

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO
DURANTE A REALIMENTAÇÃO NA MUSCULATURA DE PACUS
(*Piaractus mesopotamicus*) SUBMETIDOS A UM PERÍODO DE
JEJUM.

BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA

ORIENTADORA

MAELI DAL-PAI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular
Estrutural e Funcional.

Maeli Dal-Pai

**BOTUCATU – SP
2019**

Bruna Tereza Thomazini Zanella

Maeli Dal-Pai

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Zanella, Bruna Tereza Thomazini.

Efeitos da suplementação de ácido ascórbico durante a realimentação na musculatura de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a um período de jejum / Bruna Tereza Thomazini Zanella. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maeli Dal-Pai

Coorientador: Tassiana Gutierrez de Paula

Capes: 20100000

1. Vitamina C. 2. Músculos. 3. Peixe - Alimentação. 4. Pacu (Peixe).

Palavras-chave: ácido ascórbico; músculo; peixes; realimentação.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao financiamento a esse projeto (Processo FAPESP 2017/26346-1). Agradeço também a FAPESP por todo financiamento e auxílio recebido também ao longo do meu processo de graduação. Sem esse apoio, o desenvolvimento dos projetos realizados até o presente momento não teria sido possível.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Programa de Biologia Geral e Aplicada pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal ao longo dessa jornada.

Agradeço à minha orientadora Maeli Dal-Pai pela oportunidade de realizar esse e os demais projeto, por todo apoio e suporte acadêmico, pelos ensinamentos e por acreditar em seus alunos quando nós mesmos não conseguimos fazer isso. Que possamos manter essa parceria por muitos anos.

A minha co-orientadora Tassiana Gutierrez de Paula pelo companheirismo, ensinamentos, auxílio desde o início da minha caminhada acadêmica e a amizade que construímos. Sua atuação foi essencial no meu crescimento científico e também pessoal.

Aos demais colegas do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado, LBME, por todo auxílio direto e indireto a mim e ao desenvolvimento desse projeto, em especial ao Bruno de Oliveira da Silva Duran, a Isabele Cristina Magiore e ao Guilherme Gutierrez Pereira pela intensa participação nesse projeto, na imensa contribuição nos resultados obtidos, pela amizade e convívio diário tão necessário para a manter a leveza em nossos dias de trabalho. A Jéssica Silvino Valente e Érika Stephanie Perez pela amizade, conversas, companheirismo e também pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

Ao professor Robson Francisco Carvalho pelo auxílio nesse projeto e no convívio diário. Aos membros da banca de qualificação, Bruno Oliveira da Silva Duran, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho e Sérgio Luis Felisbino e aos membros da banca de defesa, Maeli Dal-Pai, Rafael Henrique Nóbrega e Fernanda Antunes Alves da Costa pela análise criteriosa e pelas importantes sugestões que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído da melhor forma possível.

Aos integrantes do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – Aqanutri, pelo auxílio no delineamento experimental, na formulação e preparo das dietas experimentais e na análise da atividade das enzimas antioxidantes.

A APTA – Presidente Prudente e aos doutores Rondinelle Artur Simões Salomão e Edson Assunção Mareco pelo auxílio e cuidado no cultivo dos animais.

A minha família pelo apoio, confiança e por todo auxílio dado a mim durante a execução desse projeto. Sem vocês isso não teria sido possível. A Letícia Benine pelo excelente trabalho desenvolvido, cuja atuação foi essencial para que esse projeto fosse concluído com êxito.

A todos os cientistas pós-graduando desse país. Que tenhamos força para resistir frente aos desafios e desvalorização de nosso trabalho e que esse cenário nos impulse a continuarmos dando o nosso melhor, comprovando a cada dia o valor da pesquisa brasileira para o desenvolvimento de nossa sociedade.

Resumo

Períodos de restrição alimentar são comuns em peixes. Nessa condição, ocorre a degradação do tecido muscular e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), danosas aos seres vivos. Nesse sentido, a adição de antioxidantes como o ácido ascórbico (AA) na alimentação, pode resultar na neutralização e prevenção dos danos ocasionados pelas ROS. O objetivo desse trabalho foi avaliar os impactos da suplementação de AA, *in vivo* e *in vitro*, no músculo esquelético de pacus durante a realimentação. Pacus juvenis foram divididos nos grupos: Control (C; alimentação contínua - 200 mg/kg de AA), Fasting (F; 15 dias de jejum) e três grupos realimentados por 30 dias após o jejum: Low (L-AA; 100 mg/kg de AA), Balanced (B-AA; 200 mg/kg de AA) e High supplementation (H-AA; 400 mg/kg de AA). Amostras musculares foram coletadas após jejum (15 dias) e realimentação (6 horas, 15 e 30 dias). Fibras musculares foram mensuradas e separadas em classes de acordo com seu diâmetro; análises bioquímicas foram realizadas para avaliar a atividade de enzimas antioxidantes. A expressão de genes envolvidos nas vias de anabolismo (*igf1*, *igfbp5*, *mtor*, *rragc* e *rps6kb1a*), catabolismo (*mafbx*, *murfla*, *murflb* e *fbxo25*), miogênese (*myod*, *myog* e *pax7*) e metabolismo oxidativo (*pgc1a* e *sdha*) foram avaliadas por RT-qPCR. Além disso, análises *in vitro* foram realizadas para comprovar o efeito direto desse protocolo em células musculares. Após o período de jejum, ocorreu a diminuição no diâmetro das fibras e na expressão de genes anabólicos, além de aumento na expressão de genes catabólicos no grupo F. Após um curto período de realimentação (6 horas), houve um aumento na expressão de genes anabólicos e miogênicos no grupo H-AA. Aos 15 dias, observou-se uma diminuição geral na expressão dos genes no grupo L-AA, além de uma recuperação no diâmetro das fibras e aumento na expressão dos genes miogênicos no grupo H-AA. Ao final do período de realimentação, apenas o grupo H-AA apresentou recuperação no diâmetro das maiores fibras, além de aumento na expressão de genes relacionados à miogênese e metabolismo oxidativo. A suplementação de AA promoveu diminuição na atividade da enzima antioxidante catalase ao longo do período experimental nesse mesmo grupo. Nossos dados indicam que a baixa suplementação de AA impactou negativamente na recuperação do metabolismo muscular, enquanto a maior suplementação auxiliou no rápido estabelecimento de condições benéficas ao crescimento, possivelmente, atenuando os efeitos do jejum e mantendo um microambiente favorável à produção energética. Ainda, nossos resultados *in vitro* indicam um efeito direto do AA em células musculares. Esses resultados podem representar uma estratégia nos sistemas de aquicultura, promovendo uma rápida recuperação muscular após situações de jejum em peixes.

Abstract

Fasting periods commonly occur throughout the fish's life. During this condition, there is an increase in muscle degradation and reactive oxygen species (ROS) production, which can cause cell disturbances. Antioxidants, such as ascorbic acid (AA), can neutralize and prevent ROS's damage. Thus, we aimed to evaluate the AA supplementation impacts, *in vivo* and *in vitro* in the skeletal muscle of pacu during refeeding. Pacu juvenile were grouped in Control (C; continuous feeding - 200 mg/kg of AA), Fasting (F; 15 days of fasting) and three refeeding groups after fasting: Low (L-AA; 100 mg/kg of AA), Balanced (B-AA; 200 mg/kg of AA) and High-supplementation (H-AA; 400 mg/kg of AA). Muscle samples were collected after fasting (15 days) and refeeding (6 hours, 15 and 30 days). Muscle fibers were measured and grouped in diameter classes. Biochemistry analyses were performed to evaluate antioxidant enzymes activity. Genes related to anabolism (*igf1*, *igfbp5*, *mtor*, *rragc* and *rps6kb1a*), catabolism (*mafbx*, *murfla*, *murflb* and *fbxo25*), myogenesis (*myod*, *myog* and *pax7*) and oxidative metabolism (*pgc1a* and *sdha*) were analyzed by RT-qPCR. Besides, *in vitro* analyzes were performed to evaluate the direct AA effect's in muscle cells. After fasting, a decrease in fiber diameter and anabolic genes expression, besides an increase in catabolic genes was observed in F group. In the first moment after refeeding (6 hours), the anabolic and myogenic genes expression increased in the H-AA. After 15 days, the L-AA group presented a general decrease in gene expression, while the H-AA had an increase in myogenic genes expression and recovered fiber diameter. After 30 days, the H-AA presented an increase in the expression of genes related to myogenesis and oxidative metabolism combined with a recovery in fiber diameters. Besides, the AA supplementation promoted a decrease in catalase activity through time in this same group. Our data indicate that the low AA level may have impaired muscle metabolism resumption, while the higher supplementation may have contributed to a faster recovery of muscle growth, possibly providing a beneficial microenvironment for energetic production. Moreover, our *in vitro* results indicate a possible direct AA effect on muscle cells. These findings may present a strategy to minimize the loss of aquaculture profits, promoting faster muscle recovery after fasting and stressful situations.

