

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/01/2026.



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PERFIL TRANSCRICIONAL DE CÉLULAS MUSCULARES

DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) EM RESPOSTA A

SINAIS PRÓ-CRESCIMENTO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN*

VIVO

BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA

PROFA. DRA. MAELI DAL-PAI

PROF. DR. BRUNO OLIVEIRA DA SILVA DURAN

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

Maeli Dal-Pai

BOTUCATU – SP
2024

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Zanella, Bruna Tereza Thomazini.

Perfil transcricional de células musculares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em resposta a sinais pró-crescimento : estudos *in vitro* e *in vivo* / Bruna Tereza Thomazini Zanella. - Botucatu, 2024

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

1. Análise global (Matemática). 2. Bioinformática.
3. Cultura de células. 4. Músculos. 5. Células musculares.

Palavras-chave: Análise global; Bioinformática; Cultura celular; Músculo; Peixes.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 29 dias do mês de janeiro do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-Graduação - Central de Aulas IBB, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA, intitulada **Perfil transcricional de células musculares de pacu (Piaractus mesopotamicus) em resposta a sinais pró-crescimento: estudos in vitro e in vivo**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MAELI DAL PAI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. FLAVIA KARINA DELELLA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. BRUNO EVARISTO DE ALMEIDA FANTINATTI (Participação Presencial) do(a) Universidade Nove de Julho (Uninove) - Bauru, Profa. Dra. CLAUDIA DOS SANTOS MERMELSTEIN (Participação Virtual) do(a) Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) / Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pesquisador Associado PEDRO LUIZ PUCCI FIGUEIREDO DE CARVALHO (Participação Virtual) do(a) Department of Ecology and Conservation Biology / Texas A&M University. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada __. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MAELI DAL PAI



*“Discovery consists of looking at the same
thing as everyone else and thinking some-
thing different.”*

- Albert Szent-Gyorgyi

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio, suporte e confiança em minha capacidade de desenvolvimento e superação. Obrigada por comemorar cada vitória e conforto nas situações desafiadoras.

Agradeço em especial minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal-Pai, por ter aberto as portas do laboratório e grupo de pesquisa desde o início de minha graduação e por todos os ensinamentos, confiança e auxílio. Seu trabalho contribui muito para minha formação como pesquisadora e moldou minha carreira científica.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Bruno Oliveira da Silva Duran, pela parceria a todo instante e sem exceções. Sua atuação foi imensurável para que eu vencesse todas as dificuldades profissionais e pessoais.

Agradeço também a todos os amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para minha formação científica, especialmente Érika, Jéssica e Tassiana, e aos alunos de iniciação científica que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, Isabele, Guilherme e Ana.

Agradeço aos colegas alunos, docentes e técnicos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da UNESP pela convivência e auxílios diários.

Agradeço também a UNESP, como instituição, por ter me acolhido e ter me propiciado oportunidades de crescimento desde o primeiro minuto em que me tornei aluna. Que os princípios de educação gratuita, de qualidade e acesso a todos não sejam nunca perdidos ou ameaçados.

Agradeço imensamente aos membros das comissões examinadoras de qualificação e defesa, Professores Flavia K. Delella, José C. S. Vieira, Bruno E. A. Fantinatti, Claudia Mermelstein e Pedro L. P. F. de Carvalho, pelo tempo disponibilizado e contribuições realizadas.

Por fim, agradeço às agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio fundamental no desenvolvimento deste trabalho através da concessão de auxílios e bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo número #88887.482392/2020-00, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2018/26428-0.

Impacto potencial desta pesquisa

1. Título da Tese: Perfil transcricional de células musculares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em resposta a sinais pró-crescimento: estudos *in vitro* e *in vivo*

Impacto científico: o presente estudo pode contribuir para melhor compreensão da biologia do tecido muscular esquelético em peixes em diferentes modelos de estudos através da caracterização do perfil transcricional de células musculares *in vitro* de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), em relação ao tecido muscular esquelético *in vivo* de juvenis dessa espécie. Além disso, os dados obtidos auxiliam na compreensão de como fatores externos influenciam no crescimento do tecido muscular nestes animais através da avaliação do perfil transcricional destas mesmas células frente a exposição aos fatores pró-crescimento, Igf1 e aminoácidos.

