603 Na natureza, períodos de jejum são comuns entre os peixes, especialmente
 604 quando há escassez de alimento durante algum período do ano. No entanto, a taxa de
 605 sobrevivência durante esses períodos é uma habilidade bem desenvolvida em muitas
 606 espécies (Dave et al.,1975). As respostas metabólicas durante a restrição alimentar
 607 variam significativamente entre os teleósteos (Sheridan & Mommsen, 1991) e alguns
 608 fatores como a linhagem, fase de crescimento, manejo e disponibilidade de alimento
 609 podem provocar injúria nos animais e, conseqüentemente, desacelerar o crescimento
 610 muscular (Lovell, 1989; Bastrop et al., 1991; Sheridan e Mommsen, 1991; Souza et
 611 al., 2002; Furuya, 2010).

612 Após período de jejum, a realimentação promove reversão nos processos de
613 mobilização de reservas corporais para suprir o catabolismo. Somente quando esta
614 condição estiver restabelecida, a energia disponibilizada pelo alimento será convertida
615 em crescimento (Dobson e Holmes, 1984; Kim e Lovell, 1995; Montserrat et al., 2007;
616 Hagen et al., 2009). Estudos demonstram que alterações nos fatores extrínsecos
617 considerados ótimos para espécie, podem resultar em mudanças metabólicas e,
618 conseqüentemente variação na expressão de genes que compõem as vias de sinalização
619 do catabolismo, anabolismo e metabolismo celular (Bower e Johnston, 2010; Fuentes
620 et al., 2012; Valente et al., 2012; Nebo et al., 2013; Gutierrez de Paula et al., 2014;
621 Mareco et al., 2015).

622

623 **2. JUSTIFICATIVA**

624 Sabe-se que protocolos envolvendo restrição alimentar vêm ganhando espaço
625 no meio científico, pois acredita-se que o cultivo de animais submetidos a curtos
626 períodos de jejum e posterior realimentação podem ser utilizados na aquicultura como
627 estratégia alimentar para diminuir os custos na produção. Grande parte dos estudos
628 que utilizam modelos de jejum e realimentação para avaliar a expressão de genes
629 relacionados à síntese e degradação proteica, analisam somente a expressão desses
630 genes na musculatura esquelética branca (Seilliez et al., 2008; Johnston et al., 2011;
631 Fuentes et al., 2013; Valente et al., 2012). Tendo em vista que em peixes, os
632 compartimentos musculares são bem delimitados, o que possibilita avaliar a expressão
633 e o papel dos reguladores do tecido muscular em musculaturas com características
634 fisiológicas e fenotípicas distintas, são necessários estudos que busquem compreender
635 o papel de genes envolvidos com o catabolismo e anabolismo e dos miRNAs nas
636 musculaturas vermelha e branca em situações de desequilíbrio energético, como a
637 privação alimentar.

638

639 **3. HIPÓTESE**

640 Desta forma, a hipótese é de que juvenis de pacu submetidos à restrição
641 alimentar aumentam os níveis de expressão de genes catabólicos e diminuem os níveis
642 de expressão de genes anabólicos e, após o período de realimentação a expressão dos
643 genes anabólicos volta a aumentar e a expressão dos genes catabólicos diminui.

644

645 **4. OBJETIVOS**

646

647 Avaliar, nas musculaturas vermelha e branca de juvenis de pacu (*Piaractus*
648 *mesopotamicus*) submetidos a período de jejum seguido de realimentação;

649

650 A) A morfologia e a morfometria das fibras da musculatura vermelha e
651 branca;

652 B) A expressão gênica de componentes das vias do catabolismo, anabolismo e
653 metabolismo energético;

654 C) A expressão dos MiRNAs (miR-1, miR-206, miR-199 e miR-23a) e de seus
655 genes alvo.

656

657 **5. MATERIAL E MÉTODOS**

658

659 **5.1. *Condições experimentais***

660 O experimento de cultivo dos peixes foi conduzido no Pólo Regional da Alta
661 Sorocabana, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), com sede
662 em Presidente Prudente-SP. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com
663 os Princípios Éticos em Pesquisa Animal aprovados pelo Colégio Brasileiro de
664 Experimentação Animal (COBEA). O protocolo do presente estudo foi aprovado pelo
665 Comitê de Ética em Uso Animal (Protocolo nº 694-CEUA) do Instituto de Biociências
666 de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, São Paulo.

667 Juvenis de pacu, com aproximadamente 150g, foram distribuídos em caixas
668 d'água (0,5 m³), em sistemas de recirculação distintos. O oxigênio dissolvido da água
669 foi monitorado diariamente e os parâmetros, amônia, nitrito e nitrato, semanalmente.

670 Os peixes foram alimentados três vezes ao dia, até a saciedade aparente, com
671 ração comercial apropriada para a fase de desenvolvimento (Tabela 1), durante sete
672 dias para adaptação ao delineamento experimental.

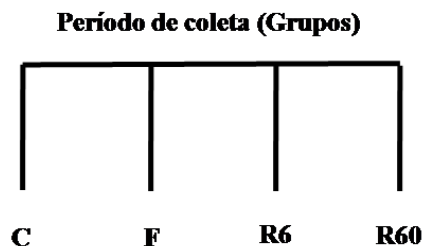
673

674 Tabela 1: Valor nutricional dos componentes da ração utilizada para alimentar os
 675 juvenis de pacu durante o experimento. Dados fornecidos pela empresa Guabi.

| Ração 28% Proteína | |
|---------------------------|-------------------|
| Nutriente | Quantidade |
| Ácido Fólico (mín.) | 10,0000 mg/kg |
| Biotina (mín.) | 10,0000 mg/kg |
| Cálcio (mín.) | 12,0000 g/kg |
| Cobalto (mín.) | 0,5000 mg/kg |
| Cobre (mín.) | 20,0000 mg/kg |
| Colina (mín.) | 1.500,0000 mg/kg |
| Extrato Etéreo (mín.) | 50,0000 g/kg |
| Ferro (mín.) | 150,0000 mg/kg |
| Fósforo (mín.) | 6,0000 mg/kg |
| Iodo (mín.) | 1,0000 mg/kg |
| Manganês (mín.) | 50,0000 mg/kg |
| Matéria Fibrosa(máx.) | 70,000 g/kg |
| Matéria Mineral(máx.) | 100 g/kg |
| Niacina (mín.) | 150,0000 mg/kg |
| Proteína Bruta (mín.) | 280,0000 g/kg |
| Selênio (mín.) | 0,7000 mg/kg |
| Umidade (máx.) | 80,0000 g/kg |
| Vitamina A (mín.) | 16.000,0000 UI/kg |
| Vitamina B1 (mín.) | 32,0000 mg/kg |
| Vitamina B12 (mín.) | 32,0000 mcg/kg |
| Vitamina B2 (mín.) | 32,0000 mg/kg |
| Vitamina B6 (mín.) | 32,0000 mg/kg |
| Vitamina C (mín.) | 200,0000 mg/kg |
| Vitamina D3 (mín.) | 4.000,0000 UI/kg |
| Vitamina E (mín.) | 200,000 UI/kg |
| Zinco (mín.) | 150,0000 mg/kg |

676

677 Após esse período, os animais foram submetidos à um período de jejum de 10
678 dias, seguido de período de realimentação de 3 dias. O período experimental utilizado
679 neste trabalho foi delineado com base em estudos já realizados no laboratório com
680 protocolos de jejum e realimentação para peixes neotropicais (Nebo et al., 2013;
681 Mareco et al., 2015). As coletas foram realizadas conforme o delineamento da Figura
682 13.



683
684 **Figura 13:** As coletas foram realizadas de acordo com os grupos a seguir: **C (control):** zero dias de
685 jejum; **F (fasting):** após 10 dias de jejum; **R6 (refeeding):** após 6 horas de realimentação;
686 **R60(refeeding):** após 60 horas de realimentação.

687
688 Em cada coleta, os peixes (n=10) foram anestesiados com benzocaína (100-200
689 mg/L de água) e eutanasiados. Amostras musculares foram retiradas, congeladas em
690 nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento.

691
692 **5.2. Morfologia e Morfometria**

693 Amostras da musculatura vermelha e branca dos grupos C, F e R60 foram
694 coletadas para às análises morfológicas e morfométricas. Cortes transversais (10 µm)
695 dos fragmentos musculares congelados, foram obtidos em criostato e submetidos à
696 coloração hematoxilina-eosina para a análise morfológica e do diâmetro das fibras
697 musculares. Utilizando sistema de análise de imagens (Leica Qwin, Germany), em
698 campos aleatórios da lâmina histológica foi determinado o menor diâmetro de uma
699 população de aproximadamente 800 fibras musculares de cada tipo, por animal. As
700 fibras foram agrupadas em classes, na dependência do seu diâmetro (<20, 20-50 e >50
701 µm) para avaliar o grau de catabolismo e anabolismo muscular (Almeida et al., 2008;
702 2010).

703
704 **5.3. Análise de succinato desidrogenase (SDH)**

705 A análise de SDH foi utilizada como indicador da capacidade oxidativa da fibra
706 muscular em músculo *slow* e *fast* e foi realizada conforme descrito por Nachlas et al.,
707 (1957). Cortes transversais de músculo esquelético (10 µm) dos grupos C, F e R60

708 foram colocados na mesma lâmina para minimizar as diferenças de coloração. Os
709 cortes foram incubados com 5 ml de solução de succinato de sódio 0,2 M e 10 ml de
710 solução aquosa de nitro azul tetrazólio (NBT, 1 mg / ml). As amostras foram
711 incubadas entre 20 a 30 minutos a 37°C, lavadas em solução salina, fixadas
712 subsequentemente em solução salina de formol durante 10 minutos, lavadas em etanol
713 a 15% durante quatro / cinco minutos e montadas em Permout. Para analisar a
714 atividade de SDH, as imagens de todas as amostras foram capturadas usando
715 microscópio (ampliação de 40X) anexado ao sistema de análise de imagem
716 computadorizada. Os parâmetros de intensidade da luz e de alinhamento do filtro
717 utilizados foram os mesmos para todas as amostras. A análise quantitativa da
718 intensidade de coloração de SDH foi determinada medindo a coloração de fundo
719 (escala de acizentado) com o Software de Sistema de Análise de Imagem (Leica Qwin,
720 Alemanha).

721

722 5.4. Expressão gênica e dos MiRNAs

723 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA

724 Os genes avaliados, nas vias catabólica, anabólica e metabolismo energético
725 foram selecionados com base nos dados obtidos do transcriptoma do músculo
726 esquelético vermelho e branco do pacu (Projeto desenvolvido em colaboração com o
727 Prof. Dr. Ian A. Johnston, da University of St. Andrews, Escócia - FAPESP, Proc.
728 2011/09346-1), depositados no European Nucleotide Archive accession, número:
729 PRJEB6656 (Mareco et al., 2015).

730 O RNA total das amostras musculares foi extraído com o reagente
731 *TRIzol*® (Invitrogen Life Technologies, USA), conforme instruções do protocolo.
732 Para a quantificação do RNA foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE
733 Healthcare, USA), que também permitiu a estimativa da qualidade da extração pela
734 medida de absorbância de 260 nm (quantidade de RNA) e 280 nm (quantidade
735 de proteínas). A pureza do RNA foi garantida pela obtenção da razão 260/280
736 nm superior a 1.8. A integridade (qualidade) do RNA total extraído foi avaliada por
737 eletroforese em gel de agarose 1% e pelo sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, USA),
738 que utiliza plataforma baseada em microfluidos para fornecer um número de
739 integridade do RNA (RIN). Amostras com RIN superior a 7.0 foram consideradas
740 íntegras. Em seguida o RNA total foi tratado com DNase I para remover DNA
741 residual das amostras utilizando o *kit DNase I Amplification Grade* (Invitrogen Life
742 Technologies, USA).

743

744 5.5. Transcrição Reversa do RNA

745 Para transcrição reversa dos miRNAs, foi realizada a transcrição reversa
746 do RNA extraído pelo *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* (Life
747 Technologies, USA) combinado com o kit *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life
748 Technologies, USA), conforme instruções do protocolo. Para as análises de
749 expressão dos mRNAs dos genes selecionados foi realizada a transcrição reversa
750 do RNA extraído pelo *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied
751 Biosystems, USA), seguindo as orientações do fabricante.

752

753 5.6. Expressão de miRNAs e mRNA por qPCR

754 Os níveis de expressão dos miRNAs e dos genes selecionados foram
755 detectados por qPCR, por meio da plataforma QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR
756 System (Applied Biosystems, USA). O cDNA dos miRNAs foi amplificado
757 utilizando-se o kit *TaqMan® small RNA assay* (Life Technologies, USA), contendo
758 primers e sondas de hidrólise específicos para os miRNAs miR-1, miR-206, miR-199
759 e miR-23a. O cDNA dos mRNAs dos genes foram amplificados utilizando-se
760 *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, USA) e primers específicos para cada gene. A
761 quantificação relativa da expressão, tanto dos miRNAs quanto dos genes, foi realizada
762 pelo método do Ct comparativo (Livak & Schmittgen, 2001). Para cada animal foi
763 obtido o valor de Ct para o gene-alvo e o valor de Ct para o gene de referência a partir
764 da média dos Cts de cada reação em duplicata. Para cada animal, foi calculado o valor
765 de ΔCt ($Ct_{\text{gene-alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$). Todos os valores foram normalizados pelo valor
766 de ΔCt do calibrador para obter o valor de $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct_{\text{obtido para cada animal}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$).
767 O calibrador é definido como uma amostra utilizada como base de comparação dos
768 resultados, podendo representar um animal não tratado ou um estágio particular de
769 desenvolvimento animal (*User Bulletin #2, Applied Biosystems, 2001*). Pelo Método
770 do $\Delta\Delta Ct$, a quantificação relativa da expressão gênica é dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$,
771 expressa em unidades arbitrárias (*User Bulletin #2, Applied Biosystems, 2001*) e
772 normalizada pelo gene de referência que apresentar maior estabilidade entre as
773 amostras com base no *geNorm normalization of real-time PCR expression data*
774 (Vandesompele et al., 2002). A expressão dos miRNAs foi normalizada pela expressão
775 do RNA não codificante U6 (U6 snRNA) e a dos mRNAs foi normalizada pela
776 expressão do gene *gapdh*, que por análises anteriores se mostraram mais estáveis.

777

778 5.7. Heat map: resumo da clusterização dos dados de catabolismo, anabolismo e
779 metabolismo energético

780 Para estabelecer relações entre todos os componentes das vias de sinalização
781 estudadas, realizou-se o heat map e a análise hierárquica de agrupamento utilizando os
782 dados de Ct e os programas R Bioconductor, gplots (versão 3.0.1) e heatmap.2
783 (versão 3.0.1). A clusterização e a seriação basearam-se no coeficiente de correlação
784 de Pearson de z-score, normalizados com base dos valores de abundância (escala de 0
785 a 1).

786

787 **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

788

789 Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. O teste de normalidade de
790 Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição dos dados (Zar, 2009).
791 A frequência das fibras foi analisada por meio do teste de Goodman para contrastes
792 entre e dentro de populações multinomiais (Goodman, 1965). A avaliação de SDH e a
793 expressão relativa de mRNA e miRNA foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis
794 seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância
795 considerado foi $p < 0,05$ (Zar, 2009).

5. BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L.E., Dal Pai-Silva, M., 2005. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. J. Fish. Biol. 67, 1-12.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A.M., Bergot, P., 1997. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibers in carp larvae in relation to growth rate. J. Fish Biol. 50, 1285-1302.
- Alexander, R., 1969. The orientation of muscle in the myomeres of fishes. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 49, 263-290.
- Alfei, L., Onali, A., Spanò, L., Colombari, P.T., Altavista, P.L., De Vita, R., 1994. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define proliferating myosatellite cells during hyperplastic muscle growth of fish (*Cyprinus carpio* L). Eur. J. Histochem. 38, 151-162.
- Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Micron 39, 1306-1311.
- Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. Micron 41, 997-1004.
- Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. Nature 431:350–355.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116:281–297.
- Barton, E.R., 2006. The ABCs of IGF-I isoforms: impact on muscle hypertrophy and implications for repair. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 31, 791-797.
- Bastrop, R.; Spangenberg, R.; Jurss, K. 1991. Biochemical adaptation of juvenile carpa (*Cyprinus carpio* L) to food deprivation. Comparative Biochemistry and Physiology. 98, 143-149.
- Bower, N. I., Li, X., Taylor, R., & Johnston, I. A. (2008). Switching to fast growth: the insulin-like growth factor (IGF) system in skeletal muscle of Atlantic salmon. The Journal of Experimental Biology, 211(Pt 24), 3859–70.
- Bower, N.B., Garcia de la serrana, D. e Johnston., I.A., 2010. Characterisation and differential regulation of MAFbx/Atrogin-1 a and b transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Biochemical and Biophysical Research Communications 396, 265–271.
- Blagden, C.S., Currie, P.D., Inghan, P.W., Hughes, S.M., 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. Genes Dev. 11, 2163-2175.
- Bone, Q., 1966. On the function of the two types of myotomal muscle fiber in elasmobranch fish. J. Mar. Biol. Assoc. 46, 321-349.
- Bone, Q., 1978. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology. Academic Press, New York, pp. 361-424.
- Bone, Q., 1989. Evolutionary patterns of axial muscle systems in some invertebrates and fish. Am. Zool. 29, 5-18.
- Campion, D.R., 1984. The muscle satellite cells. Int. Ver. Cytol. 87, 225-251.
- Castillo J, Ammendrup-Johnsen I, Codina M, Navarro I, Gutierrez J (2006) IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290: R1683–R1690

- Cleveland, B. M., & Evenhuis, J. P. (2010). Molecular characterization of atrogin-1/F-box protein-32 (FBXO32) and F-box protein-25 (FBXO25) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Expression across tissues in response to feed deprivation. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 157(3), 248–257
- Cleveland, B. M., & Weber, G. M. (2010). Effects of insulin-like growth factor-I, insulin, and leucine on protein turnover and ubiquitin ligase expression in rainbow trout primary myocytes. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298, R341–R350.
- Cole, N.J., Hall, T.E., Christopher, I.M., Chapman, M.A., Kobiyama, A., Nihei, Y., Watabe, S., Johnston, I.A., 2004. Temperature and the expression of myogenic regulatory factors (MRFs) and myosin heavy chain isoforms during embryogenesis in the common carp *Cyprinus carpio* L. *J. Exp. Biol.* 207, 4239-4248
- Currie, P.D., Ingham, P.W., 2001. 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.
- Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., 2000. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). *Anat. Histol. Embriol.* 29, 283-289.
- Dal Pai-Silva, M., Dal Pai, V., Mota, D.I., Rodrigues, A.C., 1995. Histochemical study of muscle fiber types in *Synbranchus marmoratus* (Boch, 1795). *Ann. Anat.* 177, 65-70.
- Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C., 2003. Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. *Arch. Fish Mar. Res.* 50, 149-160.
- Dave, G.; Johansson-Sjöbeck, M.L.; Larsson, A.; Lewander, K.; Lindman, U., 1975. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 52, 423-430.
- Desgeorges, M. M., Freyssenet, D., Chanon, S., Castells, J., Pugnère, P., Béchet, D., ... Defour, A. (2014). Post-transcriptional regulation of autophagy in C2C12 myotubes following starvation and nutrient restoration. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 54, 208–216.
- Devoto, S.H., Melançon, E., Eisen, J.S., Westerfield, M., 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development.* 122, 3371-3380.
- Doench, J. G. and Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504-511.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W., 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am. J. Physiol.* 230, 579-582.
- Du, S.J., Devoto, S.H., Westerfield, M., Moon, R.T., 1997. Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the *hedgehog* and TGF- β gene families. *J. Cell Biol.* 139, 145-156.
- Duran B.O., Fernandez G.J., Mareco, E.A., Moraes, L.N., Salomão, R.A., Gutierrez de Paula, T., Santos, V.B., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2015. Differential microRNA Expression in Fast- and Slow-Twitch Skeletal Muscle of *Piaractus mesopotamicus* during Growth. *PLoS One.* Nov 3;10(11):e 0141967.
- Edmonson, D.G., Lyons, G.E., Martin, J.F., Olson, E.N., 1994. *Mef2* gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 120, 1251-1263.

- Edmonson, D.G., Olson, E.N., 1993. Helix loop helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Bio. Chem.* 268, 755-758.
- Eggington, S., Johnston, I.A., 1982. Muscle fiber differentiation and vascularisation in the juvenile European eel (*Anguilla anguilla* L). *Cell Tissue Res.* 222, 563-577.
- Elia, L., Contu, R., Quintavalle, M., Varrone, F., Chimenti, C. Russo, MA., Cimino, V., De Marinis, L., Frustaci, A., Catalucci, D., Condorelli, G. 2009. Reciprocal regulation of microRNA-1 and IGF-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation*, 120(23): 2377–2385.
- Fauconneau, B., Paboeuf, G., 2001. Muscle satellite cells in fish. In: Johnston IA (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, pp. 73-98.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., Coolican, S.A., 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* 17, 481-517.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., Magri, K.A., Mangiacapra, F.J., 1993. IGFs and muscle differentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 343, 319-326.
- Flutcher, B.E., Phillips, J.L., Powell, J.A., Andrews, S.B., Daniels, M.P., 1992. Coordinated development of myofibrils sarcoplasmic reticulum and transverse tubules in normal and dysgenic mouse skeletal muscle, in vivo and in vitro. *Dev. Biol.* 155, 266-280.
- Fuentes, E. N., Björnsson, B. T., Valdés, J. A., Einarsdottir, I. E., Lorca, B., Alvarez, M., & Molina, A. (2011). IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(6), R1532–R1542.
- Fuentes, E.N., Ruiz, P., Valdes, J.A., Molina, A., 2012. Catabolic signaling pathways, atrogenes, and ubiquitinated proteins are regulated by the nutritional status in the muscle of the fine flounder. *PLoS ONE* 7, e44256.
- Fuentes, E. N., Safian, D., Eir, I., Antonio, J., Elorza, A. A., Molina, A., Björnsson, B. T. (2013). Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in skeletal muscle of the fine flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 186, 172–180
- Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y., Hosoda, Y., Obinata, T., Nabeshima, Y., 1990. Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors. *J. Biol. Chem.* 265, 15219-15223.
- Funkenstein, B., Balas, V., Skopal, T., Radaelli, G., Rowlerson, A., 2006. Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. *Tissue and Cell* 38, 399-415.
- Furuya, W.M., 2010. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. GFM: Toledo, 100p.
- Greer-Walker, M., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish. Biol.* 7, 295-300.
- Goodman L., 1965. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. Washington: Technometrics.
- Gutierrez de Paula, T., de Almeida, F.L., Carani, F.R., Vechetti-Júnior, IJ., Padovani, C.R., Salomão, R.A., Mareco, E.A., Dos Santos, V.B., Dal-Pai-Silva, M. 2014. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 169:31-7.

- Halevy, O., Cantley, L.C., 2004. Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase and MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells. *Exp. Cell Res.* 297, 224–234.
- He, C., Bassik, M. C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., ... Levine, B. (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*, 481(7382), 511–515. <http://doi.org/10.1038/nature10758>
- Hoyle, J., Gill, H.S., Weatherley, A.H., 1986. Histochemical characterization of myotomal muscle in the grass pickrel, *Esox americanus vermiculatus* (LeSueur) and the muscle kellunge, *E masquinongy* (Mitchill). *J. Fish. Biol.* 28, 393-401.
- Huxley, H.E., 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365.
- Huxley, H.E., 1971. The structural basis of muscular contraction. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 178, 131-149.
- Jamart, C., Naslain, D., Gilson, H., & Francaux, M. (2013). Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(8), E964-74.
- Jia L., Li YF., Wu GF., Song ZY., Lu, HZ., Song CC., Zhang QL., Zhu JY., Yang GS., Shi XE. 2014. MiRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 296-308.
- Johnston, I.A., 1981. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Res.* 214, 369-379.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Johnston, I. A., Bower, N.I., Macqueen, D.J., 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J Exp Biol.* 214:1617–1628.
- Johnston, I.A., Davison, W., Goldspink, G., 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.* 114, 203-216.
- Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickel, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M., Burt, M.L., 2003. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* 203, 2539-2552.
- Johnston, I.A., Vieira, V.L.A., Abercromby, M., 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the Atlantic herring, *Clupea harengus*. *J. Exp. Biol.* 198, 1389-1403.
- Jones, J.I., Clemmons, D.R., 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16, 3-34..
- Kelly, A.M., 1971. Sarcoplasmic reticulum and T tubules in differentiating rat skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 49, 335-344.
- Kilarski, W., 1990. Histochemical characterization of myotomal muscle in the roach, *Rutilus rutilus* (L). *J. Fish Biol.* 36, 353-362.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141. <http://doi.org/10.1038/ncb2152>

- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, Y., Suetake, H., Johnston, I.A., Watabe, S., 1998. Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. *J. Exp. Biol.* 201, 2801-2813.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 3-20.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Booms, G.H.R., Lemmens, C.J.J., Osse, J.W., 1991. Numbers of myosatellite cells in white axial muscle of growing fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). *Am. J. Anat.* 192, 418-424.
- Lai, K.M., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, N.A., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2004. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol. Cell Biol.* 24, 9295-9304.
- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-831.
- Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D., Weintraub, H., 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E-47- like proteins *in vivo*. *Cell* 66, 305-315.
- Lin, Z.Y., Dechesne, C.A., Eldridge, J., Paterson, B.M., 1989. An avian muscle factor related to MyoD1 activates muscle-specific promoters in nonmuscle cells of different germ-layer origin and in BrdU-treated myoblasts. *Genes Dev.* 3, 986-996.
- Lovell, R.T., 1989. Nutrition and feeding of fish. New York: Van Nostrand Reinhold, p.260.
- Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., Pabo, C.O., 1994. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 77, 451-459.
- Mareco, E. A., Garcia de la Serrana, D., Johnston, I. A., & Dal-Pai-Silva, M. (2015). Characterization of the transcriptome of fast and slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *BMC Genomics*, 16, 182.
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 9, 493-494.
- Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem. Cell Biol.* 73, 723-732.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Bioch. Physiol.* 129, 207-219.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1553-1562.
- Murre, C., Bain, G., Van Dijk, M.A., Engel, I., Furnari, B.A., Massari, M.E., Matthews, J.R., Quong, M.W., Rivera, R.R., Stuijver, M.H., 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1218, 129-135.
- Murre, C., Mccaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Yan, J.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Nebo, C., Portella, M.C., Carani, F.R., Almeida, F.L., Padovani, C.R., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2013. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in

- juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 164, 268-274
- Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., ... Thomas, G. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 14238–14243.
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., Buckingham, M., 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111, 1097-1107.
- Otto, A., Patel, K., 2010. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Exp. Cell Res.* 316, 3059-3066.
- Patruno, M., Radaelli, G., Mascarello, F., Candia Carnevali, M.D., 1998. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anat Embryol.* 198, 487-504.
- Pozios, K.C., Ding, J., Degger, B., Upton, Z., Duan, C., 2001. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. *Am. J. Physiol. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1230–R1239.
- Pownall, M.E., Emerson, C.P., 1992. Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. *Dev. Biol.* 151, 67-79.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Spiegelman, B. M. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature*, 423(6939), 550–555.
- Reinecke, M., Collet, C., 1998. The phylogeny of the insulin-like growth factors. *Int. Rev. Cytol.* 183, 1–94.
- Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., Loffin-Cueni, D., 1997. Insulin like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene sequence, tissue expression, and cellular localization. *Endocrinology* 138, 3613–3619.
- Rescan, P.Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., 1995. A gene of homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and *in vitro* during the conversion of myosatellite cells to myotubes. *FEBS Lett.* 362, 89-92.
- Rescan, P.Y., Gauvry, L., Paboeuf, G., Fauconneau, B., 1994. Identification of a muscle factor related to MyoD in fish species. *Biochim. Biophys. Acta* 1218, 202-204.
- Rescan, P.Y., Jutel, I., Rallièrre, C., 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 204, 3523-3529.
- Rome, L.C., Funke, R.P., Alexander, R.M., Lutz, G., Aldridge, H., Scott, F., Freadman, M., 1988. Why animals have different muscle fibre types. *Nature* 335, 824-827.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, London, pp. 103-139.
- Rudnicki, M.A., Jaenish, R., 1995. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays* 17, 203-209.
- Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga BP, Tarnopolsky MA. 2009. miRNA in the Regulation of Skeletal Muscle Adaptation to Acute Endurance Exercise in C57Bl/6J Male Mice. *PLoS ONE* 4(5).
- Sänger, A.M., 1992. Quantitative fine structural diversification of red and white muscle fibres in cyprinids. *Environ. Biol. Fishes* 33, 97-104.

- Sänger, A.M., Kim, Z.S., Adam, H., 1990. The fine structure of muscle fibers of roach, *Rutilus rutilus* (L.), and chub, *Leuciscus cephalus* (L.), Cyprinidae, Teleostei: interspecific differences and effects of habitat and season. *J. Fish Biol.* 36, 205-213.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press London, pp. 187-250.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 596–603.
- Seiliez, I., Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Fricot, A., Vachot, C., Kaushik, S., Tesseraud, S., 2008. Feeding status regulates the polyubiquitination step of the ubiquitin – proteasome -dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *J. Nutr.* 138, 487–491.
- Seiliez, I., Gabillard, J.-C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutierrez, J., Kaushik, S., ... Tesseraud, S. 2008b. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(1), R329–R335.
- Schiaffino, S., Margreth, A., 1969. Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 41, 855-875.
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS Journal*, 280(17), 4294–4314.
- Schwander, J.C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E.R., 1983. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 113, 297-305.
- Sheridan, M.A., Mommsen, T.P., 1991. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General Comparative Endocrinology*. 81, 473-483.
- Sinha-Hikim, I., Roth, S.M., Lee, M.I., Bhasin, S., 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, 197-205.
- Souza, V.L., Urbinati, E.C., Gonçalves, D.C., Silva, P.C., 2002. Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. *Acta Scientiarum, Maringá*. 24, 533-540.
- Stoiber, W., Sänger, A.M., 1996. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. *Anat. Embryol.* 194, 569-579.
- Tacchi, L., Bickerdike, R., Secombes, C. J., & Martin, S. a M. (2012). Muscle-specific RING finger (MuRF) cDNAs in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their role as regulators of muscle protein degradation. *Marine Biotechnology* (New York, N.Y.), 14(1), 35–45.
- Tacchi, L., Bickerdike, R., Secombes, C. J., Pooley, N. J., Urquhart, K. L., Collet, B., & Martin, S. a M. (2010). Ubiquitin E3 ligase atrogin-1 (Fbox-32) in Atlantic salmon (*Salmo salar*): sequence analysis, genomic structure and modulation of expression. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 157(4), 364–73.
- Ticho, B.S., Stainier, D.Y.R., Fishman, M.C., Breitbart, R.E., 1996. Three zebrafish MEF2 genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos. *Mech. Dev.* 59, 205-218.

- Valente, L. M. P., Bower, N. I., & Johnston, I. A. (2012). Postprandial expression of growth-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) juveniles fasted for 1 week and fed a single meal to satiation. *British Journal of Nutrition*, 108(12), 2148–2157
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v.3.
- van Raamsdonk, W., Pool, C.W., Kronnie, G., 1978. Differentiation of muscle fiber types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Anat. Embryol.* 153, 137-155.
- van Raamsdonk, W., Tekronnie, G., Pool, C.W., van de Laarse, W., 1980. An immune histochemical and enzymic characterization of the muscle fibres in myotomal muscle of the teleost *Brachydanio rerio*, Hamilton-Buchanan. *Acta Histochem.* 67, 200-216.
- Veggetti, A., Mascarello, F., Scapollo, P.A., 1990. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax*: an ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embryol.* 182, 1-10. 1.
- Zar J., 2009. *Biostatistical analysis*. 5rd ed. New Jersey: Prentice—Hall.
- Wada, S., Kato, Y., Okutsu, M., Miyaki, S., Suzuki, K., Yan, Z., Schiaffino, S., Asahara, H., Ushida, T., Akimoto, T. 2011. Translational Suppression of Atrophic Regulators by MicroRNA-23a Integrates Resistance to Skeletal Muscle Atrophy. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38456–38465.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press London, pp. 19-41.
- Weatherley, A., Gill, H.S., 1985. Dynamics of increase in muscle fibres in fishes in relation to size and growth. *Experientia* 41, 353-354.
- Weatherley, A., Gill, H., 1989. The role of muscle in determination growth and size in teleost fish. *Experientia* 45, 875-878.
- Weatherley, A., Gill, H., Lobo, A.F., 1988. Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J. Fish Biol.* 33, 851-859.
- Weinberg, E.S., Allende, M.L., Kelly, C.S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O.G., Grunwald, D.J., Riggelman, B., 1996. Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type, *no tail* and *spadetail* embryos. *Development* 122, 271-280.
- Weintraub, H., 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241–1244.
- Wende, A. R., Huss, J. M., Schaeffer, P. J., Gigue, V., & Kelly, D. P. (2005). PGC-1 α Coactivates PDK4 Gene Expression via the Orphan Nuclear Receptor ERR α : a Mechanism for Transcriptional Control of Muscle Glucose Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24), 10684–10694.
- Wullschlegel, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471–484.
- Zhang, G., Swank, D.M., Rome, L.C., 1996. Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenoteomus chrysops*. *J. Morphol.* 229, 71-81.