Sumário

1	1. Introdução	8
2	1.1. Músculo estriado esquelético em peixes	8
3	1.2. Miogênese em peixes	9
4	1.3. Crescimento muscular pós-embriônico	13
5	1.3.1 Controle molecular do crescimento muscular	14
6	1.4. Restrição alimentar	17
7	1.5. Ácido ascórbico.....	19
8	2. Hipótese	21
9	3. Objetivos	21
10	4. Metodologia	21
11	4.1. Condições experimentais	21
12	4.2. Morfologia e Morfometria.....	24
13	4.3. Cultura primária de células musculares	24
14	4.3.1 Análise do diâmetro dos miotubos.....	26
15	4.3.2 Análise de migração celular.....	26
16	4.4. Análise da expressão gênica	26
17	4.4.1 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA	26
18	4.4.2. Síntese do cDNA e RT-qPCR.....	27
19	4.5 Heatmap.....	29
20	4.6 Análise de enzimas antioxidantes	29
21	4.7 Análise estatísticas	30
22	5. Resultados	30
23	5.1 Parâmetros biométricos	30
24	5.2. Análises morfológicas	31
25	5.2.1.Morfometria do diâmetro das fibras musculares.....	31
26	5.2.2 Quantificação de colágeno.....	34
27	5.3. Análise da expressão gênica	35
28	5.4. Atividade de enzimas antioxidantes.....	41
29	5.5. Cultura celular primária	42
30	5.5. 1 Análise morfológica	42
31	5.5.2 Ensaio de migração celular.....	42
32	5.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes.....	43
33	5.5.4 Expressão gênica.....	44
34	6. Discussão	46
35	7. Conclusões	55
36	8. Referências bibliográficas	56

37 **1. Introdução**

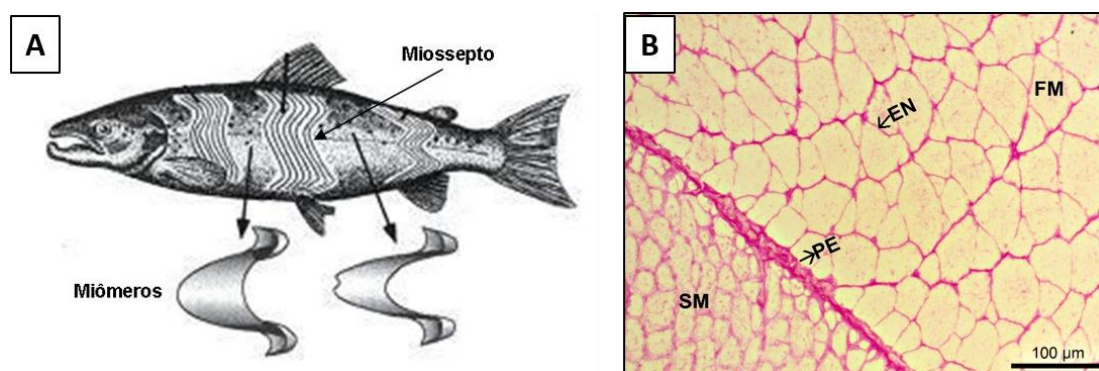
38 *1.1. Músculo estriado esquelético em peixes*

39 A produção no setor da aquicultura vem aumentando globalmente, passando de 68,5
40 bilhões para 148,6 bilhões de dólares no período de 2000 a 2015. Somente na América do Sul,
41 aproximadamente 12 milhões de dólares foram gerados nesse setor durante esse mesmo
42 período, sendo Chile, Brasil e Equador os países responsáveis por aproximadamente 77% da
43 produção nessa região (FAO, 2017). No Brasil, a produção dos peixes redondos (pacu,
44 tambaqui, pirapitinga e dos híbridos patinga, tambacu e tambatinga) corresponde a
45 aproximadamente 30% da produção nacional de peixes no setor da aquicultura (IBGE, 2018).
46 Dentre as espécies neotropicais, o pacu possui características desejáveis para a aquicultura
47 intensiva, como rápido crescimento e boa adaptação à diferentes tipos de alimentação
48 (URBINATI; GONÇALVES, 2005; VOLKOFF et al., 2017). Ainda, dentre as trinta espécies
49 mais cultivadas na América do Sul, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) ocupa a 14ª posição
50 nesse ranking (FAO, 2017).

51 Além de apresentarem contribuições no setor alimentício e econômico, a organização
52 e fisiologia do músculo esquelético dos peixes apresenta vantagens na compreensão dos
53 processos de crescimento e manutenção desse tecido. Nesses animais, o músculo estriado
54 esquelético constitui a maior parte da massa corporal, representando de 40 a 75% do peso
55 total. A alta proporção do tecido muscular é vantajosa nos ambientes aquáticos, uma vez que
56 devido a densidade do meio, uma maior demanda energética é necessária para realização de
57 movimentos rápidos e de locomoção (BONE, 1978). A organização do tecido muscular nesses
58 animais se dá a partir de estruturas morfofuncionais idênticas, os miômeros, separados entre si
59 por camadas de tecido conjuntivo denominadas de miosseptos. A disposição dos miômeros e
60 miosseptos na maior parte dos peixes se apresenta em um aspecto característico, lembrando a
61 forma de “W” (Fig. 1A). A presença dos miosseptos na musculatura dos peixes contribui para
62 a transmissão da força de contração, resultando na realização dos movimentos ondulatórios
63 (revisado por SÄNGER; STOIBER, 2001). Ainda, o tecido conjuntivo no músculo
64 esquelético pode ser subdividido em perímísio, envolvendo um conjunto de feixes de fibras
65 musculares e endomísio, que envolve cada fibra muscular (Fig. 1B).

66 Diferente do que ocorre nos mamíferos, nos peixes o tecido muscular está distribuído
67 em três compartimentos bem delimitados. Os compartimentos das musculaturas branca,
68 intermediária e vermelha possuem características metabólicas distintas e são recrutados frente
69 a estímulos diferentes (JOHNSTON; DAVISON; GOLDSPIK, 1977; revisado por
70 SÄNGER; STOIBER, 2001). A coloração dos três compartimentos musculares reflete a

71 vascularização nessas regiões. A musculatura vermelha, também denominada de
72 compartimento “*slow*”, constitui de 10 a 30% da musculatura esquelética, possui um alto
73 suprimento sanguíneo, uma grande quantidade de mitocôndrias e um metabolismo
74 predominantemente oxidativo, sendo recrutada durante a locomoção contínua e de baixa
75 velocidade, como a migração. As fibras da musculatura branca, também denominada de
76 compartimento “*fast*”, constituem aproximadamente 70% da musculatura esquelética,
77 possuem maiores diâmetros em comparação às fibras vermelhas, menor quantidade de
78 mitocôndrias, baixo suprimento sanguíneo e um metabolismo predominantemente glicolítico,
79 sendo recrutadas na realização de movimentos rápidos, como a fuga de predadores e a captura
80 de alimentos. As fibras intermediárias se localizam entre os compartimentos branco e
81 vermelho e apresentam características heterogêneas como contração rápida e capacidade de
82 realização de metabolismo oxidativo e glicolítico (JOHNSTON; DAVISON; GOLDSPINK,
83 1977; SÄNGER; STOIBER, 2001).



84

85 **Fig. 1.** Organização do tecido muscular esquelético em peixes. (A) Conjunto de fibras
86 musculares se organizam em miômeros intercalados por miosseptos de tecido conjuntivo.
87 Adaptado de JOHNSTON, 2001. (B) Cortes histológicos do músculo esquelético de pacu
88 (*Piaractus mesopotamicus*) indicando as regiões de tecido conjuntivo. Perimísio (PE)
89 circundando feixes de fibras musculares entre as musculaturas vermelha, “*slow*” (SM) e
90 branca, “*fast*” (FM) e endomísio (EN) envolvendo cada fibra muscular. Coloração por
91 Picrosirius-Red. Aumento de 20x. Escala: 100 µm. Imagens de autoria própria.

92

93 1.2. Miogênese em peixes

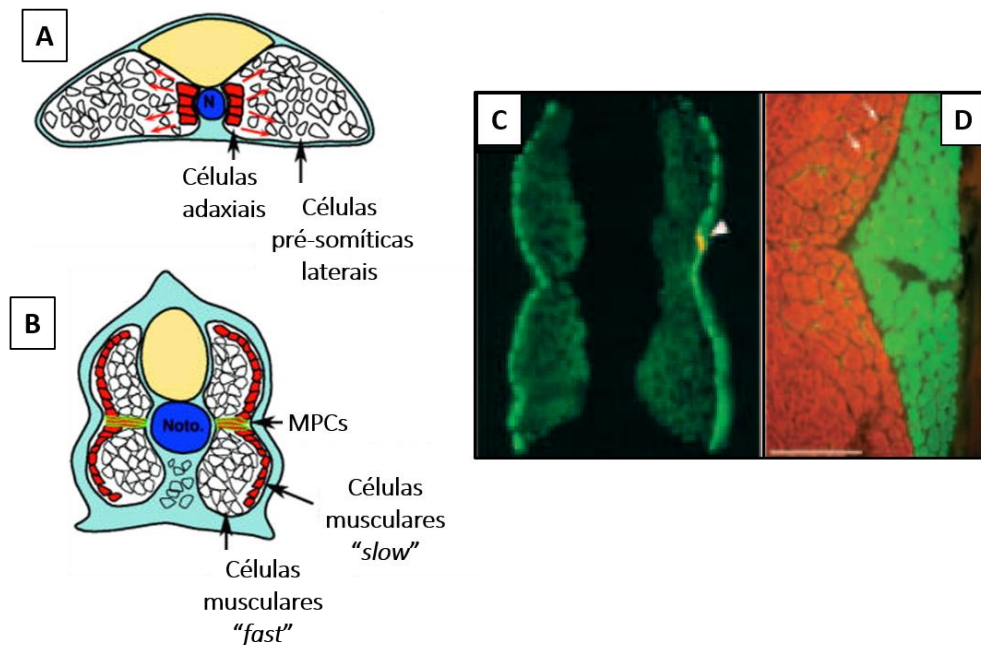
94 A formação do tecido muscular, processo denominado miogênese, ocorre nas fases
95 iniciais da embriogênese nos organismos, apresentando características conservadas entre
96 peixes e mamíferos. No entanto, fatores como o estágio de especificação e destino das células

97 musculares e a produção de novos miotubos ao longo da vida, difere entre esses grupos
98 animais (JOHNSTON, 2006). A musculatura axial é o tecido mais abundante nos peixes,
99 auxiliando na locomoção e realização dos movimentos ondulatórios (revisado por KEENAN;
100 CURRIE, 2019). Nesse sentido, as discussões relativas aos processos miogênicos nesse tópico
101 serão referentes a miogênese da musculatura axial, com as particularidades encontradas nos
102 peixes.