Impacto Econômico e Social: o músculo esquelético em peixes representa uma fonte de alimentação para consumo humano. Recentemente, carnes em laboratório têm sido desenvolvidas a partir de uma técnica chamada cultura de células. Essa técnica visa a produção de carnes com as mesmas características daquelas retiradas de animais, porém com menor impacto ambiental. Nesse estudo, buscamos entender como as células musculares de pacu se comportam em cultura com o objetivo de viabilizar estratégias para tornar essas células ainda mais semelhantes ao músculo desses animais e contribuir com pesquisas visando a futura produção da carne de peixes em laboratório. Além disso, analisamos a expressão de moléculas de sinalização expressas pelas células, quando expostas aos fatores que estimulam o crescimento das células musculares com o objetivo de contribuir com o entendimento sobre condições que podem maximizar o crescimento muscular e o rendimento do filé em peixes.

Potential impact of this research

1. Thesis Title: Transcriptional profile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) muscle cells in response to pro-growth signals: *in vitro* and *in vivo* studies

Scientific impact: the present study can contribute to a better understanding of the biology of skeletal muscle tissue in fish in different study models by characterizing the transcriptional profile of *in vitro* muscle cells from pacu (*Piaractus mesopotamicus*) concerning the skeletal muscle tissue *in vivo* of juveniles of this species. Furthermore, the data obtained helps to understand how external factors influence the growth of muscle tissue in these animals through the evaluation of the transcriptional profile of these same cells when exposed to pro-growth factors, Igf1, and amino acids.

Economic and Social Impact: skeletal muscle in fish represents a food source for human consumption. Recently, cultivated meat has been engineered using a technique called cell culture. This technique aims to produce meat with the same characteristics as those taken from animals but with less environmental impact. In this study, we sought to understand how pacu muscle cells behave in culture to enable strategies to make these cells even more like the muscles of these animals and contribute to research involving the future production of fish meat in the laboratory. Furthermore, we analyzed the expression of signaling molecules expressed by cells when exposed to factors that stimulate the growth of muscle cells to contribute to understanding conditions that can maximize muscle growth and fillet yield in fish.

Sumário

1. Introdução.....	5
1.1. <i>Músculo estriado esquelético em peixes</i>	5
1.2. <i>Miogênese em peixes</i>	7
1.3. <i>Cultura celular de músculo estriado de peixes</i>	12
1.4. <i>Fatores pró-crescimento</i>	16
2. Objetivos.....	20
3. Referências gerais.....	21
CAPÍTULO I.....	28
CAPÍTULO II.....	63
6. Conclusões gerais	86
7. Apêndice – atividades complementares	87

Lista de abreviaturas

4e-bpi: eukaryotic translation initiation factor 4e-binding protein 1

AA: Amino acids

Acat1: acetyl-CoA acetyltransferase 1

Akt: protein kinase B

ATP: adenosina trifosfato

Bmp: bone morphogenetic protein

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

Ckma: creatina kinase, muscle a

Chrna1: cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1

Clu: clusterin

Ctnnb1: catenin (cadherin-associated protein) beta 1

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EROs: espécies reativas de oxigênio