- Zimmerman, A.M., Lowery, M.S., 1999. Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). *J. Exp. Zoo.* 284, 299-308.
- Yamano, K., Matsuda, N., & Tanaka, K. (2016). The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation, *17*(3), 300–316.
- Yan, B., Zhu, C.D., Guo, J.T., Zhao, L.H., Zhao, J.L. 2013. miR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression. *The Journal of Experimental Biology* 1, 216:1265-9.

8. CAPÍTULO 1

8.1. Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

RESEARCH ARTICLE

Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

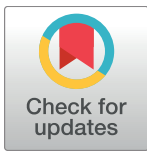
Tassiana Gutierrez de Paula¹, Bruna Tereza Thomazini Zanella¹, Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti¹, Leonardo Nazário de Moraes¹, Bruno Oliveira da Silva Duran¹, Caroline Bredariol de Oliveira¹, Rondinelle Artur Simões Salomão^{1,2}, Rafaela Nunes da Silva¹, Carlos Roberto Padovani³, Vander Bruno dos Santos⁴, Edson Assunção Mareco⁵, Robson Francisco Carvalho¹, Maeli Dal-Pai-Silva^{1,2*}

1 Department of Morphology, Institute of Bioscience of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil, **2** Aquaculture Center, São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil,

3 Department of Biostatistics, Institute of Bioscience of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil, **4** São Paulo Agency for Agribusiness Technology, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil,

5 University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

* maeli@ibb.unesp.br



OPEN ACCESS

Citation: Paula TGd, Zanella BTT, Fantinatti BEdA, Moraes LNd, Duran Bds, Oliveira CBd, et al. (2017) Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). PLoS ONE 12(5): e0177679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679>

Editor: Guillermo López Lluch, Universidad Pablo de Olavide, SPAIN

Received: October 27, 2016

Accepted: May 1, 2017

Published: May 15, 2017

Copyright: ©2017 Paula et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), <http://www.fapesp.br/>, Grants 2013/25915-1, 2014/16949-2 and 2016/00725-3; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), <http://www.cnpq.br/>, Grants 447233/2014 and 302656/2015-4; support to TGP, BTZ, CBO and MDPS.

Abstract

Skeletal muscle is capable of phenotypic adaptation to environmental factors, such as nutrient availability, by altering the balance between muscle catabolism and anabolism that in turn coordinates muscle growth. Small noncoding RNAs, known as microRNAs (miRNAs), repress the expression of target mRNAs, and many studies have demonstrated that miRNAs regulate the mRNAs of catabolic and anabolic genes. We evaluated muscle morphology, gene expression of components involved in catabolism, anabolism and energetic metabolism and miRNAs expression in both the fast and slow muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during food restriction and refeeding. Our analysis revealed that short periods of food restriction followed by refeeding predominantly affected fast muscle, with changes in muscle fiber diameter and miRNAs expression. There was an increase in the mRNA levels of catabolic pathways components (*FBXO25*, *ATG12*, *BCL2*) and energetic metabolism-related genes (*PGC1α* and *SDHA*), together with a decrease in *PPARβ/δ* mRNA levels. Interestingly, an increase in mRNA levels of anabolic genes (*PI3K* and *mTORC1* complex: *mTOR*, *mLST8* and *RAPTOR*) was also observed during food restriction. After refeeding, muscle morphology showed similar patterns of the control group; the majority of genes were slightly up- or down-regulated in fast and slow muscle, respectively; the levels of all miRNAs increased in fast muscle and some of them decreased in slow muscle. Our findings demonstrated that a short period of food restriction in juvenile pacu had a considerable impact on fast muscle, increasing the expression of anabolic (*PI3K* and *mTORC1* complex: *mTOR*, *mLST8* and *RAPTOR*) and energetic metabolism genes. The miRNAs (miR-1, miR-206, miR-199 and miR-23a) were more expressed during refeeding and while their target genes (*IGF-1*, *mTOR*, *PGC1α* and *MAFbx*), presented a decreased expression. The alterations in *mTORC1* complex

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

observed during fasting may have influenced the rates of protein synthesis by using amino acids from protein degradation as an alternative mechanism to preserve muscle phenotype and metabolic demand maintenance.

Introduction

The pacu is a freshwater neotropical characid fish characterized by hardiness, fast growth, adaptation to artificial feeding and tasty meat [1] that has a high market value to Brazilian fisheries and pisciculture [2]. Muscle growth in fish is a complex process controlled by a dynamic balance of anabolic and catabolic molecular pathways and is influenced by several intrinsic and extrinsic factors, such as food availability, water quality, temperature, developmental stage and geographic distribution [3,4]. During conditions that promote the loss of muscle mass, such as food restriction, an increase in the activity of the proteolytic ubiquitin-proteasome system, particularly the ubiquitin-ligases [5], and the autophagy pathway occurs [6]. These events promote increased rates of protein degradation, leading to muscle atrophy [5,6].

Although numerous ubiquitin-ligases have been identified, *FBXO25* (*F-Box Protein 25/ubiquitin protein*), *MURF1* (*Muscle Ring Finger protein-1*) and *MAFbx* (*Muscle Atrophy F-box* or *atrogin*), also known as atrogenes, are E3 ubiquitin-ligase that are up-regulated during increased muscle catabolic activity [7], such as food restriction conditions in fish [4,8–10]. Additionally, atrogenes play a critical role in controlling protein turnover in skeletal muscle to maintain muscle function [11,12].

The major anabolic process responsible for the increase in muscle protein synthesis in mammals and in fish is controlled by *IGF-I* (*insulin-like growth factor-I*) [13]. The *IGF-I* pathway has an important role in the inhibition of muscle protein degradation by blocking the up-regulation of the E3 ubiquitin ligases *MURF1* and *MAFbx* [8].

Studies using mammals have shown that the activation of *mTOR*, a component of two different complexes, *mTORC1* (comprising *mTOR*, *mLST8*, and *RAPTOR*) and *mTORC2* (comprising *mTOR*, *mLST8*, and *RICTOR*) [14–16], ultimately results in the up regulation of key genes that induce muscle mass gain [13–15,17–19].

The anabolic and catabolic signaling pathways of skeletal muscle are controlled by small noncoding RNAs known as microRNAs (miRNAs), and several studies have shown that the miRNAs -1, -206, -23a and -199 inhibit genes that stimulate and repress muscle development and growth [20–22]. Additionally, miR-1, -199 and -206 were shown to control the *IGF-I* gene since its expression levels were inversely proportional to those of the miRNAs [22–24], and miR-23a regulates the expression of *PGC-1a*, an important cofactor of mitochondrial biogenesis, and *MAFbx*, an atrogene with a crucial role in protein degradation [25–27].

Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a tropical fast-growing fish that can attain a large body size [1], and this species is of commercial interest for aquaculture. With the goal to understand the intracellular signaling pathways involved in the regulation of muscle growth in fish, *in vivo* studies have evaluated the impact of feeding/refeeding protocols on muscle growth-related genes, as these protocols promote changes in the homeostasis between muscle catabolic and anabolic states. Additionally, it is unclear whether muscle protein synthesis and degradation operate independently or whether these processes can act together in the control of muscle mass during food restriction/refeeding. Using this approach, we evaluated muscle morphology, mRNA expression of components involved in catabolism, anabolism and energetic metabolism and miRNA expression in both fast and slow muscle of juvenile pacu during food restriction and refeeding.

Material and methods

Ethics statement

All experiments and procedures were carried out in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). This protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use (protocol number 694-CEUA-Ethics Commission on the use of animals) of the Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil. Animals were euthanized with benzocaine at a concentration exceeding 250 mg/L prior to the collection of muscle samples.

Sample collection

Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) were obtained from the Sao Paulo Agency for Agribusiness Technology (APTA), Presidente Prudente, Sao Paulo, Brazil. Juvenile fish (approximately 150 g) were farmed at 28°C under a natural photoperiod (12 hours of light: 12 hours of dark) in storage tanks of 0.5 m³ equipped with separate systems of water circulation. Fish were acclimatized for 1 week under satiety feeding conditions. At the beginning of the experiment, food was withdrawn from the fish for 10 days (fasting condition) followed by 60 hours of refeeding. Samples of fast muscle were collected from the epaxial region, near the head, and slow muscle samples were collected near the lateral line. Muscle samples were collected at zero (Control group—C) and 10 days of fasting (Fasting group—F) and after 6 (Refeeding group—R6) and 60 hours of refeeding (Refeeding group—R60).

Morphometric analysis

Fast and slow muscles samples were collected and quickly frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C before sectioning. Muscle histological cryosections (10 µm) from the C, F and R60 groups were cut and stained using the hematoxylin-eosin (HE) method [28]. Muscle fiber diameters were determined by measuring 1000 fast and slow muscle fibers from each animal (8 animals) per group, using a compound microscope attached to a computerized imaging analysis system (Leica Qwin, Wetzlar, Germany) [29]. The fiber diameter (D) was estimated indirectly from individual fiber area (A) using the formula $D = \sqrt{4A/\pi}$ [30]. For each group, muscle fiber diameters were grouped into classes (<30; 30–50; 50–70; 70–90 and >90 µm) based on Johnston [31] and de Almeida et al. [32]. Muscle fiber frequency in the classes corresponds to the number of fibers from each diameter class relative to the total number of fibers measured.

Succinate dehydrogenase (SDH) analysis

SDH analysis was used as an indicator of muscle fiber oxidative capacity in fast and slow muscle and was performed as described by Nachlas et al. [33]. Transverse cryosections (10 µm) of muscle from the C, F and R60 groups were placed on the same slide to minimize staining differences. The cryosections were incubated with 5 ml of 0.2 M sodium succinate solution and 10 ml aqueous solution of nitro blue tetrazolium (NBT, 1 mg/ml). The samples were incubated for 20 to 30 minutes at 37°C, washed in saline, fixed subsequently in formol saline for 10 minutes, rinsed in 15% ethanol for four/five minutes and mounted in Permount. To analyze SDH activity, images of all samples were captured using a microscope (40X magnification) attached to a computerized imaging analysis system. The light intensity and filter alignment parameters used were the same for all samples. Quantitative analysis of SDH staining intensity was determined by measuring the background staining (gray scale) with Image Analysis System Software (Leica Qwin, Germany).

Gene expression analysis of mRNAs and miRNAs involved in anabolic and catabolic processes

Total RNA was extracted from fast and slow muscle samples in the C, F, R6 and R60 groups for mRNA analysis using TRIzol[®] Reagent (Life Technologies, USA), according to the manufacturer's recommendations. The RNA quantification was performed using the spectrophotometer NanoVue[™] Plus (GE Healthcare, USA), which also determined the RNA purity by measuring the absorbance at 260 nm (RNA quantity) and 280 nm (protein quantity). Only samples with 260/280 ratio ≥ 1.8 were used. The RNA integrity was evaluated through capillary electrophoresis in the 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA), which provided a RNA integrity number (RIN) based on the 28s and 18s ribosomal RNAs. Only samples with RIN ≥ 7.0 were used. Extracted RNA was treated with DNase I Amplification Grade (Life Technologies, USA) to eliminate any possible contamination with genomic DNA from the samples. mRNA reverse transcription was performed using the GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega, USA), following the manufacturer's guidelines. miRNA expression was assessed in the C, F and R60 groups using a TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, USA) combined with TaqMan[®] MicroRNA Assays (Life Technologies, USA), according to the protocol instructions.

The expression levels of miRNAs and mRNAs were assessed by quantitative real-time PCR (qPCR) using the QuantStudio[™] 12K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). Each cDNA sample corresponding to a miRNA was amplified by TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Life Technologies, USA) and TaqMan[®] MicroRNA Assays (Life Technologies, USA), which contain primers and specific probes to miR-1, miR-199, miR-23a, miR-206 and U6 snRNA (endogenous control) (S1 Table, S1 File). The cDNA samples corresponding to the mRNA of the genes analyzed were amplified by GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, USA), and primers were synthesized by Life Technologies (USA), which were designed using Primer Express 3.0.1[®] (Life Technologies, USA) (S2 Table). The expression levels were normalized by *GAPDH*, whose expression was constant among all samples. The relative quantification of gene expression was performed by the comparative Ct method [34] using Data Assist 2.0 (Life Technologies).

Heat map summary of clustering of catabolic, anabolic and energetic metabolism data

To establish relationships among all the components of the signaling pathways studied, a heat map summary and hierarchical clustering analysis were performed using the Ct data and the R Bioconductor packages *gplots* (version 3.0.1) and *heatmap.2* (version 3.0.1). Clustering and seriation were based on Pearson's correlation coefficient of z-score normalized abundance values (scaled from 0 to 1).

Statistical analysis

Muscle fiber diameter data are expressed as frequency percentage and were analyzed by a Goodman test between and within multinomial population [35]. The SDH evaluation and mRNA and miRNA relative expression were analyzed by Kruskal-Wallis Test followed by Dunn's multiple comparisons test [36]. Statistical significance was set at $P < 0.05$ for all analyses.

Results

Morphometric analysis

The muscle morphology of fast and slow muscle showed round and polygonal fibers distributed in a mosaic pattern characterized by fibers of different diameters (Fig 1). Comparing to

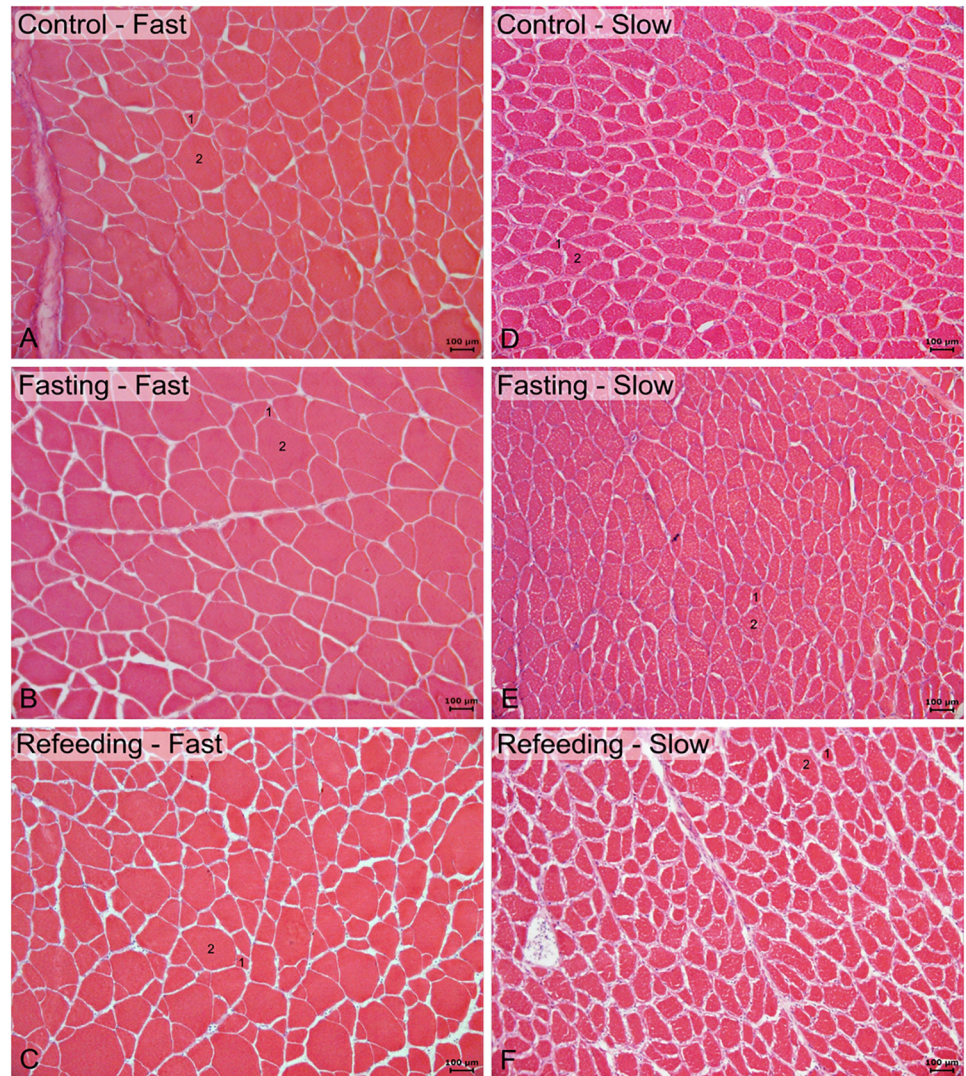


Fig 1. Hematoxylin and eosin (HE) staining showing fast muscle (left side) and slow muscle (right side). A and D: Control (C) group. B and E: Fasting (F) group. C and F: Refeeding (R60) group. Round and polygonal fibers distributed in a mosaic pattern characterized by small (1) and large fibers (2). Scale bar: 100 µm.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g001>

the C group, during food restriction, there were a decrease in the frequency of fast muscle fiber diameter in the 50–70 µm; slow muscle presented a decrease in muscle fiber diameter in the classes from 50 to 90 µm and an increase in fiber frequency in the 30–50 µm class occurred. After the refeeding period, only slow muscle showed increases in the frequency of fibers in the 50–70 µm class compared with the F group (Fig 2).