103 De uma maneira geral, nos teleósteos, o processo de miogênese ocorre a partir da
104 segmentação em uma orientação anteroposterior da mesoderme paraxial em blocos de células
105 denominadas somitos. Os somitos passam por um segundo processo de divisão, definidos em
106 esclerótomo e miótomo. As células presentes no miótomo apresentam comprometimento com
107 a linhagem miogênica, passando a expressar fatores de regulação miogênica e componentes
108 estruturais das células musculares (CURRIE; INGHAM, 2001; KEENAN; CURRIE, 2019).
109 O comprometimento miogênico já nas fases iniciais do desenvolvimento representa uma
110 característica vantajosa aos peixes, cuja fertilização ocorre no ambiente externo, permitindo a
111 fuga de predadores o mais cedo possível e garantindo a sobrevivência da prole (CURRIE;
112 INGHAM, 2001).

113 Adjacentes a notocorda, células denominadas adaxiais, sofrem influência de fatores
114 derivados da notocorda, como *hedgehog*, que induzem a repressão de genes das fibras
115 glicolíticas, determinando o fenótipo oxidativo dessas células (Fig. 2A) (BLAGDEN et al.,
116 1997; KEENAN; CURRIE, 2019). Nos peixes, a separação dos compartimentos das
117 musculaturas branca e vermelha ocorre já nas fases iniciais de desenvolvimento. As células
118 adaxiais migram da região adjacente a notocorda para a região superficial do embrião, se
119 diferenciando posteriormente em fibras oxidativas e dando origem a musculatura vermelha.
120 Células denominadas pré-somíticas laterais permanecem na região interna do miótomo se
121 diferenciando em fibras glicolíticas e originando o compartimento da musculatura branca,
122 após a migração das células adaxiais (DEVOTO et al., 1996) (Fig.2B,C). Contrariamente, nos
123 mamíferos a determinação dessas células ocorre sem delimitações, por todo o miótomo,
124 resultando na presença de fibras com características metabólicas distintas ao longo do mesmo
125 grupo de músculos nesses animais (revisado por CURRIE; INGHAM, 2001).

126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138



139 **Fig. 2.** Miogênese embrionária e compartimentalização da musculatura em peixes. (A)
140 Esquema de corte transversal de zebrafish (*Danio rerio*). Destaque para as células adaxiais
141 adjacentes a notocorda (N) e células pré-somíticas laterais. (B) Migração das células adaxiais
142 para a região superficial originando as células precursoras da musculatura “slow”. Células
143 precursoras da musculatura “fast” permanecem no interior do miótomo. Células precursoras
144 miogênicas (MPCs) contribuirão para os processos de crescimento. Adaptado de DU et al.,
145 1997. (C) Corte transversal destacando células adaxiais (marcação para miosina de cadeia
146 pesada em verde; anticorpo F59) após a migração, localizadas na superfície do embrião de
147 zebrafish. (D) Separação das células correspondentes as musculaturas “slow” em regiões
148 superficiais (marcação para miosina “slow” em verde; anticorpo S58) e “fast” em regiões
149 profundas (marcação para miosina “fast” e intermediária em vermelho; anticorpo 12/101).
150 Adaptado de DEVOTO et al., 1996.

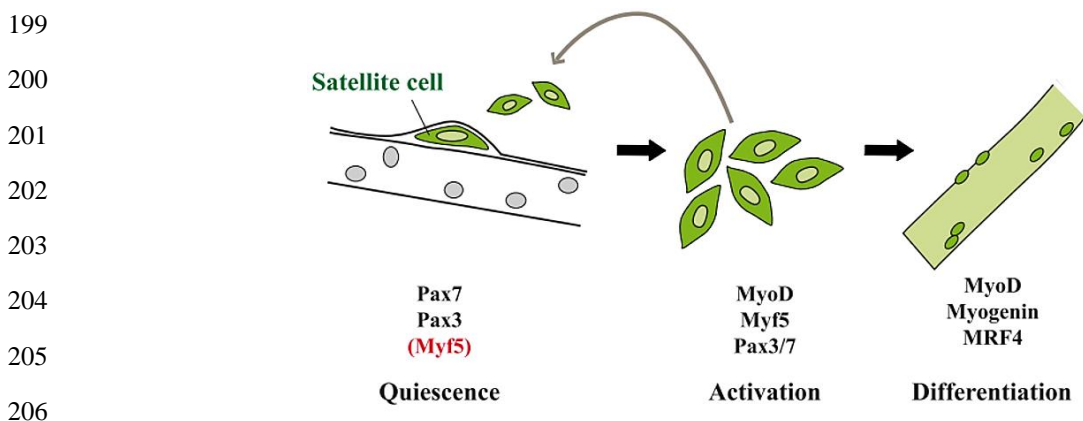
151 As células não adaxiais presentes nos somitos se diferenciam e formam
152 compartimentos distintos, entre eles uma camada externa de células (ECL, do inglês *external*
153 *cell layer*), semelhantes ao dermomiótomo nos mamíferos. Diferente do que ocorre nesses
154 organismos, em peixes, essa estrutura pode participar de processos de crescimento durante a
155 miogênese secundária ao longo da vida dos teleósteos (KEENAN; CURRIE, 2019). A
156 miogênese secundária é um processo no qual os organismos passam por um rápido aumento
157 corporal, restando as mesmas características da miogênese primária, o que permite que esses

158 animais apresentem um padrão de crescimento indeterminado nas fases pós-embrionárias
159 (KEENAN; CURRIE, 2019).

160 Células denominadas satélites, ou células precursoras miogênicas (MPCs, do inglês,
161 *myogenic precursor cells*) são responsáveis pelo crescimento muscular nas etapas de
162 miogênese secundária (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011; KEENAN; CURRIE,
163 2019). Essas células recebem essa denominação devido sua localização na periferia da fibra
164 muscular, podendo apresentar uma alta capacidade de auto renovação, sendo mantidas ao
165 longo da vida e contribuindo para processos de regeneração e crescimento. A atividade das
166 MPCs sofre o controle de fatores de regulação da família Pax, *pax3* e *pax7*, como descrito
167 para mamíferos e peixes. A superexpressão de *Pax3* em mamíferos tem sido relacionada à
168 regulação de genes pertencentes a diferentes etapas do processo de miogênese e manutenção
169 do *pool* de células satélites nos embriões (BUCKINGHAM; RIGBY, 2014). Enquanto nesses
170 animais esse fator de transcrição diminui sua expressão quando um segundo fator,
171 denominado *Pax7*, passa a ser dominante (BUCKINGHAM; RIGBY, 2014), em peixes,
172 acredita-se que o controle das etapas de miogênese e a capacidade de formar novas fibras
173 musculares nos estágios pós-natal, tem forte influência da expressão de *pax3*, garantindo
174 maiores taxas proliferativas e manutenção das característica embrionária nessas células
175 (FROEHLICH et al., 2013a, 2013b). Além disso, como caracterizado em mamíferos, a
176 expressão de *Pax7* confere uma marcação para o estado quiescente das células satélites
177 (SEALE et al., 2000), possivelmente através da ativação de fatores que promovem a
178 regulação negativa dos processos que iniciam os estágios de proliferação e diferenciação das
179 células miogênicas (revisado po BUCKINGHAM; RIGBY, 2014).

180 A partir de estímulos de crescimento, ocorre a *downregulação* de *pax7* e de outros
181 reguladores que mantém as MPCs em seu estado quiescente. O processo de miogênese é então
182 orquestrado pela expressão de diferentes fatores, entre eles os fatores de regulação miogênica
183 (do inglês, *myogenic regulatory factors*, MRFs) que exercem um papel crucial na proliferação
184 e diferenciação das células musculares. Os MRFs compartilham um domínio altamente
185 conservado, conhecido como “*basic helix-loop-helix*” (bHLH) e reconhecem, através de seu
186 domínio básico, uma sequência consenso no DNA, denominada E-box, presente na região
187 promotora dos genes músculo-específicos (MURRE et al., 1989; WATABE, 2001). O
188 domínio bHLH dos MRFs é o sítio de ligação dessas moléculas a proteínas amplamente
189 expressas denominadas de proteínas E, como as E-12 e E-47. A união dos MRFs às proteínas
190 E, forma heterodímeros. A ligação do heterodímero MRF-proteína-E ou de homodímeros de
191 MRFs às sequências E-box ativa a transcrição de genes músculo-específicos, levando à sua

192 expressão (MURRE et al., 1989). Durante a miogênese e crescimento muscular, as MPCs são
 193 ativadas e os MRFs primários, *myod* e *myf5*, determinam a proliferação dos mioblastos,
 194 enquanto a expressão dos MRFs secundários, *miogenina* e *myf4*, regulam a sua diferenciação
 195 e fusão em miotubos, eventos que contribuem para hiperplasia e hipertrofia muscular em
 196 peixes (Fig.3) (WATABE, 1999, 2001). As diferenças durante as etapas de miogênese entre
 197 peixes e mamíferos impacta nos processos de crescimento pós-embriônico nesses animais,
 198 processos que serão discutidos nos tópicos seguintes.