Fgf21: fibroblast growth factor 21

Fn1a: fibronectin 1a

GDE: genes diferencialmente expressos

Gh: growth hormone

Glut4: glucose transporter 4

Hk1: hexokinase 1

Igf1: insulin-like growth factor 1

Igfbp: insulin-like growth factor-binding protein

Mdh2: malate dehydrogenase 2, NAD

MEC: matriz extracelular

MRF: myogenic regulatory factors

Mtor: mechanistic target of rapamycin kinase

Musk: muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase

Myf5: myogenic factor 5

Myf6: myogenic factor 6

Myod: myogenic differentiation

Myog: miogenina

Pax3: paired-box 3

Pax7: paired-box 7

Pi3k: phosphatidylinositol 3-kinase

Pkmb: pyruvate kinase M1/2b

S6k: ribosomal protein s6 kinase

Tgfb: transforming growth factor beta

Resumo

Os peixes compõem um dos grupos de vertebrados mais diversos do planeta, apresentando importância econômica e ecológica. O estudo da biologia desses animais tem sido aplicado para compreensão de fenômenos biológicos e para a avaliação do controle de poluentes, sendo considerados importantes indicadores biológicos. Dentre outras propriedades, esses animais apresentam características relevantes para o estudo do músculo que os diferenciam de outros grupos, porém o perfil molecular de suas células musculares em ambiente *in vitro* não é bem caracterizado. A cultura de células tem contribuído para a compreensão dos efeitos diretos de fatores extrínsecos em células musculares, considerando que estes podem desencadear alterações em vias de sinalização no tecido muscular, resultando também na alteração do fenótipo desse tecido. Fatores pró-crescimento tem sido estudados como fortes efetores para o estímulo da miogênese e hipertrofia das células musculares, sendo o Igf1 (insulin-like growth factor 1) um dos fatores mais estudados nesses animais. Nesse sentido, objetivamos caracterizar o perfil transcricional de células musculares *in vitro* de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), em relação ao tecido muscular esquelético *in vivo* de juvenis dessa espécie e avaliar o perfil transcricional dessas células frente a exposição aos fatores pró-crescimento, Igf1 e aminoácidos. De forma geral observamos que as principais diferenças moleculares entre os modelos *in vitro* e *in vivo* foram relacionadas à proliferação e diferenciação celular, estabelecimento de matriz extracelular e comunicação célula-célula, sendo estes processos mais enriquecidos no modelo *in vitro*, e processos de obtenção de energia, sendo no modelo *in vivo* esses processos foram mais diversos. Quanto ao estímulo com os fatores pró-crescimento, observamos que os aminoácidos tiveram um efeito direto e terminal no crescimento muscular, estimulando processos de proliferação e diferenciação das células musculares, enquanto o tratamento com Igf1 teve um efeito inicial e indireto, estimulando a síntese de proteínas e componentes de sua própria via de sinalização. Identificamos genes chaves e microRNAs modulados especificamente por esses fatores pró-crescimento que podem ser utilizados futuramente como possíveis marcadores moleculares da modulação do crescimento muscular. Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo podem permitir uma melhor compreensão sobre a manutenção de células musculares de peixes em ambiente *in vitro*, possibilitando melhor caracterização do perfil molecular do músculo esquelético de peixes e possíveis aplicações na produção de carne *in vitro*, além de elucidar o mecanismo de ação de fatores de crescimento no tecido muscular desses animais, possibilitando futuras aplicações nos sistemas de aquicultura.