Succinate dehydrogenase (SDH) analysis

As a general indicator of muscle fiber oxidative capacity in both fast and slow muscles, we measured SDH activity. The results showed differences in SDH activity between fast and slow muscle (data not show) and among the groups evaluated. We observed an increase in SDH

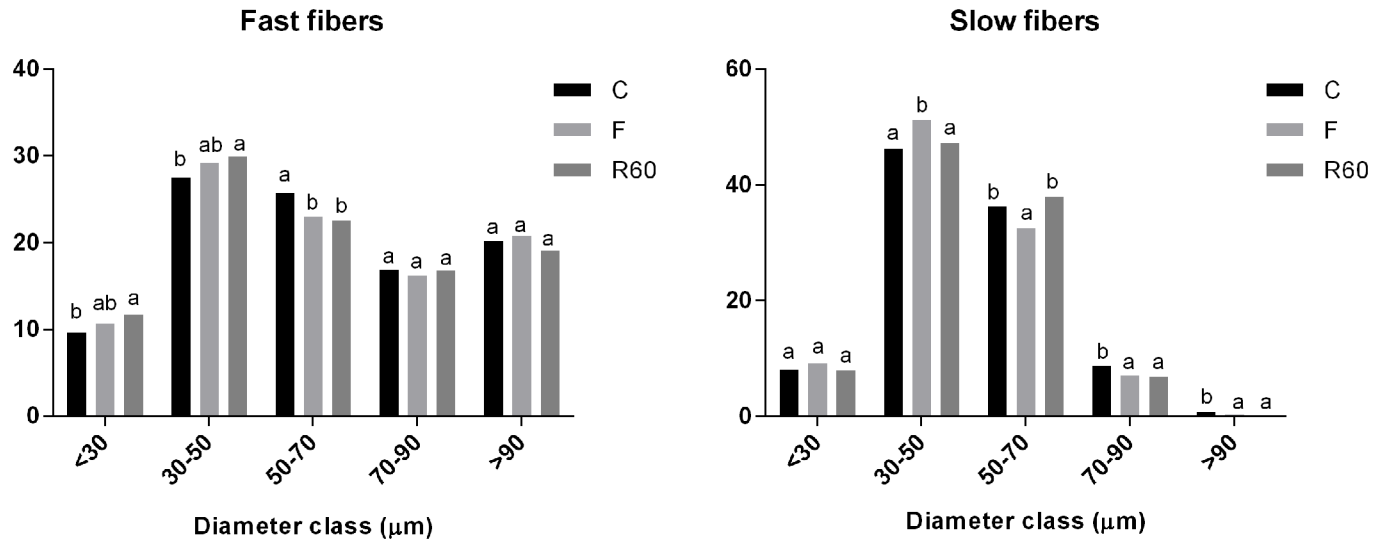


Fig 2. Frequency distribution of fast and slow muscle fibers of pacu juveniles. Control, before fasting (C); after 10 days of fasting (F) and after 60 hours of refeeding (R60). Letters in the columns compare the frequency of fibers between the groups. Values with the same letters are not statistically significant between the periods ($P < 0.05$, Goodman test).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g002>

activity in fast muscle in F compared with the C and R60 groups. In slow muscle, SDH activity was higher in R60 than that of the C and F groups (Fig 3).

Gene expression in fast and slow muscle: Fasting and refeeding periods

In fast muscle of pacu, a fasting period promoted an increase in the expression of the catabolic genes *ATG12* (Related Autophagy 12/Ubiquitin-like), *BCL2* (B-cell CLL/Lymphoma 2) and *FBXO25* (F-Box Protein 25/ubiquitin protein), the anabolic gene *PI3K* (Phosphatidylinositol 3 Kinase, Catalytic Subunit Type 3), and the *mTORC1* complex components, *mLST8* (Target of rapamycin subunit complex LST8), *mTOR* (Target of Mechanistic Rapamycin) and *RAPTOR*

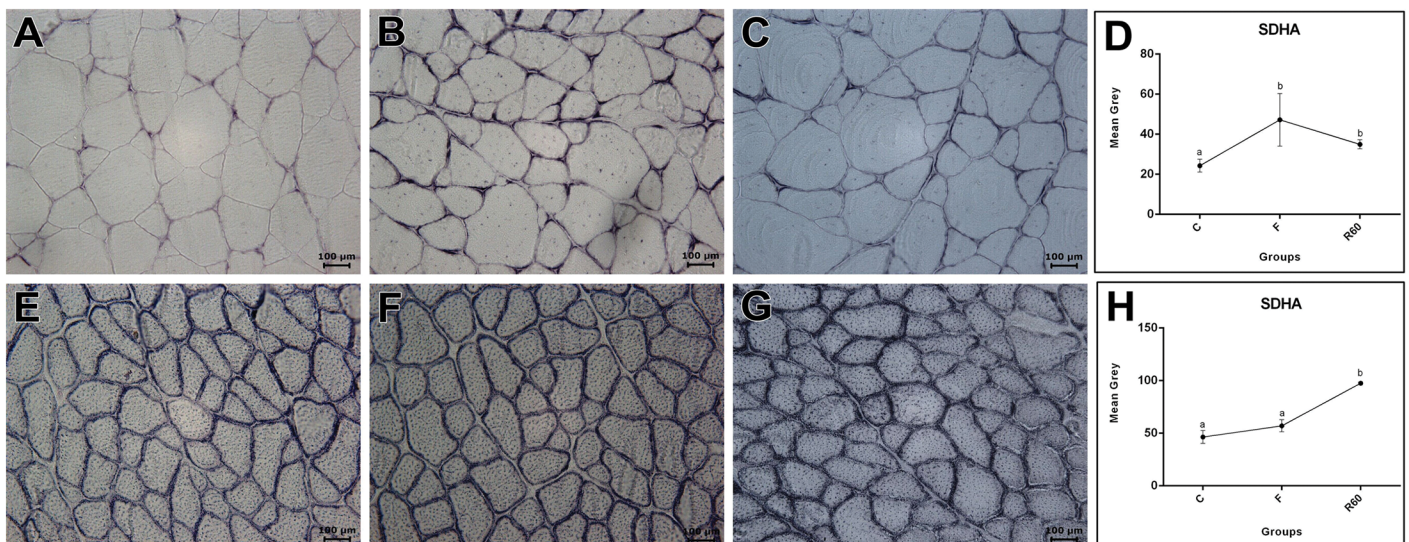


Fig 3. Succinate dehydrogenase (SDH) histochemistry reaction in fast (top) and slow (down) muscles. A and E: Control (C) group. B and F: Fasting (F) group. C and G: Refeeding (R60) group. Scale bar: 100 μm . Assessment of SDH activity in fast (D) and slow (H) muscle.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g003>

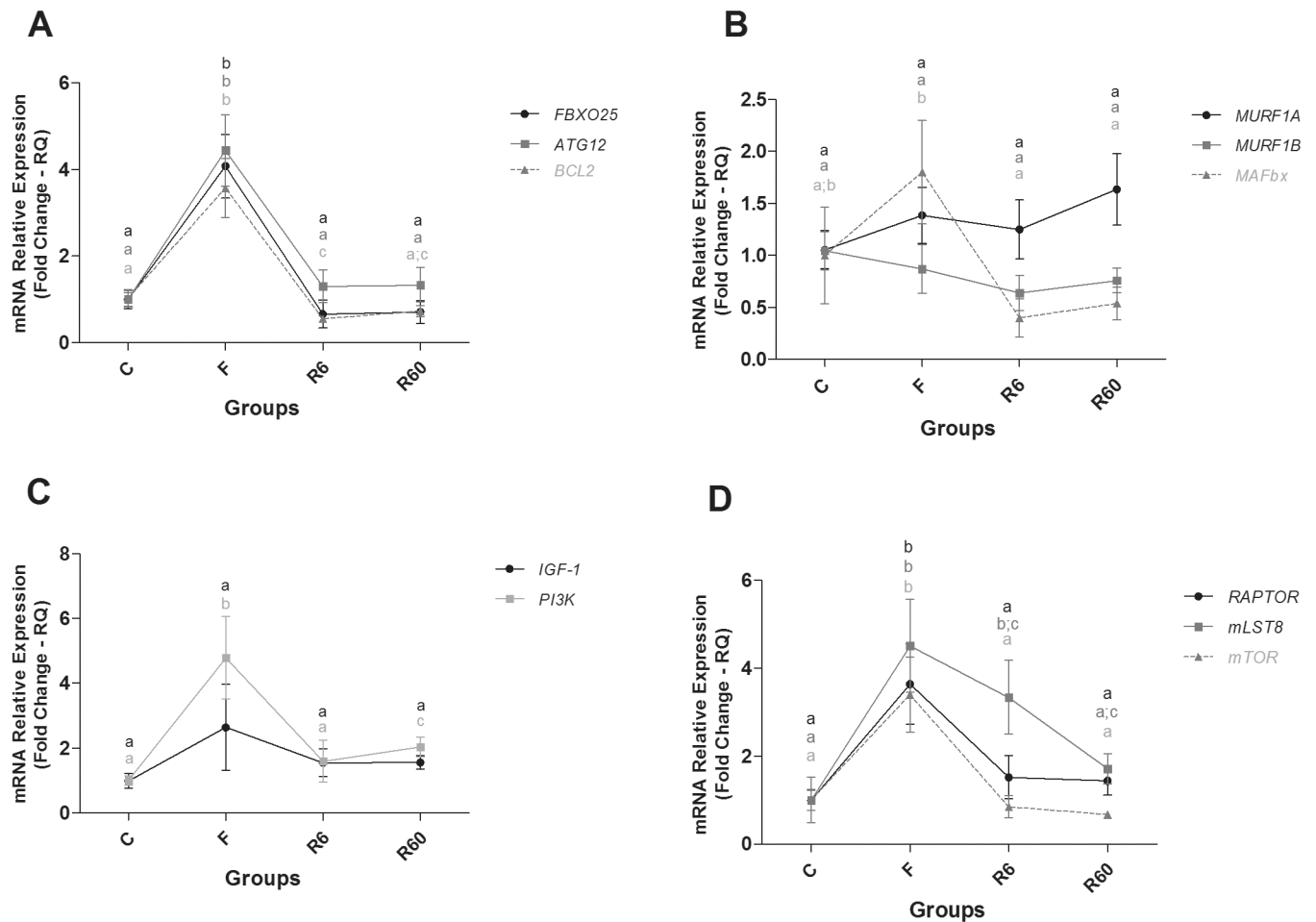


Fig 4. Relative mRNA expression of catabolic and anabolic pathway components in fast muscle. Groups C (control), F (fasting—10 days of fasting), R6 (6 hours of refeeding) and R60 (60 hours of refeeding). The data are expressed as fold change. Different letters indicate significant differences in expression between the groups ($P < 0.05$). The data are presented as the mean \pm SEM ($n = 8$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g004>

(subunit complex *mTORC1*), compared with the C group. The expression of genes related to energy metabolism, such as *SDHA* (*Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A, Flavoprotein*) and *PGC1 α* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1*), was high compared with the C group, and the *PPAR β/δ A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/Delta isoform*) level decreased compared with the C group.

After 6 and 60 hours of refeeding, most catabolic genes showed decreased expression levels compared with the F group, which was similar to the C group. R6 also showed decreased *BCL2* gene expression compared with the C group. Regarding anabolic genes, R6 had similar *PI3K* expression to that of the C group, which was lower than R60. The components of the *mTORC1* complex, *mTOR* and *RAPTOR*, were decreased compared with F, which was similar to the C group, whereas *mLST8* gene expression levels decreased gradually from the F to R60 groups. *SDHA* gene expression decreased in R6 and R60 compared with F and was high compared with the C group. *PGC1 α* gene expression in R6 and R60 was decreased compared with F, and it was similar to the C group; *MyoD* gene expression decreased in R6 compared with F and R60 and *PPAR β/δ A* gene expression increased during the refeeding period, with R6 being similar to C group and R60 lower than that of the C group (Figs 4 and 5).

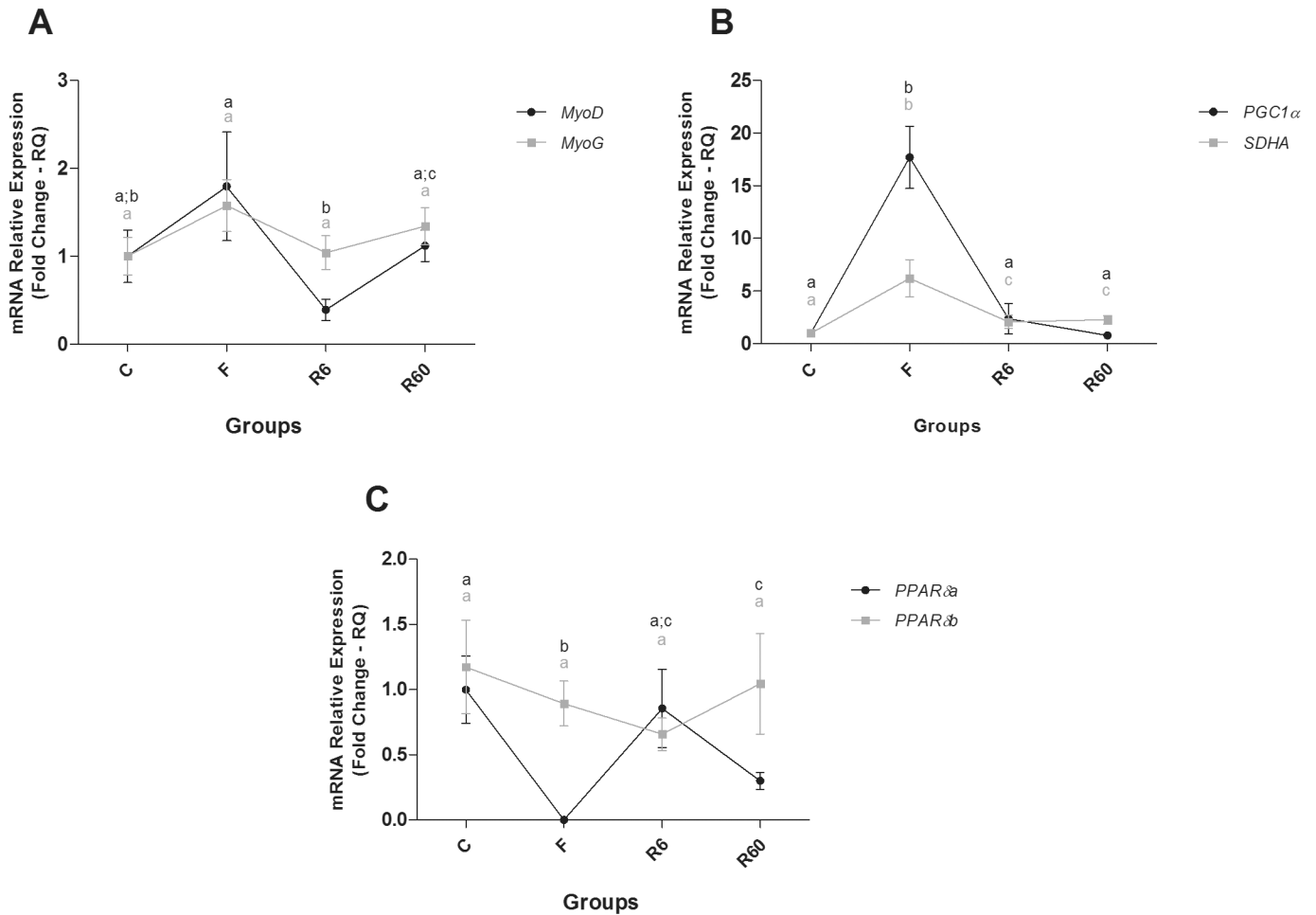


Fig 5. Relative mRNA expression of anabolic pathway and energetic metabolism components in fast muscle. Groups C (control), F (fasting—10 days of fasting), R6 (6 hours of refeeding) and R60 (60 hours of refeeding). The data are expressed as fold change. Different letters indicate significant differences in expression between the groups ($P < 0.05$). The data are presented as the mean \pm SEM ($n = 8$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g005>

In slow muscle of pacu, ten days of fasting promoted a slight change in gene expression. There was increased expression of the catabolic gene *MAFbx* (also called *FBOXO32* or *Atrogin-1*) and of genes related to energy metabolism, *PGC-1α* and *PPARβ/δB*, compared with the C group. After 6 hours of refeeding (R6), *MAFbx* gene expression decreased compared with F, and it was similar to the R60 group. *ATG12* gene expression was higher in R60 than that in the R6 group. *FBXO25* gene levels decreased in R6 compared with the F and R60 groups. *MURF1A* gene expression in R60 decreased in comparison to the C group. With regard to anabolic gene expression, only a component of the *mTORC1* complex, *mLST8*, was higher in the R60 group compared with the C group; *PGC1α* gene expression decreased in R6 compared with F and increased compared with the R60 group. *PPARβ/δB* gene expression was lower in R6 than in the C and F groups. *PPARβ/δB* gene expression in R6 was similar to R60, which was lower than that of the F group. After 60 hours (R60) of refeeding, the *MAFbx*, *mLST8*, *PGC1α*, and *MYOG* genes were significantly higher in R60 than in C group; the *MURF1A* gene was significantly lower in R60 than in C group. *MyoD* gene expression increased in R60 compared with R6, and *MYOG* gene expression increased in R60 compared with C, F and R6 groups. *PPARβ/δB* gene expression was significantly lower in R60 compared with the C group (Figs 6 and 7).