207 **Fig. 3.** Representação esquemática do processo de miogênese. Fatores de transcrição, *Pax3* e
 208 *Pax7*, mantêm as células satélites (ou MPCs) em seu estado quiescente. Após a entrada no
 209 ciclo celular, fatores de regulação miogênica (MRFs) primários, *Myod* e *Myf5*, regulam a
 210 proliferação dos mioblastos. MRFs secundários, *Myog* e *Mrf4* controlam os processos de
 211 diferenciação e fusão dos mioblastos em miotubos. Adaptado de BUCKINGHAM; RIGBY,
 212 2014.

213

214 *1.3. Crescimento muscular pós-embriônico*

215 O crescimento muscular pós-embriônico pode ocorrer a partir da formação de novas
 216 fibras musculares, processo denominado hiperplasia, e/ou pelo aumento do diâmetro das
 217 fibras pré-existentes, processo denominado hipertrofia. Durante os estágios larvais e
 218 embriogênicos finais, ocorre a primeira fase de formação de novas fibras musculares a partir
 219 de uma camada germinal superficial, processo denominado hiperplasia estratificada. Essa
 220 primeira etapa, reflete uma continuação da miogênese embrionária, completando a formação
 221 dos compartimentos musculares iniciados nos estágios anteriores. Nesse período, a formação
 222 de novas fibras ocorre de forma orientada a partir da camada germinativa para regiões mais
 223 profundas do miótomo (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001). Em peixes que atingem um
 224 grande tamanho final, ocorre uma segunda etapa hiperplásica denominada hiperplasia em
 225 mosaico. A denominação desse processo se dá em referência a morfologia observada nos

226 cortes histológicos da musculatura desses animais, com fibras musculares maiores
227 intermediadas por fibras menores, dando a característica de um mosaico de fibras musculares
228 de diferentes diâmetros. A partir desse processo, o crescimento muscular ocorre ao longo de
229 todo o miótomo, sendo intensificado principalmente nas fases juvenis de desenvolvimento
230 (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001). Além dos processos hiperplásicos de crescimento
231 muscular, a hipertrofia de fibras pré-existentes também contribui para que os peixes possam
232 atingir um grande tamanho final. O aumento no diâmetro das fibras ocorre ao longo de toda a
233 vida, atingindo tamanhos entre 100 – 300 µm na musculatura branca. A adição de novos
234 núcleos a partir da ativação e proliferação das MPCs, permite que as fibras cresçam mantendo
235 uma proporção núcleo/citoplasma equilibrada, sem alterar a funcionalidade e equilíbrio do
236 tecido (ROWLERSON; VEGGETTI, 2001).

237

238 1.3.1 Controle molecular do crescimento muscular

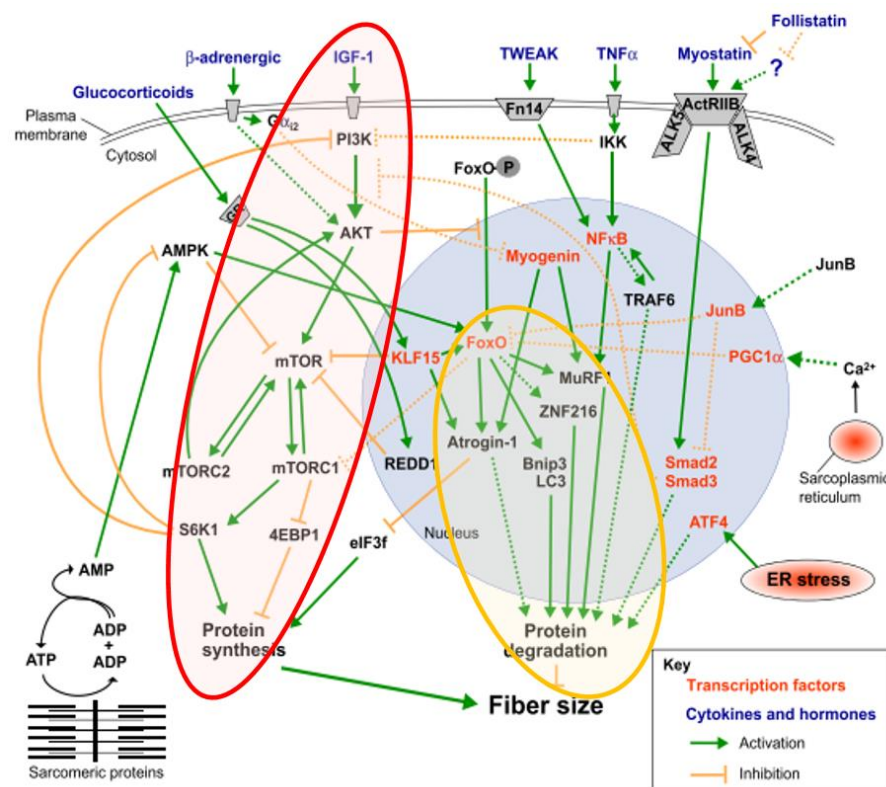
239 Além dos fatores de regulação miogênica e da atividade das MPCs, o fenótipo
240 muscular sofre controle direto do balanço entre as vias de síntese e degradação proteica (Fig.
241 4). Fatores de crescimento, como o IGF1 (do inglês, *insulin like growth factor 1*), têm sido
242 descritos como os principais componentes envolvidos nas vias de crescimento muscular,
243 como observado em mamíferos (SCHIAFFINO et al., 2013). A interação do IGF1 e seu
244 receptor leva ao estímulo da síntese proteica através da ativação da enzima PI3K (do inglês,
245 *phosphatidyl-inositol-3 kinase*), que promove um sítio de ligação à membrana celular para
246 outra enzima tirosina quinase, a AKT (do inglês, *Akt serine-threonine kinase*). Quando ativa,
247 essa enzima leva a fosforilação de mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) que
248 atua estimulando a síntese proteica através da ativação da proteína p70S6K (GLASS, 2005;
249 SCHIAFFINO et al., 2013). Outros constituintes do sistema IGF também participam das
250 respostas aos estímulos anabólicos, como os receptores de IGF e uma classe de proteínas
251 ligantes ao IGF, denominadas IGFbps (do inglês *Igf-binding proteins*). Em mamíferos, as
252 IGFbps tem sido descritas como moduladoras da atividade de IGF, atuando no transporte,
253 meia-vida e disponibilidade dessa molécula em diferentes tecidos. Além disso, essas
254 moléculas podem inibir ou potencializar a atividade de IGF dependendo do tecido e do
255 contexto experimental (revisado por DUAN; REN; GAO, 2010). Em células musculares lisas,
256 por exemplo, a adição de IGFBP-2 e -4 resultou na inibição da atividade de IGF, enquanto a
257 adição de IGFBP-5 potencializou o efeito mitogênico dessa molécula (revisado por DUAN;
258 REN; GAO, 2010). Acredita-se que esse ligante, o IGBP-5, também atue estimulando os
259 processos anabólicos através da interação com a matriz extracelular, podendo concentrar

260 IGF1 próximo ao seu sítio de ligação, aumentando as possibilidades de interação ligante-
261 receptor e potencializando as ações desse fator de crescimento (JONES et al., 1993). O
262 aumento na expressão de *igfbp5* concomitante ao aumento na atividade de fatores anabólicos
263 como Igf1 e Mtor foi encontrado em células musculares de salmão do Atlântico submetidas a
264 restrição e posterior suplementação de aminoácidos (BOWER; JOHNSTON, 2010a). Essa
265 correlação entre *igf1* e *igfbp5* também foi observada após a realimentação em salmão do
266 Atlântico (BOWER; JOHNSTON, 2010b), truta arco-íris (GABILLARD; KAMANGAR;
267 MONTSEERRAT, 2006) e *Paralichthys adspersus* (FUENTES et al., 2015), reforçando o
268 caráter anabólico desse ligante.