Palavras-chaves: músculo; peixes; cultura celular; análise global; transcriptoma

Abstract

Fishes are one of the most diversified vertebrate groups on the planet, with worldwide importance in economic and food production. The study of the biology of these animals has been applied to understand several biological phenomena and to evaluate the control of pollutants in the environment, as these animals are considered biological indicators. Among other properties, fishes have relevant characteristics for the skeletal muscle study that differentiate them from other groups. Nevertheless, the molecular profile of their muscle cells, especially in an *in vitro* environment, is not well characterized. Cell culture has contributed to the understanding of the direct effects of extrinsic factors on fish muscle cells, considering that these factors can trigger alterations in the modulation of signaling pathways in skeletal muscle, which also results in changes in the phenotype of this tissue. Among the factors that modulate muscle tissue, pro-growth factors have been studied as effective effectors for stimulating myogenesis and hypertrophy of muscle cells, with Igf1 (insulin-like growth factor 1) being one of the most studied growth factors in these animals. In this sense, the objective of this work was to characterize the transcriptional profile of *in vitro* muscle cells of pacus (*Piaractus mesopotamicus*) compared to the *in vivo* skeletal muscle tissue of pacu juveniles and to evaluate the transcriptional profile of these cells submitted to treatment with pro-growth factors, Igf1 and amino acids. In general, the main differences between the *in vitro* and *in vivo* models were related to cell proliferation and differentiation, extracellular matrix establishment, and cell-cell communication, processes that were enhanced in the *in vitro* model, and processes related to energy production that were more diverse in the *in vivo* model. Considering the pro-growth stimulus, the amino acids had a direct and terminal effect, stimulating the proliferation and differentiation of muscle cells, while Igf1 had an initial effect, stimulating protein synthesis and its own pathway. We identified key genes and microRNAs modulated by each pro-growth factor that can be future applied as molecular markers of muscle growth modulation. The data obtained in the present study may allow a better understanding of the maintenance of fish muscle cells in an *in vitro* environment, allowing a better characterization of the molecular profile of fish skeletal muscle and its possible applications in *in vitro* meat production. In addition, our data can elucidate the mechanism of action of the growth factors in the muscle tissue of these animals, allowing future innovations in aquaculture systems.

Keywords: muscle; fish; cell culture; omics; transcriptome

1. Introdução

1.1. Músculo estriado esquelético em peixes

O setor da aquicultura tem ganhado grande reconhecimento por sua contribuição nas áreas de nutrição e segurança alimentar, sendo um dos principais setores de comercialização mundial (FAO, 2022). Somente em 2020 a produção global da aquicultura alcançou a marca de 178 milhões de toneladas, o que corresponde a 406 bilhões de dólares. Do total da produção, 51% são provenientes de capturas, enquanto 49% correspondem a sistemas de cultivo. Ainda, 89% da produção total é direcionada exclusivamente para o consumo humano (FAO, 2022).

No Brasil, a produção no setor da aquicultura chegou a 664 mil toneladas em 2021. Peixes nativos, como os redondos, totalizaram em conjunto 147 mil toneladas da produção nacional (IBGE, 2022). Entre os peixes redondos podemos citar o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que possui crescimento acelerado e boa aderência à alimentação artificial, adaptações importantes para a aquicultura intensiva (Urbinati e Gonçalves, 2005; Volkoff et al, 2017).

Os peixes compõem um dos grupos mais diversos de vertebrados do planeta e, além de sua importante representação no setor econômico e alimentício, esses animais também possuem características vantajosas para o estudo do tecido muscular. Devido ao habitat em que vivem, a proporção de 40 a 70% de tecido muscular esquelético, em relação ao peso corporal, é benéfica, pois permite a execução de movimentos rápidos, o que devido à densidade do ambiente aquático demanda maior quantidade de energia se comparado ao ambiente terrestre (Bone, 1978).

O crescimento muscular nesses animais apresenta uma característica que os diferem dos outros vertebrados, o crescimento indeterminado. Após a maturação sexual, a formação de novas fibras musculares, processo denominado hiperplasia, continua em taxas significativamente maiores nos peixes em comparação aos mamíferos. Nos mamíferos, o aumento da massa muscular na fase pós-natal ocorre quase que exclusivamente pelo aumento do diâmetro de fibras musculares pré-existentes, processo denominado hipertrofia. Ainda, apesar de alguns teleósteos não apresentarem este padrão de crescimento, como o zebrafish (*Danio rerio*), essa característica confere benefícios para a utilização desses animais como modelos para estudos do crescimento muscular de forma contínua (Biga e Goetz, 2006; Vélez et al, 2016).

Outra característica única desse grupo é a organização do tecido muscular. Em peixes, a musculatura esquelética se organiza em miômeros, estruturas morfofuncionais idênticas. Os miômeros são separados entre si por camadas de tecido conjuntivo, os miosseptos. A

organização entre os miômeros e miosseptos se apresenta de forma característica, lembrando a letra W (Fig. 1). Essa forma de organização do músculo esquelético auxilia na realização dos movimentos ondulatórios para natação e para a transmissão da força de contração (Sänger e Stoiber, 2001).