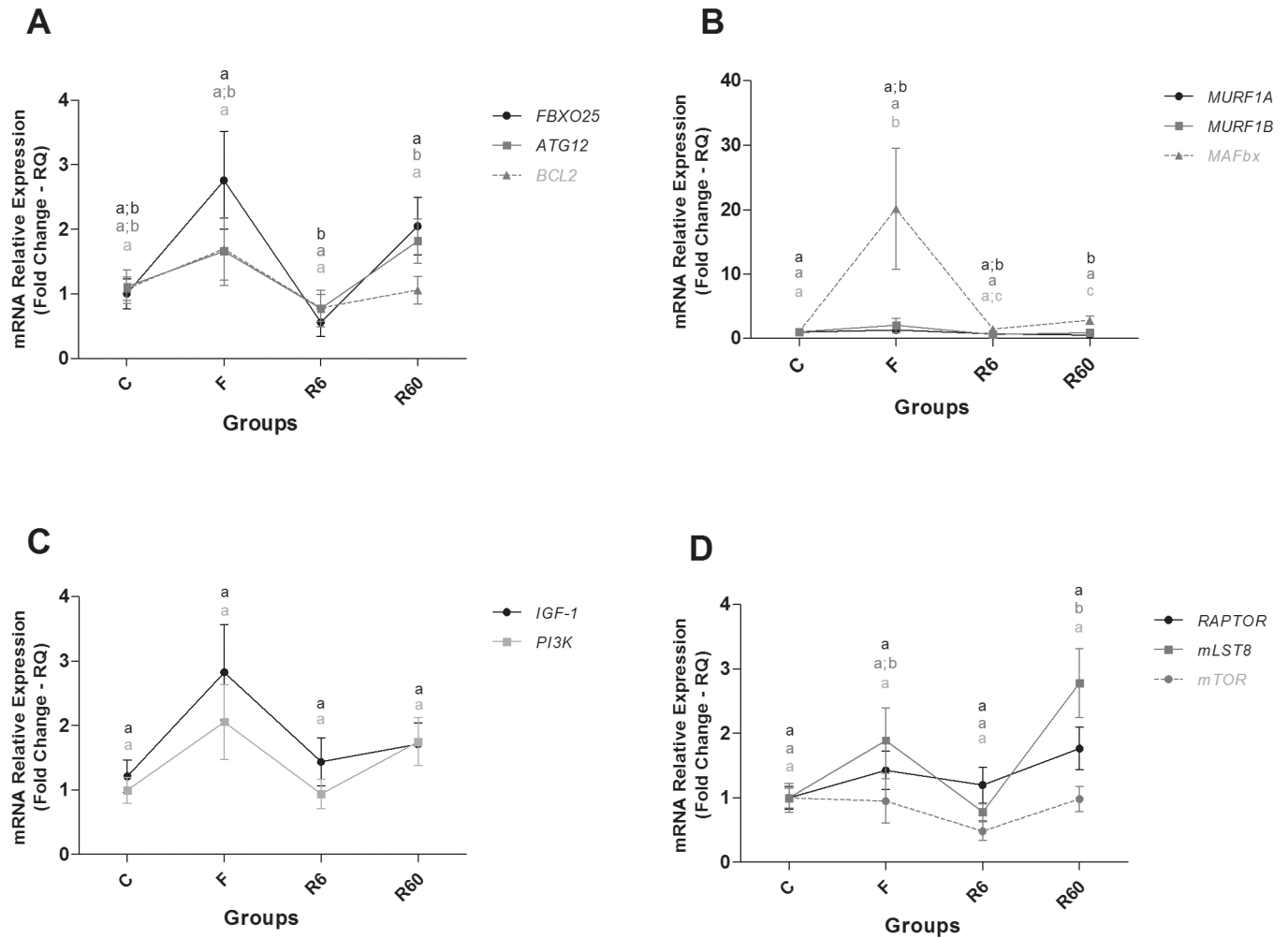


Fig 6. Relative mRNA expression of catabolic and anabolic pathway components in slow muscle. Groups C (control), F (fasting—10 days of fasting), R6 (6 hours of refeeding) and R60 (60 hours of refeeding). The data are expressed as fold change. Different letters indicate significant differences in expression between the groups ($P < 0.05$). The data are presented as the mean \pm SEM ($n = 8$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g006>

miRNAs expression in fast and slow muscle: Fasting and refeeding period

In order to complement our experiment, we performed a comparison of the miRNA target sites at the 3'UTR of the examined mRNAs between different species of vertebrates (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Danio rerio* and *Piaractus mesopotamicus*) using Geneious 4.8.5 software [37]. The comparisons revealed a considerable conservation of the 3'UTR nucleotide sequences between the species (S1 File).

RNAhybrid software [38] was used for target prediction. The sequences of the miRNAs (mature) were obtained from the miRBase database [39]. The 3'UTRs were obtained from the pacu published transcriptome [40]. We performed a target prediction between miR-1/*IGF-1*, miR-206/*IGF-1*, miR-199/*IGF-1*, miR-199/*mTOR*, miR-23a/*MAFbx*, and miR-23a/*PGC1 α* . The free energy of hybridization considered was ≤ -18 , providing a potential binding site through nucleotide base complementarity. The free energy observed was within the accepted ranges (S2 File).

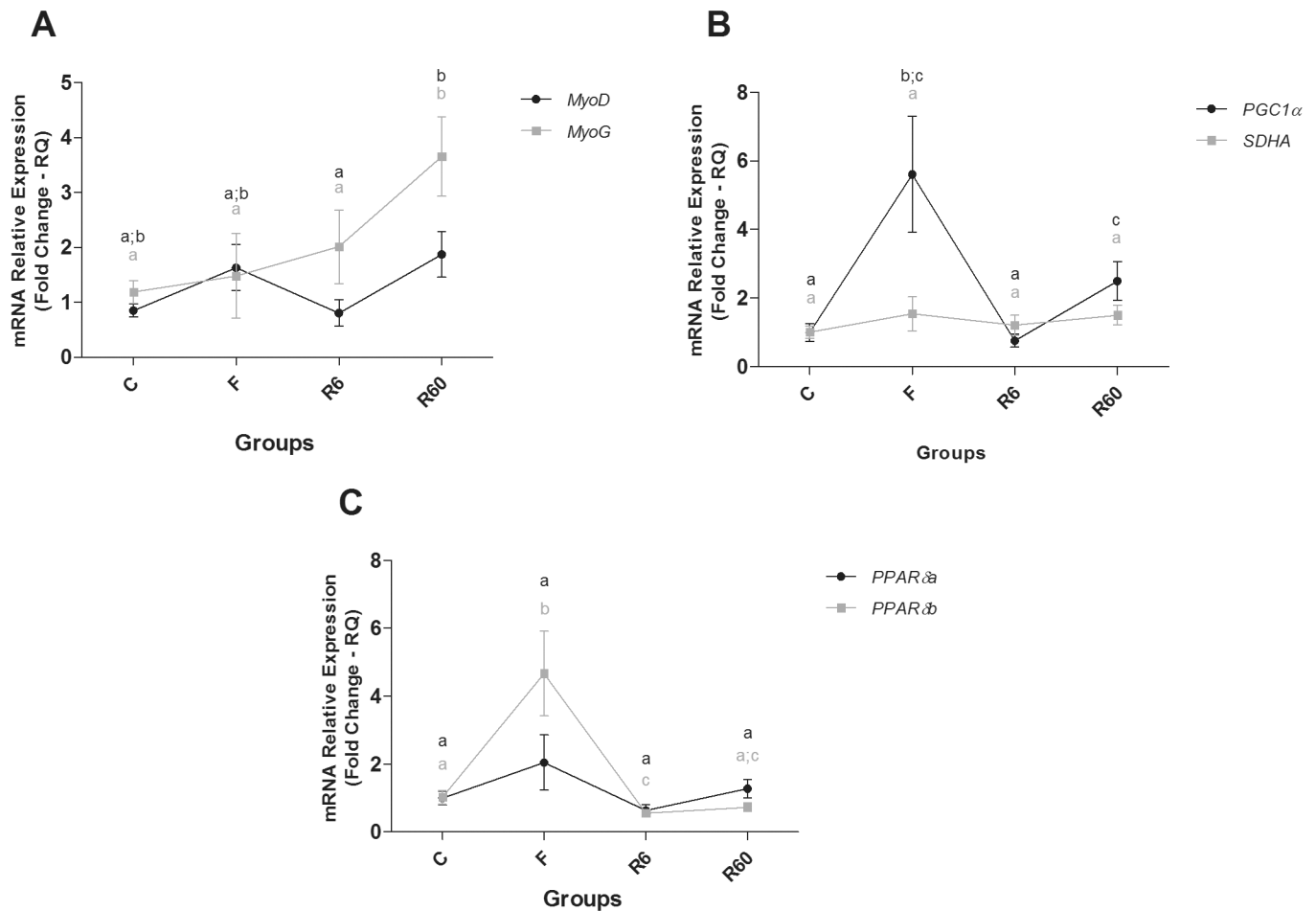


Fig 7. Relative mRNA expression of anabolic pathway and energetic metabolism components in slow muscle. Groups C (control), F (fasting —10 days of fasting), R6 (6 hours of refeeding) and R60 (60 hours of refeeding). The data are expressed as fold change. Different letters indicate significant differences in expression between the groups ($P < 0.05$). The data are presented as the mean \pm SEM ($n = 8$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g007>

We observed changes in the expression of miRNAs that control catabolic and anabolic genes predominantly in fast muscle. The expression level of miR-1, miR-206, miR-199 and miR-23a was significantly higher in R60 than in the C and F groups in fast muscle, whereas in slow muscle, miRNAs -1 and -206 were significantly lower in R60 than in the C and F groups (Fig 8).

Discussion

In the current study, we showed that short periods of food restriction followed by refeeding promoted changes in muscle fiber diameter, in gene expression of components involved with catabolism, anabolism and energetic metabolism and in miRNAs in both fast and slow muscle of juvenile pacu. Fast muscle was more affected in response to 10 days of food deprivation; we observed a decrease in muscle fiber diameter, an increase in the expression level of *FBXO25*, *ATG12*, *BCL2*, *PI3K*, the *mTORC1* complex (*mTOR*, *mLST8* and *RAPTOR*), *PGC1α*, *SDHA* and a decrease in *PPARβ/δA* gene expression compared with the C group. Slow muscle showed a decrease in muscle fiber diameter and slight changes in gene expression, with an increase in the levels of *MAFbx*, *PGC1α* and *PPARβ/δB* compared with the C group.

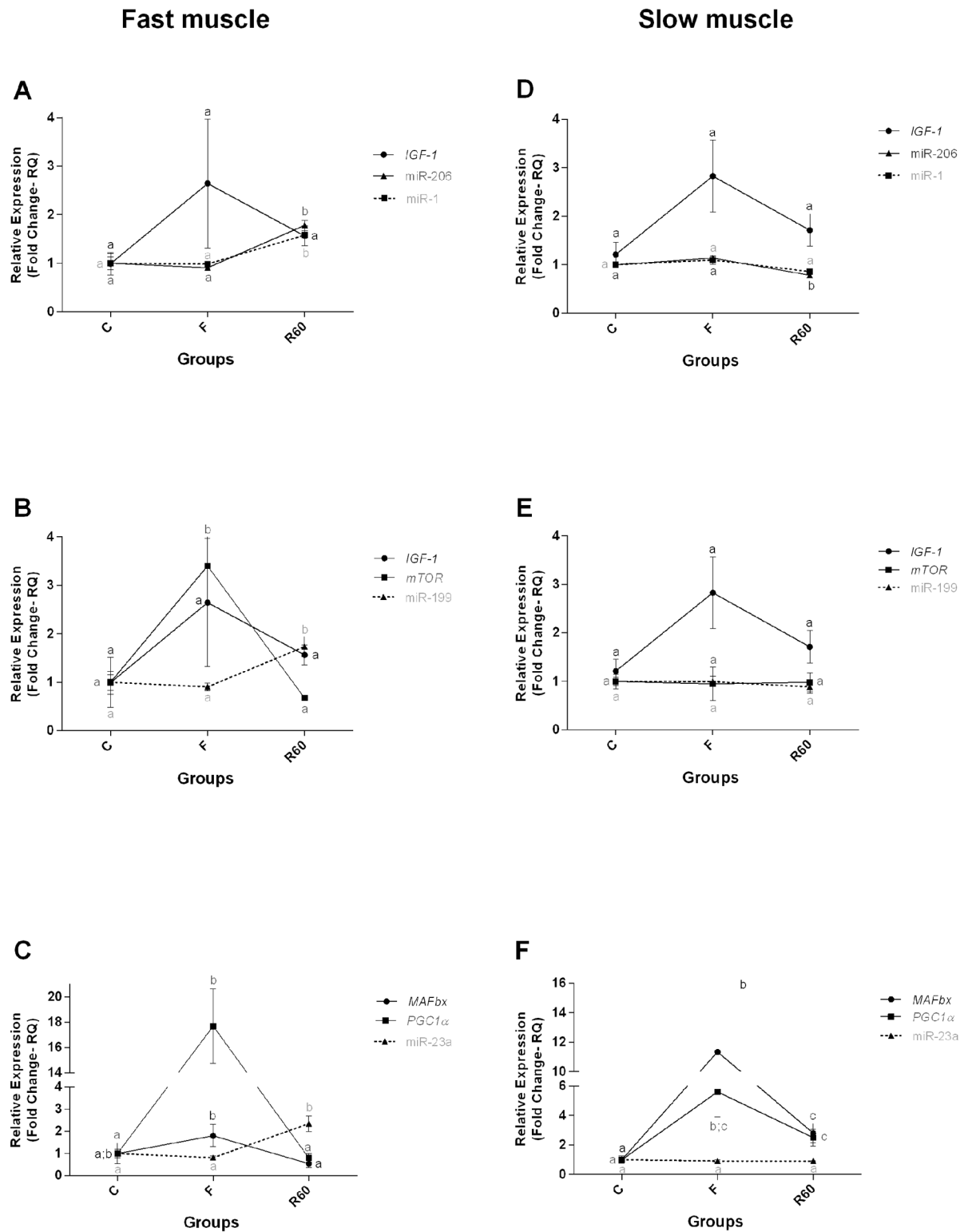


Fig 8. Relative expression of miRNAs and their target genes in fast and slow muscle. Groups C (control), F (fasting—10 days of fasting) and R60 (60 hours of refeeding). The data are expressed as fold change. Different letters indicate significant differences in expression between the groups ($P < 0.05$). The data are presented as the mean \pm SEM ($n = 8$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177679.g008>

After 6 and 60 hours of refeeding, most genes were slightly up- or down-regulated in both fast and slow muscle.