269 A atividade de Igf1 também sofre influência de fatores extrínsecos aos animais. A
270 presença de aminoácidos e fatores de crescimento em experimentos *in vivo* e *in vitro* tem sido
271 descritos como indutores da expressão de *igf1* no músculo esquelético de peixes, podendo
272 estimular a síntese proteica (FUENTES et al., 2013a). A proteína MTOR, um dos
273 componentes *downstream* da via IGF, atua como um sensor desses fatores no ambiente
274 celular. Essa proteína participa da formação de dois complexos denominados MTORC1 e
275 MTORC2. O complexo MTORC1 tem sido descrito como um dos principais efetores dos
276 processos de síntese proteica em diferentes modelos animais, podendo ser estimulado de
277 diferentes formas. Essa ativação pode ocorrer diretamente via IGF1, por aminoácidos a partir
278 da sinalização de proteínas RAGs e através das razões de ATP/ADP ou glicose no ambiente
279 celular (revisado por BOND, 2016). O aumento na expressão e/ou atividade de Mtor durante
280 o crescimento muscular têm sido observado frente a diferentes estímulos anabólicos, como
281 após a realimentação em *Paralichthys adspersus* (FUENTES et al., 2013b) e truta arco-íris
282 (*Oncorhynchus mykiss*) (SEILIEZ et al., 2008), após a adição do aminoácido triptofano em
283 meio de cultura de células musculares C2C12 (DUKES et al., 2015) e na presença de
284 aminoácidos e Igf1 em células musculares de *Sparus aurata* (VÉLEZ et al., 2014). Ainda,
285 uma diminuição de sua expressão e atividade tem sido relacionada ao aumento da atividade de
286 componentes de vias catabólicas e processos atróficos em *Paralichthys adspersus* induzidos
287 ao estresse crônico (VALENZUELA et al., 2017) e em células musculares isoladas de truta
288 arco-íris (SEILIEZ et al., 2013).

289 Como citado anteriormente, além de atuar na síntese proteica, os componentes da via
290 Igf1 podem inibir as vias de catabolismo. A quinase AKT, por exemplo, pode atuar
291 desestimulando a degradação muscular impedindo a desfosforilação de *Foxo* (fator
292 transcricional da família *Forkhead box O*), fator fortemente relacionado à degradação proteica
293 (revisado por BONALDO; SANDRI, 2013; JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011).

294 Em peixes, o processo de catabolismo proteico pode ocorrer devido à ação de diversos
 295 fatores, resultando na perda de massa muscular (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN,
 296 2011). Quando não há estímulos para a ativação de AKT, *Foxo* pode então ser desfosforilado
 297 e translocado para o núcleo, onde estimula a transcrição de *Murf* (do inglês, *muscle ring*
 298 *finger protein*) e *Mafbx* (do inglês, *muscle atrophy f-box* ou *atrogin-1*), atrogenes
 299 classificados como E3 ubiquitina-ligases que participam do sistema ubiquitina-proteassoma,
 300 um dos principais efetores da degradação no tecido muscular (BONALDO; SANDRI, 2013;
 301 GLASS, 2005; GOMES et al., 2001; WITT et al., 2005). Nesse sistema, a degradação
 302 proteica se inicia com a ativação de proteínas ubiquitinas por enzimas E1, a partir da clivagem
 303 de ATP. As ubiquitinas são então ligadas as enzimas E2, que se acoplam as enzimas E3. Por
 304 fim, as enzimas E3 transferem as ubiquitinas das enzimas E2 aos substratos, que serão
 305 degradados no proteassoma. A atividade desse sistema é importante tanto em situações
 306 patológicas quanto em situações normais para a renovação de proteínas sarcoméricas
 307 (revisado por BONALDO; SANDRI, 2013).



325 **Fig. 4.** Componentes das vias de sinalização que orquestram o fenótipo muscular. As vias de
 326 anabolismo (vermelho) resultam na síntese proteica, enquanto as vias de catabolismo
 327 (amarelo) levam a degradação muscular. Adaptado de BONALDO; SANDRI, 2013.

328 A atuação dos atrogenes *murf* e *mafbx* na degradação muscular tem sido descrita em
329 peixes em diferentes situações. Períodos de restrição alimentar promoveram um aumento na
330 expressão desses fatores no tecido muscular de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (TACCHI
331 et al., 2010), com uma posterior diminuição em resposta a uma única ingestão alimentar
332 (VALENTE et al., 2012) ou a alimentação contínua (BOWER; JOHNSTON, 2010c). O
333 aumento na atividade desses atrogenes em situações de jejum também foi observado em truta
334 arco-íris (CLEVELAND et al., 2009) e pacus juvenis (MARECO et al., 2015; PAULA et al.,
335 2017). Situações que desencadeiam respostas de estresse fisiológico, como a administração de
336 cortisol e a manipulação dos animais, também levaram a um aumento na expressão desses
337 atrogenes em células musculares de *Genypterus chilensis*, tanto *in vivo* quanto *in vitro*
338 (AEDO et al., 2015). Ainda, a atuação desses fatores e sua importância na remodelação
339 muscular frente ao exercício físico foi descrita em *Sparus aurata* (VÉLEZ et al., 2017). Nesse
340 sentido, o balanço entre as vias de anabolismo e catabolismo frente as condições ambientais
341 contribuem diretamente para a manutenção do tecido muscular.

342

343 *1.4. Restrição alimentar*

344 Em adição ao controle molecular dos processos de anabolismo e catabolismo, fatores
345 extrínsecos aos organismos também impactam no fenótipo e manutenção do tecido muscular.
346 Ao longo da vida, os peixes passam por períodos de flutuações sazonais na disponibilidade de
347 alimentos e temperatura do ambiente. A interpretação e integração desses sinais externos pelo
348 sistema nervoso leva a alterações endócrinas e cardiovasculares que podem levar a alterações
349 do fenótipo muscular. Além disso, esses animais possuem um menor controle do seu
350 ambiente interno, sendo mais suscetíveis às variações do ambiente (JOHNSTON, 2006). A
351 habilidade de se adaptar às flutuações das condições ambientais, seja por uma mudança
352 comportamental ou pela plasticidade do tecido muscular, confere vantagens a sobrevivência
353 desses animais frente a adversidades (JOHNSTON, 2006).

354 Períodos de restrição de nutrientes são comuns em diferentes estágios da vida dos
355 peixes, como durante os meses de inverno, nos quais a disponibilidade de alimentos e apetite
356 dos animais diminuem, ou ainda durante períodos de migração e reprodução (NAVARRO;
357 GUTIÉRREZ, 1995). Nessas situações, as reservas energéticas podem ser mobilizadas a partir
358 do fígado e tecidos adiposo e muscular, dependendo da espécie analisada e período de
359 desenvolvimento. Acredita-se que, de um modo geral, os lipídeos são utilizados logo nos
360 estágios iniciais de jejum, sendo seguidos pelos carboidratos e proteínas. Ainda que as

361 reservas de gordura e glicogênio no tecido muscular sejam poupadas, esse tecido representa o
362 principal sítio de degradação proteica nessas situações (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995).

363 Embora a proteólise também ocorra nos outros compartimentos musculares, o
364 compartimento da musculatura branca é o local onde esse processo ocorre de forma mais
365 intensa. Em períodos de jejum prolongado, ocorre a mobilização dos aminoácidos presentes
366 no tecido muscular para a utilização em processos vitais para a sobrevivência. Nesse sentido,
367 as proteínas solúveis e contráteis são preferencialmente degradadas, enquanto as proteínas do
368 tecido conjuntivo são menos utilizadas. Em consequência, as fibras de colágenos são
369 poupadas do processo de degradação (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995).

370 Experimentos envolvendo modelos de jejum e realimentação têm sido realizados para
371 avaliar as taxas de perda e possível recuperação do tecido muscular, assim como a modulação
372 das vias de anabolismo e catabolismo em diversas espécies de peixes. Estudos em nosso
373 grupo de pesquisa, observaram um aumento na expressão de genes das vias catabólicas
374 concomitante a perda de massa muscular frente a restrição alimentar, com posterior
375 recuperação do fenótipo muscular e estímulo aos processos anabólicos após a realimentação
376 em pacus (KUNIYOSHI et al., 2019; MARECO et al., 2015; PAULA et al., 2014). Essas
377 alterações vem em concordância às observações realizadas em *Hippoglossus hippoglossus*
378 (HAGEN et al., 2009), salmão do atlântico (VALENTE et al., 2012), truta arco-íris
379 (RESCAN et al., 2007; SEILIEZ et al., 2008) e *Paralichthys adspersus* (FUENTES et al.,
380 2011), destacando os impactos diretos desse protocolo no fenótipo muscular.

381 Além dos efeitos diretos na proteólise, situações de jejum podem acarretar a produção
382 de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), que podem
383 resultar na ativação de processos celulares autofágicos (RODRÍGUEZ-VARGAS et al.,
384 2012). Ainda, as ROS, quando em altas concentrações, podem ocasionar diversos efeitos
385 nocivos nas células como danos oxidativos ao DNA, além de reagirem com enzimas e
386 lipídeos de membranas, danificando-os ou alterando suas funções. A associação da proteólise
387 muscular e produção de ROS ou de seus subprodutos em situações de estresse foi descrito na
388 musculatura de *Genypterus chilensis* submetidos a manipulação (AEDO et al., 2015) e
389 *Umbrina cirrosa* após restrição alimentar (HIDALGO et al., 2017). Nessa perspectiva, a
390 produção dos ROS na musculatura esquelética pode contribuir para os efeitos negativos
391 encontrados em situações de jejum e impactar na recuperação do tecido muscular após a
392 restauração de condições favoráveis ao crescimento.

393 As situações de restrição alimentar podem resultar também em respostas que se
394 assemelham a outras situações que promovem perda de massa muscular. Exemplos desses

395 cenários são os períodos de maturação gonadal, nos quais os nutrientes são mobilizados a
396 partir das reservas no fígado, tecido adiposo e muscular, sendo direcionados ao sistema
397 reprodutor, resultando em um fenótipo muscular semelhante ao observado durante o jejum
398 (JOHNSTON, 2006). Essa característica também é observada devido aos padrões
399 comportamentais hierárquicos dos indivíduos, no qual peixes classificados como submissos se
400 assemelham aos que permanecem em jejum (GILMOUR et al., 2017; ROWLERSON;
401 VEGGETTI, 2001). Sendo assim, protocolos experimentais simulando períodos de jejum
402 refletem não só como essa situação em si afeta o tecido muscular, mas também trazem
403 indícios de como outras situações de estresse fisiológico podem atuar nesse tecido.