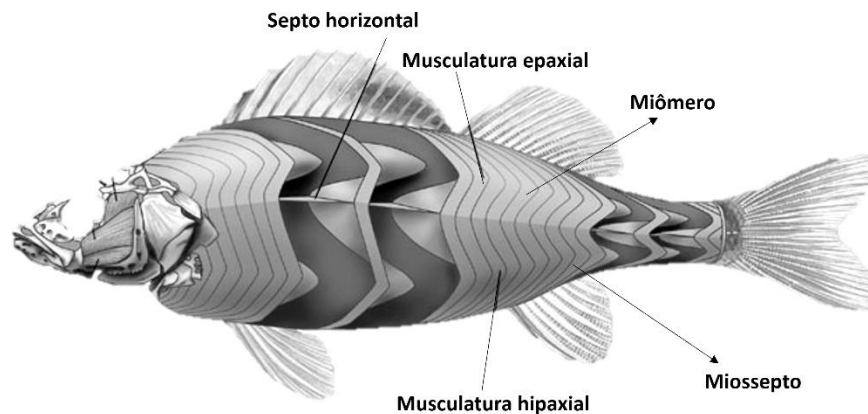


Figura 1. Organização da musculatura esquelética em peixes. Miômeros separados por miosseptos. Adaptado de: 2005. "v04_id131_con_axialmu.jpg" (On-line), Animal Diversity Web. Acesso em 23 de julho de 20203. Disponível em:

https://animaldiversity.org/collections/contributors/Grzimek_fish/structure_function/v04_id131_con_axialmu/.

Por fim, uma terceira característica que diferencia a organização do tecido muscular nos peixes é a compartimentalização. Nesses animais, as fibras, ou células musculares, são delimitadas em três compartimentos: oxidativo ou vermelho, glicolítico ou branco e intermediário. A proporção de cada compartimento varia de acordo com a espécie e com o ambiente em que o animal habita (Johnston et al, 1977).

O compartimento de fibras oxidativas conta com grande suprimento sanguíneo, motivo pelo qual esse compartimento também pode ser denominado como vermelho. As fibras presentes nessa região possuem muitas mitocôndrias e conseqüentemente o metabolismo oxidativo é predominante. As células desse compartimento são recrutadas em movimentos contínuos como para a sustentação do animal na coluna d'água e migração (Johnston et al, 1977; Sänger e Stoiber, 2001). As fibras musculares do compartimento glicolítico, também denominado de compartimento branco, possuem poucas mitocôndrias, metabolismo predominantemente glicolítico e diâmetros maiores em comparação às fibras do compartimento oxidativo. Nesse compartimento o suprimento sanguíneo é baixo e as fibras musculares contribuem para a realização de movimentos rápidos, como a captura de presas e fuga de

predadores (Johnston et al, 1977; Sanger e Stoiber, 2001). Entre os compartimentos oxidativo e glicolítico, há o compartimento intermediário no qual as fibras musculares apresentam características mistas tanto de células musculares oxidativas quanto glicolíticas (Johnston et al, 1977; Sanger e Stoiber, 2001) (Fig.2).