Changes in muscle fiber diameter are observed during fasting conditions [41–43], and the decrease in both fast and slow muscle fiber diameter observed in our study is indicative of muscle catabolism. Additionally, based on the morphometric analysis, we can infer that after 60 hours of refeeding, only slow muscle recovered the muscle fiber area.

Muscle catabolism is regulated by several mechanisms, and the ubiquitin proteasome system (UPS) is the best-known cellular proteolytic system responsible for the degradation of the majority of cellular proteins [5,44]. The UPS system is composed of ubiquitin-activating enzymes (E1), ubiquitin carrier protein (E2) and ubiquitin-conjugating enzymes (E3 ubiquitin ligases), such as *MURF1*, and F-box proteins, such as *FBXO25* and *MAFbx*, which are responsible for muscle protein recognition, ubiquitination [45–48] and degradation [8]. Cleveland and Evenhuis [49] showed that *MAFbx* expression strongly increased in fast and slow muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 28 days of feed deprivation, with a decreased level after refeeding periods and no alterations in *FBXO25* expression in both fast and slow muscle. Fuentes et al. [50] examined juvenile fine flounder (*Paralichthys adspersus*) after 21 days of feed deprivation and observed increased expression of *MAFbx* and *MURF1* in fast muscle and decreased levels after four weeks of refeeding.

In our study, the high expression of *MAFbx*, *FBXO25* and *ATG12* after 10 days of fasting suggested increased muscle protein degradation, which was more intense in fast muscle. After 6 hours of refeeding, a decrease in gene expression of atrogenes in both muscles indicated strong anti-atrophic conditions during the onset of refeeding, whereas 60 hour after refeeding, red muscle presented an increased expression pattern of atrogenes (heat map analysis, S3 File).

Autophagy is an intracellular recycling system that plays important roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis [48,51]. During stress conditions, increased levels of autophagy are important for cells to adapt to changing nutritional and energy demands; degradation of cellular components, such as proteins, returns these materials to the cells as “building blocks” [48,51]. However, excessive activation of autophagic pathways can promote cell death [6,48,51]. *BCL2* is an anti-autophagy and anti-apoptotic protein that interacts with pro-apoptotic and pro-autophagy proteins in nutrient-limited conditions, preventing the apoptosis in muscle tissue. He et al. [52], showed that in mutant mice to *BCL2* (a model of exercise/starvation), muscle cell autophagy increased. Thus, we hypothesized that high expression of *BCL2* during feed restriction in fast muscle of pacu could represent a compensatory mechanism to prevent extreme loss of muscle mass, which was more intense in fast muscle.

Also is know that autophagy is post-translationally inhibited by the *mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)*, which is under the control of the *insulin-phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt* pathway [6,48,53,54]. Under basal conditions, *mTORC1* inhibits the protein *ULK1* through selective phosphorylation. Jamart et al. [54] studied the *ULK1* complex in rats subjected to a period of fasting and exercise and observed that activation of the *ULK1* complex depends on *mTORC1* inhibition, which was also observed by Desgeorges et al. [55] in cell culture (C2C12) under starvation conditions. Thus, it is possible that the basal expression levels of *ULK1* (A and B) in fast muscle and the *ULK1B* in slow muscle during fasting in pacu are involved in *mTORC1* complex activation in this period, as noted in our experiment (heat map analysis, S3 File).

In our study, we demonstrated that the components of the *IGF1/PI3K/ Akt/mTORC1* (*mTOR*, *mLST8* and *RAPTOR*) pathway were changed after food restriction and refeeding in both fast and slow muscle. *IGF-1*, a potent key regulator of muscle hypertrophy, promotes the activation of *PI3K*, which leads to the phosphorylation of the *AKT* and the *mTORC1* complex (mammalian target of rapamycin), resulting in protein synthesis [9,50,56–59].

Mareco et al. [60] described an increase in the *IGF-I* and *IGF-II* mRNA levels in the fast muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (15 g) during fasting conditions (~ 2 days of fasting) and a decrease in the expression level during satiation feeding for 24 h. Valente et al. [61] observed in juvenile salmon (*Salmo salar* L.) after 3 weeks of fasting a difference in the expression patterns of *IGF-I* and *IGF-II*, with an increase in *IGF-I* and a decrease in *IGF-II* mRNA expression after refeeding periods. Fuentes et al. [62] also described a gradual decrease in the levels of plasma *IGF-I* in juvenile fine flounder (*Paralichthys adspersus*) during long-term of fasting (4 weeks), and following the refeeding, plasma *IGF-I* levels increased significantly.

Decreased *IGF-I* mRNA expression in starved fish muscle has been described previously [17,61,63,64], although distinct variations in the responses were observed. This fact could be related to the fasting/refeeding conditions and developmental and/or growth stage. In our experiment, increased expression levels of genes involved in the *IGF1/PI3K/(PIK3C3)/Akt/mTORC1* pathway were observed in fast and slow muscle after 10 days of food restriction. We observed a high level of *PI3K* and *mTORC1* complex (*mTOR*, *mLST8* and *RAPTOR*) expression in fast muscle, and in slow muscle, only the expression level of the subunit *mLST8* was increased in the R60 group compared with the C group.

To our knowledge, the present study demonstrates for the first time, in pacu fish, that fasting conditions increase gene expression of *mTORC1* complex in fast and slow muscle. Functional analysis in mouse and human cells culture, showed a possible physiological activation of *mTORC1* in response to feeding promoting increased expression of genes encoding proteasome subunits, increasing the intracellular pool of amino acids thus influencing the rates of protein synthesis [58]. In view of this, the results of our study indicate that possibly, as well as in mammals, the amino acids resulting through protein degradation in skeletal muscle of pacu, triggered by a stress situation (food restriction), could be important for synthesis of proteins needed for adaptation to starvation, through the activation of the *mTORC1* complex.

Metabolic adaptation is important for organism survival during starvation and long chain fatty acids, saturated and unsaturated (LCFAs), are used as a primary energy source for skeletal muscle to adapt to starvation conditions [65–68]. LCFAs regulate energy metabolism primarily by acting as an agonistic ligand of *PPAR α* , β and γ , members of a nuclear receptor family of transcription factors expressed in skeletal muscle. A study using *PPAR α* KO mice demonstrated a low metabolic rate and showed that these mice were unable to use fatty acids during fasting, indicating that KO mouse are reliant on protein breakdown for energy for survival; 24 h of fasting, blood urea was higher in the *PPAR α* KO mice than in wild type controls, and genes for the urea cycle and protein catabolism pathways were induced in these animals [69].

In our study, the fasting period promoted an increase in the transcriptional levels of *PPAR β/δ s* (A and B) in slow muscle and an abrupt decrease in fast muscle. As slow muscle has a high concentration of lipids in comparison to fast muscle [41], the high level of *PPAR* may be involved in oxidation of lipids for energy during food restriction periods [41,70]. As described by Johnston and Goldspink [70] in *Pleuronectes platessa*, during starvation, depletion of lipid reserves in the liver and muscle occurred initially, followed by muscle protein degradation. These findings can explain the higher protein breakdown in fast muscle in pacu during the fasting period.

Johnston and Goldspink [70] also described an increase in the mitochondria number in fast muscle of starved *Pleuronectes platessa*. When the rates of protein degradation are high, the transcription factor *PGC1 α* (*Peroxisome proliferator-activated coactivator-1 alpha*) increases as a possible animal adaptation to an attempt to maintain the basal metabolic processes of the muscular mass [59,71–78]. We hypothesized that high expression of *PGC1 α* in both fast and slow muscle in pacu after 10 days of fasting may be an adaptation to maintain the muscle metabolic demand during food restriction. The high *PGC-1 α* levels (approximately 20-fold

increase) in fast muscle may help remodel the muscle metabolism from glycolytic to oxidative by mitochondrial biogenesis, increasing the capacity for ATP generation (glycolytic: 2 ATP; oxidative: ~36 ATP) [4,41] during this condition, which was also confirmed by the high succinic dehydrogenase quantification.

Considering the difference between the fast and slow muscle metabolism [41] and that slow muscle shows less degradation in stress conditions, such as starvation [41], we hypothesized that the results observed in the R60 group (S3 File) could be a result of increased protein turnover [58]. However, more studies are needed to better understand the role of pathways controlling fast and slow muscle plasticity during fasting/refeeding conditions.

We also analyzed the expression of miRNAs -1, -206, -199 and -23a in fast and slow muscle and observed an inverse correlation between the expression of all miRNAs and their targets mRNAs after refeeding compared with the C and F groups in fast muscle.

Bioinformatics analysis demonstrated a possible interaction between miR-1 and the *IGF-1* gene [23]. The authors also confirmed the interaction of miR-1 and the *IGF-1* gene in cell culture and in cardiac muscle cells of animals subjected to cardiac hypertrophy, where inverse expression between miR-1 and its target, *IGF-1*, was observed. Moreover, miR-206 was also shown to regulate *IGF-1* mRNA expression, influencing muscle hypertrophy. Yan et al. [24], identified an inverse relationship between miR-206 expression and *IGF-1* mRNA expression in tilapias transfected with a miR-206 antagomir, in which fish that had a loss-of-function of this miRNA showed higher *IGF-1* mRNA expression. Shan et al. [79], using target prediction of miRNAs -1 and -206 by bioinformatics and luciferase analyses, also found an inverse relationship between the miRNAs miR-1 and miR-206 and *IGF-1* protein expression in the cardiac muscle of rats with myocardial infarction.

Additionally, miR-199 also potentially regulates the *IGF-1* pathway, inhibiting the mRNA expression of *IGF-1* and *mTOR* [22]. The authors overexpressed miR-199 in cell culture (C2C12) and observed a decrease in *IGF-1* and *mTOR* expression levels; when miR-199 was knocked down, there was an increase in *IGF-1* and *mTOR* target mRNA. In our experiment, although we did not observe a statistical difference in *IGF-1* mRNA expression between the periods analyzed, the expression tended to decrease 60 hours after refeeding compared with the fasting period. We believe that the *IGF-1* expression pattern may have been influenced by the increase in miRNAs -1, -206 and -199 in fast muscle during the refeeding period. Notably, an important component of the *IGF-1* pathway, *mTOR*, had an inverse correlation with its regulator, miR-199, in both musculatures.

During the refeeding period the expression of miR-1 and miR-206 in slow muscle of pacu did not show an inverse expression pattern with *IGF-1* gene expression. As the same miRNA can regulate the expression of many different targets, and the same gene can also be regulated by more than one miRNA [80,81], we hypothesized that the decrease in miR-1 and miR-206 expression in slow muscle of pacu after refeeding may be related to the regulation of others genes that we did not analyze.

From the fasting to refeeding period, the fast muscle of juvenile pacu also showed an inverse correlation between the expression of miR-23a and the catabolic gene *MAFbx*. The increase in this miRNA is related to the translational suppression of the atrogenes *MAFbx* and *MuRF1*, as demonstrated both *in vitro*, in cell culture (C2C12) transfected with miR-23a and subjected to dexamethasone-induced atrophy, and *in vivo*, in transgenic mice expressing miR-23a and subjected to dexamethasone-induced atrophy [26]. Consistent with these results, we believe that the increase in miR-23a after refeeding in fast muscle possibly is related to a decrease in *MAFbx* expression when fast muscle catabolism decreased due to the increase of nutrients available. In addition to the interaction with *MAFbx*, miR-23a also has a role in the inhibition of *PGC-1 α* [25,27] an essential cofactor of mitochondrial biogenesis [82,83]. In our study, we

found an increase in *PGC-1 α* gene expression during the fasting period, with a decrease after 60 hours of refeeding in both musculatures and an increase in miR-23a expression only for fast muscle. Decreased expression of miR-23a was correlated with increased *PGC-1 α* in mice subjected to endurance exercise after 3 hours of activity [27]. Moreover, Russel et al. [25] also found this relationship in both cell culture (C2C12) and in transgenic mice overexpressing miR-23a. Thus, we believe that the decrease in this gene during the refeeding period was influenced by increased miR-23a in this same period in fast muscle.

Similar to the mRNA expression, fast muscle presented more differences in the miRNA expression pattern compared to slow muscle. Chu et al. [84] described, in juvenile *Siniperca chuatsi*, that several miRNAs highly expressed in fast muscle had lower expression in slow muscle and that miRNAs highly expressed in slow muscle had lower expression in fast muscle. This finding was also observed in our laboratory, where a difference in miRNA expression between fast and slow muscles in pacus during development was described [85]. Similar results were found in the present experiment, where we observed an increase in miR-1 and miR-206 expression in fast muscle and a decrease of miR-206 in slow muscle after refeeding, also described by Wiberg et al. [86] in the soleus and gastrocnemius of mice subjected to denervation.

The expression of miRNAs -23a and -199 also differed between fast and slow muscles, with increased expression in fast muscle during refeeding and no statistical differences in slow musculature. This finding highlights that in addition to more changes in mRNA expression of catabolic and anabolic genes, fast muscle also presented increased alterations in the miRNAs that control these genes. This fact may reflect that in food restriction conditions, there is a preferential utilization of fast musculature as a preferential energy source for muscle maintenance [41]. Slow muscle showed less degradation during stress conditions and, therefore, required less regulation by miRNAs.

In summary, our findings demonstrate that a short period of food restriction in juveniles pacu had a more significant effect on the fast muscle, increasing mRNA levels of anabolic (*PI3K* and mTORC1 complex: *mTOR*, *mLST8* and *RAPTOR*) and energetic metabolism genes. The miRNAs (miR-1, miR-206, miR-199 and miR-23a) were more expressed during refeeding while their target genes (*IGF-1*, *mTOR*, *PGC1 α* and *MAFbx*), presented a decreased expression. We can speculate that the alterations observed in mTORC1 complex during fasting conditions may have influenced the rates of protein synthesis by using amino acids from protein degradation as an alternative mechanism to preserve muscle phenotype and metabolic demand maintenance.

Supporting information

S1 File. miRNA binding sites at the 3'UTR of the targets mRNAs between different species of vertebrates.

(TIF)

S2 File. Comparative analysis of miRNA targets.

(PDF)

S3 File. Heat map summary and hierarchical clustering of catabolic, anabolic and cellular metabolism gene expression during fasting/refeeding condition. A: fast muscle. B: slow muscle. Red represents down-regulated genes and blue represent up-regulated genes.

(TIF)

S1 Table. TaqMan[®] assays used for miRNA amplification by qPCR.

(DOCX)

S2 Table. Primers used for selected genes and GAPDH amplification by qPCR.
(DOCX)**Acknowledgments**

We would like to thank Dr. Daniel Garcia de la Serrana Castillo for their valuable discussions and Juarez Henrique Ferreira for your help during heat map analysis.

Author Contributions

Conceptualization: TGP EAM RFC MDPS.

Formal analysis: TGP BTTZ BEAF BOSD LNM RFC EAM CRP MDPS.

Funding acquisition: TGP BTTZ MDPS.

Investigation: TGP BTTZ EAM RASS BOSD CBO VBS.

Methodology: TGP BTTZ EAM RASS BOSD RNS CBO VBS.

Project administration: TGP MDPS.

Resources: MDPS RFC.

Supervision: MDPS RFC.

Visualization: TGP BTTZ EAM BOSD BEAF LNM MDPS.

Writing – original draft: TGP BTTZ BEAF EAM LNM BOSD MDPS.

Writing – review & editing: TGP BTTZ BEAF EAM LNM BOSD MDPS.