404

405 1.5. Ácido ascórbico

406 As células animais possuem um sistema antioxidante endógeno que inclui as enzimas
407 superóxido-dismutase (Sod), catalase (Cat) e glutathione peroxidase (GPx), que podem
408 converter as ROS em produtos não-nocivos, como H₂O e O₂ (NELSON; COX, 2014). Em
409 adição, componentes não enzimáticos como a glutathione, um dos principais antioxidantes
410 solúveis capazes de neutralizar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e evitar a peroxidação de
411 lipídeos, também compõe esse sistema (revisado por BIRBEN et al., 2012). Além do sistema
412 endógeno, compostos oriundos de fonte externa podem ser suplementados na alimentação,
413 auxiliando na neutralização das ROS.

414 Nesse sentido, o ácido ascórbico (AA), uma forma reduzida da vitamina C, é um dos
415 mais eficazes agentes antioxidantes e redutores. Uma de suas principais atividades é a
416 neutralização direta das ROS, ação fundamental na defesa contra a toxicidade dessas
417 moléculas e na manutenção do estado redox celular. Além disso, esse composto pode atuar na
418 regeneração da glutathione e da vitamina E (tocoferol), um importante antioxidante atuante na
419 neutralização de ROS nas membranas biológicas (COMBS; MCCCUNG, 2017).

420 Em mamíferos, sua ação antioxidante tem apresentado benefícios em diferentes
421 situações patológicas, como na manutenção da função pulmonar e neurológica e prevenção de
422 diabetes e catarata (COMBS; MCCCUNG, 2017). Além disso, em experimentos *in vitro* com
423 a deleção da Sod em células DT40 (linfoblastos derivados de galinhas), a suplementação de
424 AA permitiu o crescimento celular normal dessas células e diminuiu as concentrações de
425 superóxido, um dos produtos da produção das ROS, ressaltando o papel antioxidante desse
426 composto mesmo na falha do sistema antioxidante endógeno (TAMARI et al., 2013).

427 Além da contribuição para a melhoria do estado geral em patologias, a suplementação
428 de AA também tem apresentado efeitos benéficos no tecido muscular. Durante o processo de

429 envelhecimento, ocorre maior produção de ROS e diminuição da atividade de enzimas
430 antioxidantes (RYAN et al., 2010). Análises do tecido muscular de ratos idosos submetidos ao
431 exercício físico e suplementados com vitamina C e E indicaram uma diminuição da
432 peroxidação de lipídeos, dos danos no DNA e na produção de H₂O₂, além de um estímulo a
433 atividade das enzimas antioxidantes em comparação aos animais não suplementados (RYAN
434 et al., 2010). Em ratas idosas, a deficiência de AA por um longo período levou a produção
435 excessiva de ROS, perda de massa muscular e diminuição da performance física, efeitos
436 atenuados após a suplementação desse composto (TAKISAWA et al., 2019). Além disso, a
437 partir de análises em estudos *in vitro*, foi observada a influência do AA na diferenciação de
438 mioblastos, concomitante ao aumento na expressão de *Myog* (SHIMA et al., 2011) e na
439 formação de miotubos (IKEDA et al., 2015). Em concordância, em estudo anterior realizado
440 em nosso laboratório, a suplementação de AA em células musculares de pacu promoveu um
441 aumento na atividade de enzimas antioxidantes, na expressão de genes relacionados à
442 miogênese e anabolismo e nos processos de proliferação e migração celular (DURAN et al.,
443 2019). Além de seus efeitos antioxidantes, o AA também atua na síntese de colágeno,
444 auxiliando a hidroxilação dos resíduos de lisina e prolina para a síntese dessa molécula
445 (MURAD et al., 1981). Considerando que o colágeno constitui a matriz extracelular das
446 células e que nele estão ligadas moléculas que atuam estimulando a via do IGF1, como o
447 IGFBP5 (JONES et al., 1993), a estabilidade da matriz extracelular possivelmente pode
448 influenciar as taxas de crescimento muscular.

449 Em peixes, a suplementação de AA tem se mostrado vantajosa, promovendo melhorias
450 nos aspectos hematológicos, imunológicos e de crescimento, além de proteção contra os
451 efeitos de agentes tóxicos e estressores (CAHU; INFANTE; TAKEUCHI, 2003; FALCON et
452 al., 2007; GUHA; KHUDA-BUKHSH, 2002; KIM; KANG, 2016, 2017). Em relação ao
453 pacu, espécie avaliada no presente trabalho, estudos envolvendo a suplementação de AA,
454 encontraram resultados positivos relacionados à sanidade e desempenho produtivo como:
455 maior ganho de peso, aumento da taxa de sobrevivência (MARTINS, 1998; MARTINS et al.,
456 1995; MIRANDA et al., 2003) e melhorias nos parâmetros imunológicos e hematológicos
457 desses animais (GARCIA et al., 2007, 2011). Uma vez que os teleósteos são incapazes de
458 sintetizar esse composto devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, presente nas
459 etapas finais de biossíntese de AA (COMBS; MCCCUNG, 2017), a restrição desse composto
460 na dieta pode impactar na sanidade, desenvolvimento e crescimento muscular desses animais.

461

1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575

7. Conclusões

Em conjunto, nossos dados indicam que a suplementação de ácido ascórbico nos momentos iniciais após o jejum, pode auxiliar no rápido estabelecimento de condições benéficas ao crescimento, tanto atenuando os efeitos desfavoráveis causados por essa situação, quanto mantendo um ambiente que favoreça a produção energética necessária à recuperação muscular. Os baixos níveis desse antioxidante durante o início do processo de realimentação, impactam negativamente o restabelecimento da homeostase metabólica nesse tecido e, em consequência, o crescimento muscular. Ainda, esse protocolo pode afetar diretamente células musculares isoladas. Esses resultados podem representar uma estratégia em situações de estresse nos sistemas de aquicultura, para que ocorra uma rápida recuperação muscular em peixes, diminuindo os possíveis gastos decorrentes desse processo e aumentando os lucros nos sistemas de produção.

1576 **8. Referências bibliográficas**

- 1577 ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus*
1578 *mesopotamicus*) juveniles - fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate
1579 levels). **Aquaculture Nutrition**, v. 13, p. 1–9, 2007.
- 1580 AEDO, J. E. et al. mRNA-seq reveals skeletal muscle atrophy in response to handling stress
1581 in a marine teleost, the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–
1582 12, 2015.
- 1583 ALI, M.; NICIEZA, A.; WOOTTON, R. J. Compensatory growth in fishes: a response to
1584 growth depression. **Fish and Fisheries**, v. 4, p. 147–190, 2003.
- 1585 ALMEIDA, G. S. DE C. **Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e**
1586 **sanidade do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)**. [s.l.] Universidade de São
1587 Paulo, 2003.
- 1588 BAEHR, L. M.; TUNZI, M.; BODINE, S. C. Muscle hypertrophy is associated with increases
1589 in proteasome activity that is independent of MuRF1 and MAFbx expression. **Frontiers in**
1590 **Physiology**, v. 5 FEB, n. February, p. 1–8, 2014.
- 1591 BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay
1592 Applicable to Acrylamide Gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276–287, 1971.
- 1593 BELO, M. A. DE A. et al. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign - body inflammatory
1594 response in pacus. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 47, n. 7, p. 1015–1021, 2012.
- 1595 BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, p. 9–19,
1596 2012.
- 1597 BLAGDEN, C. S. et al. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by sonic
1598 hedgehog. **Genes and Development**, v. 11, n. 17, p. 2163–2175, 1997.
- 1599 BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy.
1600 **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013.
- 1601 BOND, P. Regulation of mTORC1 by growth factors, energy status, amino acids and
1602 mechanical stimuli at a glance. **Bond Journal of the International Society of Sports**
1603 **Nutrition**, v. 13, p. 1–11, 2016.
- 1604 BONE, Q. Locomotor muscle. In: **Fish Physiology**. [s.l.] Academic Press, 1978. v. 7p. 361–
1605 424.
- 1606 BOWER, N. I.; JOHNSTON, I. A. Selection of reference genes for expression studies with
1607 fish myogenic cell cultures. **BMC Molecular Biology**, v. 10, p. 1–11, 2009.
- 1608 BOWER, N. I.; JOHNSTON, I. A. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway
1609 by amino acids and insulin-like growth factors during myogenesis in Atlantic salmon. **PLoS**

1610 **ONE**, v. 5, n. 6, 2010a.

1611 BOWER, N. I.; JOHNSTON, I. A. Discovery and characterization of nutritionally regulated
1612 genes associated with muscle growth in Atlantic salmon. **Physiological genomics**, v. 42A, n.
1613 2, p. 114–130, 2010b.

1614 BOWER, N.; JOHNSTON, I. Characterisation and differential regulation of MAFbx /
1615 Atrogin-1 a and b transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*).
1616 **Biochemical and biophysical research**, v. 396, n. 2, p. 265–271, 2010c.