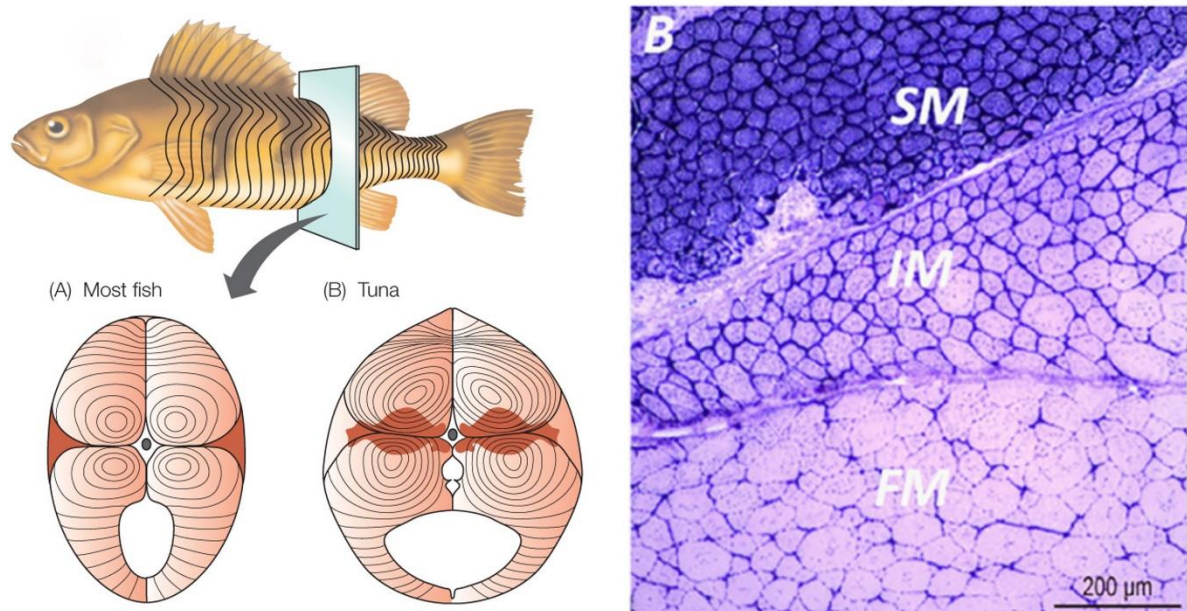


Figura 2. Compartimentalizao do tecido muscular em peixes. (A) Comparao entre o compartimento glicolítico (em rosa) e o compartimento oxidativo (em vermelho) na maioria dos peixes e em uma espécie específica, o atum (*Thunnus spp*). Fonte: Macmillan learning. Acesso em 23 de julho de 2023. Disponível em https://www.macmillanhigared.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/hillis2e_ch33_4.html. (B) Corte histológico do tecido muscular esquelético de pacu mostrando a separao dos compartimentos oxidativo (SM), intermediário (IM) e glicolítico (FM). Reao histoquímica por NADH-TR. Fonte: Dal-Pai-Silva et al, 2019, pp. 165, In: Baldisseroto, Urbinati e Cyrino. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*.

1.2. Miogênese em peixes

O processo de formao do tecido muscular esquelético, ou miogênese, em peixes assim como nos demais vertebrados ocorre no início da embriogênese. Especificamente nos peixes, o tecido muscular da região axial  o mais abundante, auxiliando nos movimentos necessários para natao e sustento (Keenan e Currie, 2019). No grupo dos teleósteos, a miogênese se inicia com a segmentao anteroposterior da mesoderme paraxial em blocos de células denominados somitos. Em seguida, os somitos são novamente segmentados em outros dois

conjuntos de células: esclerótomo e miótomo. No miótomo, as células passam a expressar fatores de regulação miogênica (MRFs, do inglês: myogenic regulatory factors), sendo neste estágio do desenvolvimento que se tornam comprometidas com a linhagem miogênica. Nesta etapa do desenvolvimento, as células também passam a apresentar componentes característicos das células musculares, como proteínas estruturais, miosinas (Currie e Ingham, 2001; Keenan e Currie, 2019).

Para o grupo dos peixes, o comprometimento já no início do desenvolvimento com a linhagem miogênica é uma característica vantajosa, considerando que a fertilização geralmente ocorre no ambiente externo. Sendo assim, o comprometimento inicial e a rápida formação de células musculares propiciam a fuga de predadores, o que aumenta a chance de sobrevivência dos embriões (Currie e Ingham, 2001).