References

1. Castagnolli N, Cyrino J. *Piscicultura nos trópicos*. 1st ed. Manole; 1986.
2. Urbinati E, Gonçalves D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). UFSM, editor. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2005.
3. Brett J. *Environmental Factors and Growth Fish Physiology*. Academic Press London; 1979.
4. Johnston I a, Bower NI, Macqueen DJ. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J Exp Biol*. 2011; 214: 1617–1628. <https://doi.org/10.1242/jeb.038620> PMID: 21525308
5. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta—Mol Cell Res*. 2004; 1695: 55–72.
6. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. *Metabolic Control of Autophagy*. Cell. Elsevier Inc.; 2014; 159: 1263–1276.
7. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*. 2013; 6: 25–39. <https://doi.org/10.1242/dmm.010389> PMID: 23268536
8. Bower NI, Johnston I a. Discovery and characterization of nutritionally regulated genes associated with muscle growth in Atlantic salmon. *Physiol Genomics*. 2010; 42A: 114–130. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00065.2010> PMID: 20663983
9. Seilliez I, Gabillard J-C, Skiba-Cassy S, Garcia-Serrana D, Gutierrez J, Kaushik S, et al. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295: R329–R335.
10. Cleveland BM, Weber GM. Effects of insulin-like growth factor-I, insulin, and leucine on protein turnover and ubiquitin ligase expression in rainbow trout primary myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298: R341–R350. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00516.2009> PMID: 20007517
11. Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nägerl UV. A Balance of Protein Synthesis and Proteasome-Dependent Degradation Determines the Maintenance of LTP. *Neuron*. 2006; 52: 239–245. PMID: 17046687

12. Suraweera A, Münch C, Hanssum A, Bertolotti A. Failure of Amino Acid Homeostasis Causes Cell Death following Proteasome Inhibition. *Mol Cell*. 2012; 48: 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.003> PMID: 22959274
13. Johnston I a. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J Exp Biol*. 2006; 209: 2249–2264. PMID: 16731802
14. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006; 124: 471–484. PMID: 16469695
15. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17: 596–603. PMID: 16226444
16. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006; 22: 159–168. PMID: 16603397
17. Bower NI, Li X, Taylor R, Johnston IA. Switching to fast growth: the insulin-like growth factor (IGF) system in skeletal muscle of Atlantic salmon. *J Exp Biol*. 2008; 211: 3859–70. <https://doi.org/10.1242/jeb.024117> PMID: 19043058
18. Byfield MP, Murray JT, Backer JM. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem*. 2005; 280: 33076–33082. PMID: 16049009
19. Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 14238–14243. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506925102> PMID: 16176982
20. Hitachi K, Tsuchida K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front Physiol*. 2014; 4 JAN: 1–7.
21. Wang XH. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013; 16: 258–266. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835f81b9> PMID: 23449000
22. Jia L, Li YF, Wu GF, Song ZY, Lu HZ, Song CC, et al. miRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway. *Int J Mol Sci*. 2014; 15: 296–308.
23. Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, et al. Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation*. 2009; 120: 2377–2385. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.879429> PMID: 19933931
24. Yan B, Zhu C-D, Guo J-T, Zhao L-H, Zhao J-L. miR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression. *J Exp Biol*. 2013; 216: 1265–9. <https://doi.org/10.1242/jeb.079590> PMID: 23197102
25. Russell AP, Wada S, Vergani L, Hock MB, Lamon S, Léger B, et al. Disruption of skeletal muscle mitochondrial network genes and miRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. Elsevier Inc.; 2013; 49: 107–117.
26. Wada S, Kato Y, Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Yan Z, et al. Translational suppression of atrophic regulators by MicroRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. *J Biol Chem*. 2011; 286: 38456–38465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271270> PMID: 21926429
27. Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga BP, Tarnopolsky MA. miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PLoS One*. 2009; 4: e5610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005610> PMID: 19440340
28. Steven A, Bancroft J. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1990.
29. Dubowitz V, Brooke M. *Muscle biopsy: A modern approach*. London: WB Saunders Company; 1973.
30. Valente LMP, Rocha E, Gomes EFS, Silva MW, Oliveira MH, Monteiro R a F, et al. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *J Fish Biol*. 1999; 55: 675–691.
31. Johnston I. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flatfish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Res*. 1981; 214: 369–386. PMID: 7471184
32. de Almeida FLA, Pessotti NS, Pinhal D, Padovani CR, Leitão N de J, Carvalho RF, et al. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*. Elsevier Ltd; 2010; 41: 997–1004.
33. Nachlas MM, Tsou K-C, De Souza E, Cheng C-S, Seligman AM. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem*. 1957; 5: 420–436. <https://doi.org/10.1177/5.4.420> PMID: 13463314
34. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*. 2001; 25: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: 11846609

35. Goodman L. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. Washington: Technometrics; 1965.
36. Zar J. Biostatistical analysis. 5rd ed. New Jersey: Prentice—Hall; 2009.
37. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. Oxford University Press; 2012; 28: 1647–1649.
38. Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: MicroRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34: 451–454.
39. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: 152–157.
40. Mareco EA, Garcia de la Serrana D, Johnston IA, Dal-Pai-Silva M. Characterization of the transcriptome of fast and slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *BMC Genomics*. 2015; 16: 182. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1423-6> PMID: 25886905
41. Johnston IA. Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flatfish *Pleuronectes platessa*. *Cell Tissue Res*. 1981; 214: 369–386. PMID: 7471184
42. Leitão N de J, Pai-Silva MD, de Almeida FLA, Portella MC. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture*. Elsevier B.V.; 2011; 315: 78–85.
43. Nebo C, Célia M, Regina F, Losi F, De Almeida A, Roberto C, et al. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp Biochem Physiol—B Biochem Mol Biol*. Elsevier B.V.; 2013; 164: 268–274.
44. Komander D, Rape M. The Ubiquitin Code. *Annu Rev Biochem*. 2012; 81: 203–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328> PMID: 22524316
45. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK-M, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science* (80-). 2001; 294.
46. LECKER SH. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*. 2004; 18: 39–51. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0610com> PMID: 14718385
47. Nakashima H, Ishihara T, Sugimoto P, Yokota O, Oshima E, Kugo A, et al. Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol*. 2005; 110: 547–556. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1087-4> PMID: 16228182
48. Yamano K, Matsuda N, Tanaka K. The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. 2016; 17: 300–316.
49. Cleveland BM, Evenhuis JP. Molecular characterization of atrogin-1/F-box protein-32 (FBXO32) and F-box protein-25 (FBXO25) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Expression across tissues in response to feed deprivation. *Comp Biochem Physiol—B Biochem Mol Biol*. Elsevier B.V.; 2010; 157: 248–257.
50. Fuentes EN, Kling P, Einarsdottir IE, Alvarez M, Valdés JA, Molina A, et al. Plasma leptin and growth hormone levels in the fine flounder (*Paralichthys adspersus*) increase gradually during fasting and decline rapidly after refeeding. *Gen Comp Endocrinol*. Elsevier Inc.; 2012; 177: 120–127.
51. Klionsky DJ. Autophagy. *Curr Biol*. 2005; 15: R282–R283. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.013> PMID: 15854889
52. He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 2012; 481: 511–515. <https://doi.org/10.1038/nature10758> PMID: 22258505
53. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. NIH Public Access; 2011; 13: 132–141.
54. Jamart C, Naslain D, Gilson H, Francaux M. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 305: E964–74. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00270.2013> PMID: 23964069
55. Desgeorges MM, Freyssenet D, Chanon S, Castells J, Pugnère P, Béchet D, et al. Post-transcriptional regulation of autophagy in C2C12 myotubes following starvation and nutrient restoration. *Int J Biochem Cell Biol*. Elsevier Ltd; 2014; 54: 208–216.
56. Fuentes EN, Einarsdottir IE, Valdes JA, Alvarez M, Molina A, Björnsson BT. Inherent growth hormone resistance in the skeletal muscle of the fine flounder is modulated by nutritional status and is characterized by high contents of truncated GHR, impairment in the JAK2/STAT5 signaling pathway, and low IGF-I expression. *Endocrinology*. 2012; 153: 283–294. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1313> PMID: 22028448

57. Fuentes EN, Ruiz P, Valdes JA, Molina A. Catabolic Signaling Pathways, Atrogenes, and Ubiquitinated Proteins Are Regulated by the Nutritional Status in the Muscle of the Fine Flounder. *PLoS One*. 2012; 7.
58. Zhang Y, Nicholatos J, Dreier JR, Ricoult SJH, Widenmaier SB, Hotamisligil GS, et al. Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. *Nature*. *Nature Research*; 2014; 513: 440–443.
59. Fuentes EN, Safian D, Eir I, Antonio J, Elorza AA, Molina A, et al. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in skeletal muscle of the fine flounder. *Gen Comp Endocrinol*. Elsevier Inc.; 2013; 186: 172–180.
60. Mareco EA, Garcia de la Serrana D, Johnston I a, Dal-Pai-Silva M. Characterization of the transcriptome of fast and slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *BMC Genomics*. 2015; 16: 182. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1423-6> PMID: 25886905
61. Valente LMP, Bower NI, Johnston IA. Postprandial expression of growth-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) juveniles fasted for 1 week and fed a single meal to satiation. *Br J Nutr*. 2012; 108: 2148–2157. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000396> PMID: 22464448
62. Fuentes EN, Björnsson BT, Valdés JA, Einarsdóttir IE, Lorca B, Alvarez M, et al. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300: R1532–R1542. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2010> PMID: 21389330
63. Chauvigné F, Gabillard JC, Weil C, Rescan PY. Effect of refeeding on IGF1, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *Gen Comp Endocrinol*. 2003; 132: 209–215. PMID: 12812767
64. Terova G, Rimoldi S, Chini V, Gornati R, Bernardini G, Saroglia M. Cloning and expression analysis of insulin-like growth factor I and II in liver and muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during long-term fasting and refeeding. *J Fish Biol*. 2007; 70: 219–233.
65. Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids*. 2004; 39: 1077–1083. PMID: 15726822
66. Nakamura MT, Nara TY. STRUCTURE, FUNCTION, AND DIETARY REGULATION OF $\Delta 6$, $\Delta 5$, AND $\Delta 9$ DESATURASES. *Annu Rev Nutr*. Annual Reviews; 2004; 24: 345–376.
67. Jump DB. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol*. NIH Public Access; 2008; 19: 242–247.
68. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*. Elsevier Ltd; 2014; 53: 124–144.
69. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wraahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999; 103: 1489–1498. <https://doi.org/10.1172/JCI6223> PMID: 10359558
70. Johnston IA, Goldspink G. Some effects of prolonged starvation on the metabolism of the red and white myotomal muscle of the plaice *Pleuronectes platessa*. *Mar Biol*. 1973; 19: 348–353.
71. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. Nature Publishing Group; 2002; 418: 797–801.
72. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1 α and 1 β (PGC-1 α and PGC-1 β) in muscle cells. *J Biol Chem*. 2003; 278: 26597–26603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301850200> PMID: 12734177
73. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, et al. *Erra* and *Gabpa/b* specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 6570–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401401101> PMID: 15100410
74. Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Gigue V, Kelly DP. PGC-1 α Coactivates PDK4 Gene Expression via the Orphan Nuclear Receptor ERR α : a Mechanism for Transcriptional Control of Muscle Glucose Metabolism. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 10684–10694. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.10684-10694.2005> PMID: 16314495
75. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 16260–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607795103> PMID: 17053067
76. Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, et al. A role for the transcriptional coactivator PGC-1 α in muscle refueling. *J Biol Chem*. 2007; 282: 36642–36651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707006200> PMID: 17932032
77. Vechetti IJ, Bertaglia RS, Fernandez GJ, De Paula TG, De Souza RWA, Moraes LN, et al. Aerobic Exercise Recovers Disuse-induced Atrophy Through the Stimulus of the LRP130/PGC-1 α Complex in Aged Rats. *Journals Gerontol—Ser A Biol Sci Med Sci*. 2016; 71: 601–609.

78. Hoppeler H. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. *J Exp Biol.* 2016; 219: 205–13. <https://doi.org/10.1242/jeb.128207> PMID: 26792332
79. Shan ZX, Lin QX, Fu YH, Deng CY, Zhou ZL, Zhu JN, et al. Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc.; 2009; 381: 597–601.
80. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3'UTR Evolution. *Cell.* 2005; 123: 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.023> PMID: 16337999
81. van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* 2008; 24: 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.01.007> PMID: 18325627
82. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature.* 2003; 423: 550–555. <https://doi.org/10.1038/nature01667> PMID: 12754525
83. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013; 280: 4294–4314. <https://doi.org/10.1111/febs.12253> PMID: 23517348
84. Chu W-Y, Liu L-S, Li Y-L, Chen L, Wang K-Z, Li H-H, et al. Systematic identification and differential expression profiling of MicroRNAs from white and red muscles of *siniperca chuatsi*. *Curr Mol Med.* 2013; 13: 1397–407. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826919> PMID: 23826919
85. Duran BODS, Fernandez GJ, Mareco EA, Moraes LN, Salomão RAS, Gutierrez De Paula T, et al. Differential microRNA expression in fast- and slow-twitch skeletal muscle of *Piaractus mesopotamicus* during growth. *PLoS One.* 2015; 10: 1–16.
86. Wiberg R, Jonsson S, Novikova LN, Kingham PJ. Investigation of the expression of myogenic transcription factors, microRNAs and muscle-specific E3 ubiquitin ligases in the medial gastrocnemius and soleus muscles following peripheral nerve injury. *PLoS One.* 2015; 10: 1–20.

S1 File: miRNA binding sites at the 3'UTR of the targets mRNAs between different species of vertebrates.

| | | |
|-------------------------|----|----------------------------------|
| IGF1 | | |
| miR-1 | 3' | GUAUGA-AGAAAUGUAAGGU |
| | | |
| <i>P. mesopotamicus</i> | 5' | ---GAUGCUGUCUGUGCAAGCCA |
| <i>M. musculus</i> | 5' | UUGCAUCUUCAGCCUGCAUUCCAA |
| | | ** * **** ** |
| IGF1 | | |
| miR-206-3p | 3' | GUGUGUGAA--GG--AAUGUAAGGU |
| | | |
| <i>P. mesopotamicus</i> | 5' | UAUACAUUGCGCC-AUUCCAUUCUG |
| <i>H. sapiens</i> | 5' | AUACA--CAAG-UAAACAUUCCAA |
| <i>D. rerio</i> | 5' | UCCAUACACUGCACC-AAUACAUACUG |
| <i>M. musculus</i> | 5' | UGCAUCUUCAG-CCUGCAUUCCAA |
| | | * ** *** * |
| IGF1 | | |
| miR-199-3p | 3' | UUGGUUACACGUC----UG-----AUGACAU |
| | | |
| <i>P. mesopotamicus</i> | 5' | UAACUUCU-UGCAGAAGAGC-----UGCUGG |
| <i>H. sapiens</i> | 5' | GGAUCACUGUGCAGUGGGACCACCCUCACUGG |
| <i>D. rerio</i> | 5' | GAACUGAGGUAAUAGGUGAC-----UAUUGG |
| <i>M. musculus</i> | 5' | UCCUGGCGUGGGUAGAU-----UGCUGUU |
| | | ** |
| mTOR | | |
| miR-199-3p | 3' | UUGGUU---ACAC-GUCUG-AUGACAU |
| | | |
| <i>P. mesopotamicus</i> | 5' | CACCGUAGCUGUGCCGGACAUGCUGG |
| <i>H. sapiens</i> | 5' | AGAUCGCUGGCAGCCUCG-----GCUGA |
| <i>D. rerio</i> | 5' | UACAUUUG-UGCAGCAAUUUGCUA |
| <i>M. musculus</i> | 5' | UUCAGUGA--GGGAGGGAUAUGCUGUAU |
| | | * * * *** |
| MAFBx | | |
| miR-23a-3p | 3' | ACCU----UUAGG-GACCGUU----ACACUA |
| | | |
| <i>P. mesopotamicus</i> | 5' | GUGGACAUAAAUCCACUGGUCU----UAUGAA |
| <i>H. sapiens</i> | 5' | G-----CCUGGUCUCUUCUGUGAA |
| | | * * **** * **** |
| PGC1a | | |
| miR-23a-3p | 3' | ACCUUUAGGGACCGUUACACUA |
| | | |
| <i>P. mesopotamicus</i> | 5' | UUCCUGU |

Comparative analysis of miRNA targets

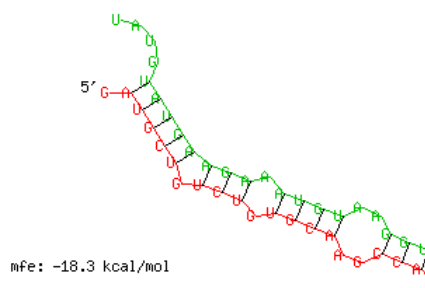
Version: RNAhybrid 2.2

searching
dataset: 1
mde of dre-miR-1: -38.299995
Individual hits

dataset: 1
Target: *utr3_IGF1_Piaractus_mesopotamicus*
length: 700
MiRNA: *dre-miR-1*
length: 22

mfe: -18.3 kcal/mol
p-value: undefined

Position: 535
target 5' G G G AG U 3'
AUGCU UCU UGCA CCA
UAUGA AGA AUGU GGU
miRNA 3' UAUG A AA 5'