1617 BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram
1618 Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical**
1619 **Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

1620 BUCKINGHAM, M.; RIGBY, P. W. J. Gene Regulatory Networks and Transcriptional
1621 Mechanisms that Control Myogenesis. **Developmental Cell**, v. 28, n. 3, p. 225–238, 2014.

1622 CAHU, C.; INFANTE, J. Z.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal
1623 development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, n. 1–4, p. 245–258, 2003.

1624 CHAPALAMADUGU, K. C. et al. Dietary carbohydrate level affects transcription factor
1625 expression that regulates skeletal muscle myogenesis in rainbow trout. **Comparative**
1626 **Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 153, n. 1, p. 66–
1627 72, 2009.

1628 CLEVELAND, B. M. et al. Insulin-like growth factor-I and genetic effects on indexes of
1629 protein degradation in response to feed deprivation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
1630 **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v.
1631 297, n. 5, p. R1332–R1342, 2009.

1632 COMBS, G. F.; MCCCUNG, J. P. Vitamin C. In: COMBS, G. F.; MCCCUNG, J. P. (Eds.). .
1633 **The Vitamins - Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. Fifth ed. [s.l.] Academic
1634 Press, 2017. p. 267–295.

1635 CURRIE, P. D.; INGHAM, P. W. Introduction and Patterning of Embryonic Skeletal Muscle
1636 Cells in the Zebrafish. In: JOHNSTON, I. (Ed.). . **Muscle development and growth**. [s.l.]
1637 Academic Press, 2001. p. 1–14.

1638 DARIAS, M. J. et al. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence
1639 on the skeletal system. **Aquaculture**, v. 315, n. 1–2, p. 49–60, 2011.

1640 DE ALMEIDA, F. L. A. et al. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in
1641 pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae,
1642 Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1306–1311, 2008.

1643 DE LA SERRANA, D. G.; JOHNSTON, I. A. Expression of Heat Shock Protein (Hsp90)

1644 Paralogues Is Regulated by Amino Acids in Skeletal Muscle of Atlantic Salmon. **PloS One**,
1645 v. 8, n. 9, p. e74295, 2013.

1646 DEVOTO, S. H. et al. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo,
1647 prior to somite formation. **Development**, v. 122, n. 11, p. 3371–3380, 1996.

1648 DU, S. J. et al. Positive and Negative Regulation of Muscle Cell Identity by Members of the
1649 hedgehog and TGF-B gene families. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 1, p. 145–156,
1650 1997.

1651 DUAN, C.; REN, H.; GAO, S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-
1652 binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. **General and**
1653 **Comparative Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 344–351, 2010.

1654 DUKES, A. et al. The aromatic amino acid tryptophan stimulates skeletal muscle
1655 IGF1/p70s6k/mTor signaling in vivo and the expression of myogenic genes in vitro.
1656 **Nutrition**, v. 31, n. 7–8, p. 1018–1024, 2015.

1657 DURAN, B. O. S. et al. Ascorbic acid stimulates the in vitro myoblast proliferation and
1658 migration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Scientific Reposrts**, v. 9, p. 2229, 2019.

1659 FALCON, D. R. et al. Lipídeo e vitamina C em dietas preparatórias de inverno para tilápias-
1660 do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5 SUPPL., p. 1462–1472, 2007.

1661 FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of Glutathione Peroxidase. In: PACKER, L. (Ed.). .
1662 **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press, 1984. v. 105p. 112–121.

1663 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).
1664 **Regional Review on Status and Trends in Aquaculture Development in Latin America**
1665 **and the Caribbean - 2015**. [s.l.: s.n.]. v. 1

1666 FROEHLICH, J. M. et al. In vitro indeterminate teleost myogenesis appears to be dependent
1667 on Pax3. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v. 49, n. 5, p. 371–385, 2013a.

1668 FROEHLICH, J. M. et al. Sarcopenia and piscines: The case for indeterminate-growing fish
1669 as unique genetic model organisms in aging and longevity research. **Frontiers in Genetics**, v.
1670 4, 2013b.

1671 FUENTES, E. N. et al. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal
1672 muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder.
1673 **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v.
1674 300, n. 6, p. R1532–R1542, 2011.

1675 FUENTES, E. N. et al. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone -
1676 Insulin-like growth factor system. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, p.
1677 136–148, 2013a.

1678 FUENTES, E. N. et al. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR
1679 activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in
1680 skeletal muscle of the fine flounder. **General and Comparative Endocrinology**, v. 186, p.
1681 172–180, 2013b.

1682 FUENTES, E. N. et al. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR
1683 activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in
1684 skeletal muscle of the fine flounder. **General and Comparative Endocrinology**, v. 186, p.
1685 172–180, 2013c.

1686 FUENTES, E. N. et al. The TORC1/P70S6K and TORC1/4EBP1 signaling pathways have a
1687 stronger contribution on skeletal muscle growth than MAPK/ERK in an early vertebrate:
1688 Differential involvement of the IGF system and atrogenes. **General and Comparative**
1689 **Endocrinology**, v. 210, p. 96–106, 2015.

1690 GABILLARD, J. C.; KAMANGAR, B. B.; MONTSERRAT, N. Coordinated regulation of
1691 the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal**
1692 **of Endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 15–24, 2006.

1693 GARCIA, F. et al. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with
1694 vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, n. 1–4, p. 39–
1695 46, 2007.

1696 GARCIA, F. et al. Performance and hematology of pacu fed diets supplemented with vitamins
1697 C and/or E. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 314–319, 2011.

1698 GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular
1699 matrix. **Muscle nerve**, v. 44, n. 3, p. 318–331, 2011.

1700 GILMOUR, K. M. et al. Regulation of energy metabolism during social interactions in
1701 rainbow trout: A role for AMP-activated protein kinase. **American Journal of Physiology -**
1702 **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, n. 25, p. ajpregu.00341.2016, 2017.

1703 GLASS, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The**
1704 **international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 10, p. 1974–1984, 2005.

1705 GLASS, D. J. Signaling pathways perturbing muscle mass. **Current opinion in clinical**
1706 **nutrition and metabolic care**, v. 13, n. 3, p. 225–229, 2010.

1707 GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during
1708 muscle atrophy Marcelo. **PNAS**, v. 98, n. 25, p. 14440–14445, 2001.

1709 GUHA, B.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Efficacy of vitamin-C (L-ascorbic acid) in reducing
1710 genotoxicity in fish (*Oreochromis mossambicus*) induced by ethyl methane sulphonate.
1711 **Chemosphere**, v. 47, n. 1, p. 49–56, 2002.

1712 HAGEN, Ø. et al. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding
1713 of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. **Comparative Biochemistry and**
1714 **Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 152, n. 1, p. 47–53, 2009.

1715 HIDALGO, M. C. et al. Regional asymmetry of metabolic and antioxidant profile in the
1716 sciaenid fish shi drum (*Umbrina cirrosa*) white muscle. Response to starvation and refeeding.
1717 **Redox Biology**, v. 11, p. 682–687, 2017.

1718 HUANG, K.; FINGAR, D. C. Growing knowledge of the mTOR signaling network.
1719 **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 36, p. 79–90, 2014.

1720 IBGE. **Produção da Aquicultura**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>>.
1721 Acesso em: 1 out. 2019.

1722 IKEDA, K. et al. Effects of heat stimulation and l-ascorbic acid 2-phosphate supplementation
1723 on myogenic differentiation of artificial skeletal muscle tissue constructs. **Journal of Tissue**
1724 **Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1322–1331, 2015.

1725 JOBLING, M. et al. The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of
1726 nutritional history. **Aquaculture International**, v. 2, n. 2, p. 75–90, 1994.

1727 JOHNSTON, I. A. Quantitative studies of muscle breakdown during starvation in the marine
1728 flat fish *Pleuronectes platessa*. **Cell Tissue Res**, v. 214, p. 369–386, 1981.

1729 JOHNSTON, I. A. Muscle development and growth: Potential implications for flesh quality
1730 in fish. **Aquaculture**, v. 177, n. 1–4, p. 99–115, 1999.

1731 JOHNSTON, I. A. **Muscle development and growth**. [s.l.] Academic Press, 2001.

1732 JOHNSTON, I. A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **Journal of**
1733 **Experimental Biology**, v. 209, n. 12, p. 2249–2264, 2006.

1734 JOHNSTON, I. A.; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of
1735 myotomal muscle mass in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 10, p.
1736 1617–1628, 2011.

1737 JOHNSTON, I. A.; DAVISON, W.; GOLDSPINK, G. Energy metabolism of carp swimming
1738 muscles. **Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and**
1739 **Environmental Physiology**, v. 114, p. 203, 1977.

1740 JONES, J. I. et al. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5:
1741 Potentiation of the effects of IGF-I. **Journal of Cell Biology**, v. 121, n. 3, p. 679–687, 1993.

1742 KEENAN, S. R.; CURRIE, P. D. The Developmental Phases of Zebrafish Myogenesis.
1743 **Journal of Developmental Biology**, v. 7, n. 2, p. 12, 2019.

1744 KIM, J. H.; KANG, J. C. Changes in hematological parameters, plasma cortisol, and
1745 acetylcholinesterase of juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii* supplemented with the dietary

1746 ascorbic acid. **Aquaculture Reports**, v. 4, p. 80–85, 2016.

1747 KIM, J. H.; KANG, J. C. Effects of sub-chronic exposure to lead (Pb) and ascorbic acid in
1748 juvenile rockfish: Antioxidant responses, MT gene expression, and neurotransmitters.
1749 **Chemosphere**, v. 171, p. 520–527, 2017.