Após a formação e comprometimento das células miogênicas, células denominadas adaxiais passam pela determinação de seu fenótipo a partir da influência de fatores derivados da notocorda (Fig. 3). Um exemplo disso é o fator Hedgehog que reprime a expressão de genes que determinam as células musculares glicolíticas, o que resulta no fenótipo oxidativo das células adaxiais (Blagden et al, 1997; Keenan e Currie, 2019). É a partir do desenvolvimento das células adaxiais que células estriadas e alongadas passam a compor o miótomo, assim como células musculares denominadas como pioneiras que contribuem para as demais etapas da formação muscular (Currie e Ingham, 2001; Keenan e Currie, 2019).

Como discutido anteriormente, as fibras musculares em peixes são separadas em compartimentos bem delimitados de acordo com suas características fenotípicas e fisiológicas. A musculatura vermelha se forma a partir da migração das células adaxiais da região adjacente a notocorda para a região superficial do embrião. Já o compartimento da musculatura branca se forma a partir de células que, após a migração das células adaxiais, permanecem na região interna do miótomo (Fig. 3) (Devoto et al, 1996). Em comparação, nos mamíferos a especificação dessas células ocorre ao longo de todo o miótomo, o que caracteriza a distribuição irregular de células musculares com padrão fisiológico distinto no tecido muscular esquelético desses animais (Currie e Ingham, 2001).