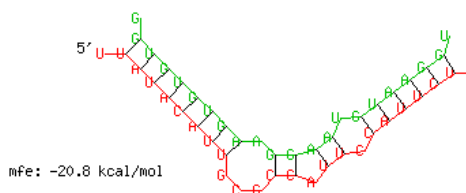
Version: RNAhybrid 2.2

searching
dataset: 1
mde of dre-miR-206-3p: -45.699997
Individual hits

dataset: 1
Target: *utr3_IGF1_Piaractus_mesopotamicus*
length: 700
MiRNA: *dre-miR-206-3p*
length: 22

mfe: -20.8 kcal/mol
p-value: undefined

Position: 183
target 5' U GCG A C G 3'
UUAUCAUU CC UU CAUUCU
GUGUGUGA GG AA GUAAGG
miRNA 3' G A U U 5'



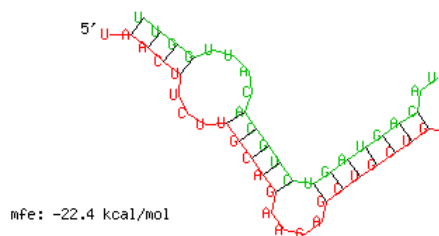
Version: RNAhybrid 2.2

searching
dataset: 1
mde of dre-miR-199-3p: -44.100002
Individual hits

dataset: 1
Target: *utr3_IGF1_Piaractus_mesopotamicus*
length: 700
MiRNA: *dre-miR-199-3p*
length: 22

mfe: -22.4 kcal/mol
p-value: undefined

Position: 306
target 5' U UCU AAGA G 3'
AACU UGCAG GCUGCUG
UUGG ACGUC UGAUGAC
miRNA 3' UUAC AU 5'



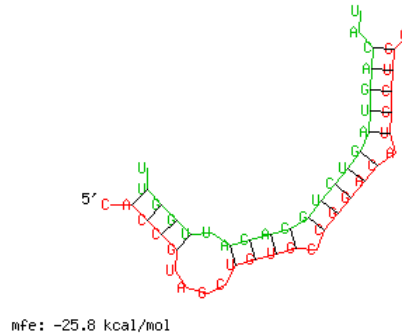
Version: RNAhybrid 2.2

searching
dataset: 1
mde of dre-miR-199-3p: -44.100002
Individual hits

dataset: 1
Target: *utr3_mTOR_Piaractus_mesopotamicus*
length: 1022
MiRNA: *dre-miR-199-3p*
length: 22

mfe: -25.8 kcal/mol
p-value: undefined

Position: 902
target 5' C UAGC C A G 3'
ACCG UGUG CGGAC UGCUG
UGGU ACAC GUCUG AUGAC
miRNA 3' U U AU 5'



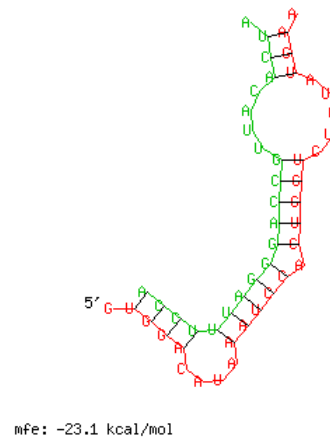
Version: RNAhybrid 2.2

searching
dataset: 1
mde of dre-miR-23a-3p: -46.299995
Individual hits

dataset: 1
Target: *utr3_MAFBx_Piaractus_mesopotamicus*
length: 537
MiRNA: *dre-miR-23a-3p*
length: 22

mfe: -23.1 kcal/mol
p-value: undefined

Position: 197
target 5' G CAUA A CUUUA A 3'
UGGA AAUCC CUGGU UGA
ACCU UUAGG GACCG ACU
miRNA 3' UUAC A 5'



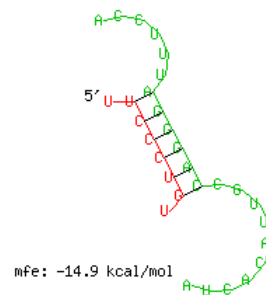
Version: RNAhybrid 2.2

searching
dataset: 1
mde of dre-miR-23a-3p: -46.299995
Individual hits

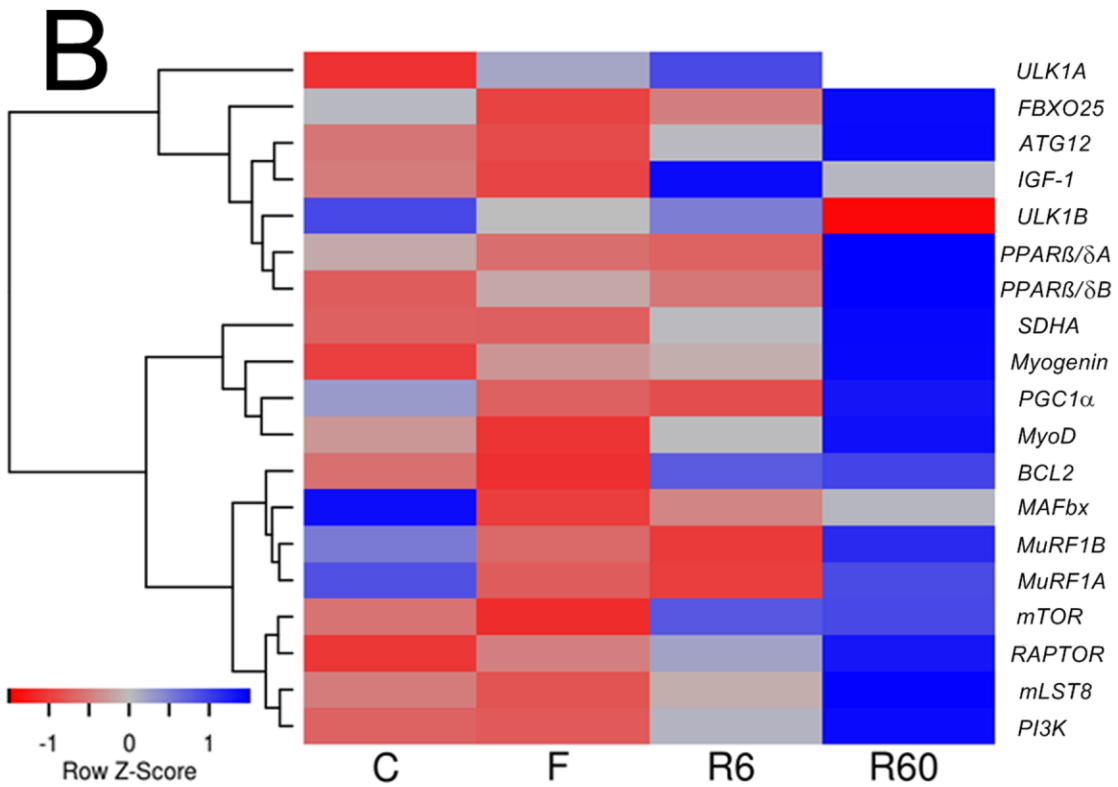
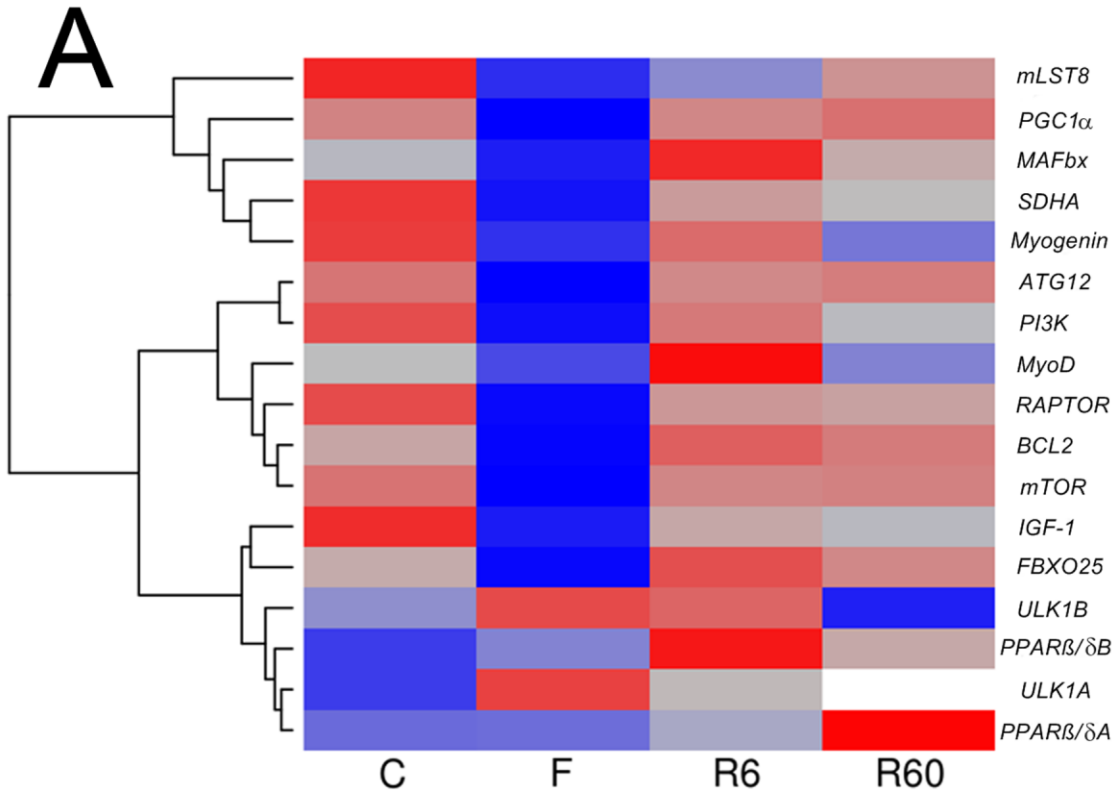
dataset: 1
Target: *utr3_PGC1a_Piaractus_mesopotamicus*
length: 202
MiRNA: *dre-miR-23a-3p*
length: 22

mfe: -14.9 kcal/mol
p-value: undefined

Position: 149
target 5' U U 3'
UCCUCG
AGGGAC
miRNA 3' ACCUUU CGUUACACUA 5'



S3 File



S1 Table. TaqMan® assays used for miRNA amplification by qPCR.

| miRBase ID | miRBase accession number | Target sequence |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------|
| dre-miR-1 | MIMAT0001768 | UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU |
| dre-miR-206-3p | MIMAT0001866 | UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG |
| dre-miR-23a-3p | MIMAT0001790 | AUCACAUUGCCAGGGAUUCCA |
| dre-miR-199-3p | MIMAT0003155 | UACAGUAGUCUGCACAUUGGUU |
| U6 snRNA | Access number NCBI: NR_004394 | |

S2 Table. Primers used for selected genes and *GAPDH* amplification by qPCR.

| Gene | Primer sequences (5' → 3') | Size of amplified fragment (bp) |
|---------------|--|--|
| <i>ATG12</i> | L: AGTTCATCTCCCGCTTCCTT R: CACTGCCGAAACACTCAAAA | 120 |
| <i>BCL2</i> | L: CCCCTCCTCTCTCTTCGTCT R: TGTCCATTTCTGCTGTTTG | 135 |
| <i>ULK1A</i> | L: GACAAGCCAACCAGGAGAGT R:GGTAGTTGTGGATTTGTGTA | 192 |
| <i>ULK1B</i> | L: CTTTGAGCTGTGGCAGGACA R:CTTGTGGGGAGAGCTGGAAG | 105 |
| <i>FBX025</i> | L: CGTAGGTGAAGTAGCCGCCA R: GGAGAAGTCCAGCCTGTTGA | 166 |
| <i>MAFbx</i> | L: TCTTTGGTGCTCCCCTTGTG R: TAAAACCGAGGACGGCTGG | 231 |
| <i>MURF1A</i> | L: CCATTGATGCCTTGGTTGC R: CCTTCTCGTCCTGCTCTTTG | 198 |
| <i>MURF1B</i> | L: CCCCTGAAAGACAAAGACA A: GCTCAGCCTTCTGGACTTC | 179 |
| <i>IGF-1</i> | L: ATTCAGCAAGCCAACAGGT R: CGCACAATACATCTCAAGTCG | 116 |
| <i>PI3K</i> | L: GTCTGGAGCCTGGCAGTAAG R: CTTCTGTGTGCTGGGAGTCA | 119 |

| | | |
|--|--|-----|
| <i>mTOR</i> | L: TTGGGAGAGACGTACTGC R: CACAGGACTGGTGTAGGAA | 145 |
| <i>RAPTOR</i> | L: TGTTTACGACTGCTCCAA R: GAGGGTGGTTCGGGTTTATT | 107 |
| <i>GBL</i> (<i>mLST8</i>) | L: TCCCAAGACCAAATTCCTG R: AAAGTTTGAGGTTCCGCCAGA | 124 |
| <i>SDHA</i> | L: ACCTGATGCTGAATGCTGTG R: AGTGTGCTTCCTCCAGTGC | 170 |
| <i>PGC1α</i> | L: GAGGGTGAGCGTTCAAAGAG R: ATGAGGCTGAGCAGAGAGGA | 187 |
| <i>MyoD</i> | L: GTTCGTCGTCTTCCTCTTGC R: ACCCGTGCTTTAACACCAAC | 191 |
| <i>Myogenin</i> | L: CAGACCAGAGGTTTTATGAA R: TAGATGTTGGGGATGGCTTG | 171 |
| <i>PPAR$\beta/\delta A$</i> | L: TAGCCACACCTCCTCCCTAA R: GCTGCTGTTCTCCTCCAATC | 136 |
| <i>PPAR$\beta/\delta B$</i> | L: GAAGGAGAAGGAAGCGAGGT R:GTCAACTTCATCCCCATTCT | 102 |
| <i>GAPDH</i> | L: ACACACGACGACAAGACCAA R: GTCCCTCTCGCTGAAAAGTCTG | 267 |

Considerações finais:

Os achados demonstram que o curto período de restrição alimentar em juvenis de pacu teve efeito mais significativo no músculo branco “*fast*”, aumentando os níveis de mRNA dos genes anabólicos (PI3K e complexo mTORC1: mTOR, mLST8 e RAPTOR) e metabolismo energético; os miRNAs (miR-1, miR-206, miR-199 e miR-23a) foram mais expressos durante a realimentação, enquanto que os genes alvo (IGF-1, mTOR, PGC1 α e MAFbx) apresentaram expressão reduzida. Acredita-se que as alterações observadas no complexo mTORC1 durante as condições de jejum podem ter influenciado as taxas de síntese proteica, utilizando aminoácidos da degradação proteica como mecanismo alternativo para preservar o fenótipo muscular e manutenção da demanda metabólica (Figura 16).

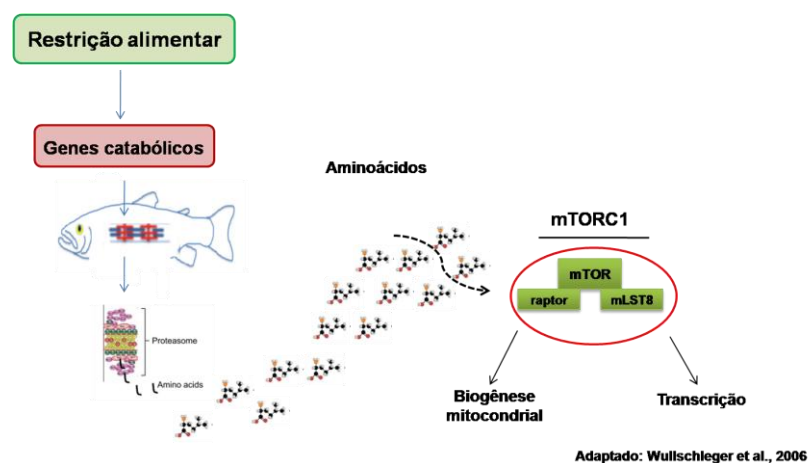


Figura 16: Modelo proposto de comportamento da via da mTORC1 em situações de jejum como mecanismo alternativo para preservar o fenótipo muscular e manutenção da demanda metabólica.