1750 KOUMANS, J. T. M. et al. Number of myosatellite cells in white axial muscle of growing
1751 fish: *Cyprinus carpio* L. (Teleostei). **The American Journal of Anatomy**, v. 192, p. 418–
1752 424, 1991.

1753 KUNIYOSHI, M. L. G. et al. Proteomic analysis of the fast-twitch muscle of pacu (*Piaractus*
1754 *mesopotamicus*) after prolonged fasting and compensatory growth. **Comparative**
1755 **Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 30, n. January, p.
1756 321–332, 2019.

1757 LEITÃO, N. DE J. et al. The influence of initial feeding on muscle development and growth
1758 in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, n. 1–2, p. 78–85, 2011.

1759 LISTRAT, A. et al. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh
1760 Quality. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1–14, 2016.

1761 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-
1762 time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

1763 MARECO, E. A. et al. Characterization of the transcriptome of fast and slow muscle
1764 myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 182,
1765 2015.

1766 MARTINS, M. L. et al. Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre
1767 parâmetros hemtológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes,
1768 Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 609–618, 1995.

1769 MARTINS, M. L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated
1770 *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus*
1771 (Monogenea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 655–
1772 658, 1998.

1773 MIRANDA, E. C. et al. Ganho de peso e taxa de sobrevivência de pós - larvas de pacu
1774 (*Piaractus mesopotamicus*) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de vitamina C.
1775 **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 31–36, 2003.

1776 MOMMSEN, T. P. Paradigms of growth in fish. **Comparative Biochemistry and**
1777 **Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 129, n. 2–3, p. 207–219, 2001.

1778 MORAES, J. R. E. et al. A suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do
1779 processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **B. Inst. Pesca**, v. 29, n.

1780 1, p. 57–67, 2003.

1781 MORAES, L. N. et al. Integration of miRNA and mRNA expression profiles reveals
1782 microRNA-regulated networks during muscle wasting in cardiac cachexia. **Scientific**
1783 **Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

1784 MURAD, S. et al. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. **Proceedings of the**
1785 **National Academy of Sciences**, v. 78, n. 5, p. 2879–2882, 1981.

1786 MURRE, C. et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate
1787 complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell**, v. 58, n. 3, p. 537–544,
1788 1989.

1789 NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J. Fasting and starvation. In: HOCHACHKA; MOMMSEN
1790 (Eds.). . **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. [s.l.] Elsevier Science B.V., 1995.
1791 v. 4p. 393–434.

1792 NEBO, C. et al. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of
1793 muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative**
1794 **Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 164, n. 4, p.
1795 268–274, 2013.

1796 NELSON, D. L.; COX, M. M. Capítulo 6 - Enzimas. In: **Principios de Bioquímica de**
1797 **Lehninger**. 6^a ed. [s.l.] Artmed, 2014. p. 189–243.

1798 OHNO, Y. et al. Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in
1799 C2C12 cells. **Acta Physiologica**, v. 223, n. 2, 2018.

1800 OLGUIN, H. C. et al. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors
1801 modulates myogenic cell fate determination. **Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 5, p. 769–
1802 779, 2007.

1803 PAULA, T. G. DE et al. Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene
1804 expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Comparative Biochemistry and**
1805 **Physiology, Part B**, v. 169, p. 31–37, 2014.

1806 PAULA, T. G. DE et al. Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes
1807 in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Plos One**, v. 12, n. 5, p.
1808 e0177679, 2017.

1809 RESCAN, P. Y. et al. Dynamic gene expression in fish muscle during recovery growth
1810 induced by a fasting-refeeding schedule. **BMC Genomics**, v. 8, p. 1–18, 2007.

1811 RODRÍGUEZ-VARGAS, J. M. et al. ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required
1812 for optimal induction of starvation-induced autophagy. **Cell Research**, v. 22, n. 7, p. 1181–
1813 1198, 2012.

1814 ROWLERSON, A.; VEGGETTI, A. Cellular Mechanisms of Post-Embryonic Muscle Growth
1815 in Aquaculture Species. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). . **Muscle development and growth.**
1816 [s.l.] Academic Press, 2001. p. 103–128.

1817 RYAN, M. J. et al. Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves
1818 antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats.
1819 **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 11, p. 882–895, 2010.

1820 SABIONI, R. E. **Suplementação da dieta de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com**
1821 **vitamina C: respostas fisiológicas, imunidade não específica e resistência à inoculação**
1822 **com *Aeromonas hydrophila*.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.

1823 SANCAK, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to
1824 mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496–1501, 2008.

1825 SÄNGER, A. M.; STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: **Muscle**
1826 **development and growth.** San Diego: Academic Press, 2001. p. 187–250.

1827 SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS**
1828 **Journal**, v. 280, n. 17, p. 4294–4314, 2013.

1829 SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years
1830 of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

1831 SEALE, P. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, v.
1832 102, n. 6, p. 777–786, 2000.

1833 SEILIEZ, I. et al. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow
1834 trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, p. 329–
1835 335, 2008.

1836 SEILIEZ, I. et al. Myostatin induces atrophy of trout myotubes through inhibiting the TORC1
1837 signaling and promoting Ubiquitin–Proteasome and Autophagy-Lysosome degradative
1838 pathways. **General and Comparative Endocrinology**, v. 186, p. 9–15, 2013.

1839 SHIMA, A. et al. IGF-I and vitamin C promote myogenic differentiation of mouse and human
1840 skeletal muscle cells at low temperatures. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 3, p. 356–
1841 366, 2011.

1842 SINHA, A. K. Colorimetric assay of catalase. **Analytical Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 389–
1843 394, 1972.

1844 TACCHI, L. et al. Ubiquitin E3 ligase atrogin-1 (Fbox-32) in Atlantic salmon (*Salmo salar*):
1845 sequence analysis, genomic structure and modulation of expression. **Comparative**
1846 **biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 157, n. 4, p.
1847 364–73, dez. 2010.

1848 TACCHI, L. et al. Muscle-specific RING finger (MuRF) cDNAs in Atlantic salmon (*Salmo*
1849 *salar*) and their role as regulators of muscle protein degradation. **Marine biotechnology**
1850 **(New York, N.Y.)**, v. 14, n. 1, p. 35–45, fev. 2012.

1851 TAKISAWA, S. et al. Vitamin C deficiency causes muscle atrophy and a deterioration in
1852 physical performance. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

1853 TAMARI, Y. et al. Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion
1854 of superoxide dismutase in vertebrate cells. **Free Radical Research**, v. 47, n. 1, p. 1–7, 2013.

1855 TURRENS, J. F. Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. **Bioscience**
1856 **Reports**, v. 17, n. 1, p. 3–8, 1997.

1857 URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In:
1858 BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. C. (Eds.). . **Espécies nativas para piscicultura no**
1859 **Brasil**. [s.l.] UFMS - Santa Maria, 2005. p. 225–255.

1860 VALENTE, M. P. et al. Postprandial expression of growth-related genes in Atlantic salmon
1861 (*Salmo salar* L.) juveniles fasted for 1 week and fed a single meal to satiation. **British**
1862 **Journal of Nutrition**, v. 108, n. 12, p. 2148–2157, 2012.

1863 VALENZUELA, C. A. et al. Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic
1864 mechanisms through two different non-overlapping pathways in the skeletal muscle of a
1865 teleost fish. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative**
1866 **Physiology**, n. 43, p. ajpregu.00009.2017, 2017.

1867 VÉLEZ, E. J. et al. IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and
1868 differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. **General and Comparative**
1869 **Endocrinology**, v. 205, p. 296–304, 2014.

1870 VÉLEZ, E. J. et al. Moderate and sustained exercise modulates muscle proteolytic and
1871 myogenic markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Am J Physiol Regul Integr Comp**
1872 **Physiol**, v. 312, p. R643–R653, 2017.

1873 VILLASANTE, A. et al. Effects of anthocyanidins on myogenic differentiation and
1874 antioxidant defense in primary myogenic cells isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus*
1875 *mykiss*). **Aquaculture**, v. 454, p. 81–89, 2016.

1876 VOLKOFF, H. et al. Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Tissue
1877 distribution and effects of food quantity and quality on gene expression. **Comparative**
1878 **Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 203, p.
1879 241–254, 2017.

1880 WATABE, S. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in
1881 fish. **Journal of Fish Biology**, v. 55, n. A, p. 1–18, 1999.

- 1882 WATABE, S. Myogenic Regulatory factors. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). . **Muscle**
1883 **development and growth**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2001. p. 19–36.
- 1884 WILLIAMSON, D. L.; BUTLER, D. C.; ALWAY, S. E. AMPK inhibits myoblast
1885 differentiation through a PGC-1 α -dependent mechanism. **American Journal of Physiology -**
1886 **Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 2, p. 304–314, 2009.
- 1887 WITT, S. H. et al. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins
1888 redundantly: Towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. **Journal of**
1889 **Molecular Biology**, v. 350, n. 4, p. 713–722, 2005.
- 1890 XU, Y. et al. Fish growth in response to different feeding regimes and the related molecular
1891 mechanism on the changes in skeletal muscle growth in grass carp (*Ctenopharyngodon*
1892 *idellus*). **Aquaculture**, v. 512, n. March, p. 734295, 2019.
- 1893 ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. New Jersey: Prentice - Hall, 2009.
1894