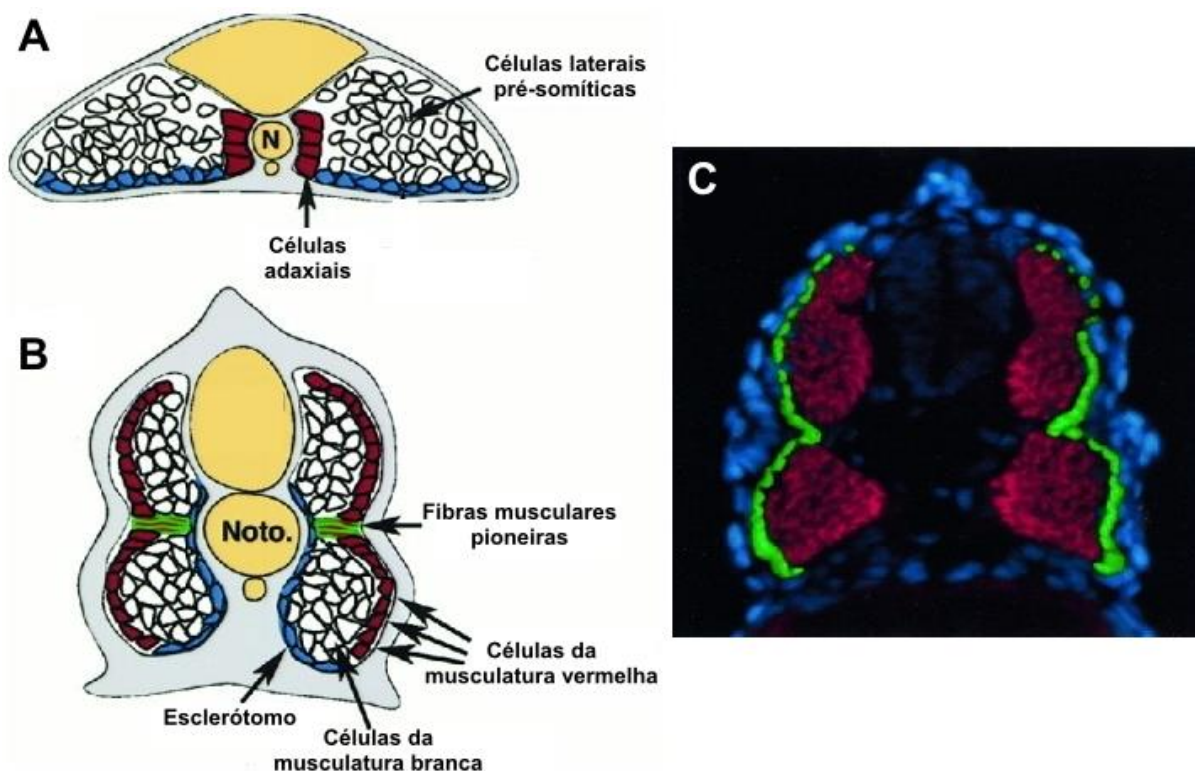


Figura 3. Miogênese embrionária em peixes. (A) Esquema de corte transversal de embrião de zebrafish com 13 horas de desenvolvimento. Células denominadas adaxiais passam pela determinação de seu fenótipo pelo estímulo de fatores derivados da notocorda, essas células darão origem às fibras musculares do compartimento vermelho. Células pré-somíticas laterais contribuem para o desenvolvimento das fibras da musculatura branca. (B) Esquema de corte histológico de embrião de zebrafish com 24 horas de desenvolvimento destacando a localização das células das musculaturas vermelha e branca após a migração das células adaxiais. (C) Fibras musculares do compartimento vermelho (em verde – marcação por anticorpo S58) formam uma camada de células superficiais, enquanto as fibras musculares do compartimento branco (em vermelho – marcação por anticorpo zm4) permanecem numa região mais profunda do miótomo (adaptado de Stickney et al, 2000).

Em peixes, ocorre também um processo denominado miogênese secundária no qual esses animais crescem de forma acelerada, conservando as características da miogênese primária. Esse processo acontece a partir da formação de uma camada externa de células oriundas de células não adaxiais localizadas nos somitos. De forma geral, essas células contribuem para o crescimento muscular durante toda a vida, caracterizando o padrão de crescimento indeterminado (Keenan e Currie, 2019). É também a partir dessa camada de células que serão derivadas as células precursoras miogênicas, ou células satélites. As células satélites contribuem para a regeneração e crescimento muscular, possuem capacidade de renovação e são mantidas ao longo de todo o desenvolvimento (Johnston et al, 2011).

O estado quiescente e atividades das células satélites é controlado por genes membros da família paired-box como *pax3* e *pax7*. Nos mamíferos a expressão de *pax3* é alta durante a embriogênese, e posteriormente diminui quando *pax7* passa a ser expresso em níveis significativos. A marcação por *pax7* tende a indicar o estado quiescente das células satélites, enquanto a manutenção do pool de células satélites em embriões de mamíferos é controlada, possivelmente, pela expressão de *pax3* (Buckingham e Rigby, 2014). Em peixes, a manutenção da expressão de *pax3* nas fases pós-natais de desenvolvimento pode estar relacionada a capacidade de esses animais manterem o crescimento muscular por hiperplasia e hipertrofia, fato não observado em mamíferos (Froehlich et al, 2013a, 2013b).

Durante a embriogênese e nas fases pós-natais, os MRFs estimulam os processos de proliferação e diferenciação das células musculares a partir da ativação das células satélites, processo que ocorre através da diminuição da expressão de *pax7* e dos demais fatores que controlam o estado quiescente dessas células (Watabe, 1999, 2001). Os MRFs primários, *myod* (*myogenic differentiation 1*) e *myf5* (*myogenic factor 5*), estimulam a proliferação das células musculares, denominadas então de mioblastos, enquanto os MRFs secundários, *miogenina* e *myf6* (*myogenic factor 6*), induzem a diferenciação dessas células em miotubos (Fig. 4) (Watabe, 1999, 2001). A diferenciação de mioblastos em miotubos depende da fusão entre os mioblastos, o que está sujeito a uma série de eventos, como adesão e reconhecimento entre as células, rearranjo do citoesqueleto e fusão entre as membranas (Fig. 4) (revisado por Kim et al, 2015). Recentemente, outros fatores, além dos MRFs, foram descritos como atuantes nos processos de fusão e diferenciação das células musculares, como o gene *myomaker*, que codifica uma proteína muscular transmembrana, e um micropeptídeo específico do tecido muscular denominado *myomixer*. Esses fatores foram primeiro identificados em mamíferos, mas a sua atuação também já foi comprovada como essencial para o processo de fusão entre os mioblastos de peixes (Landemaine et al, 2014; Shi et al, 2017).

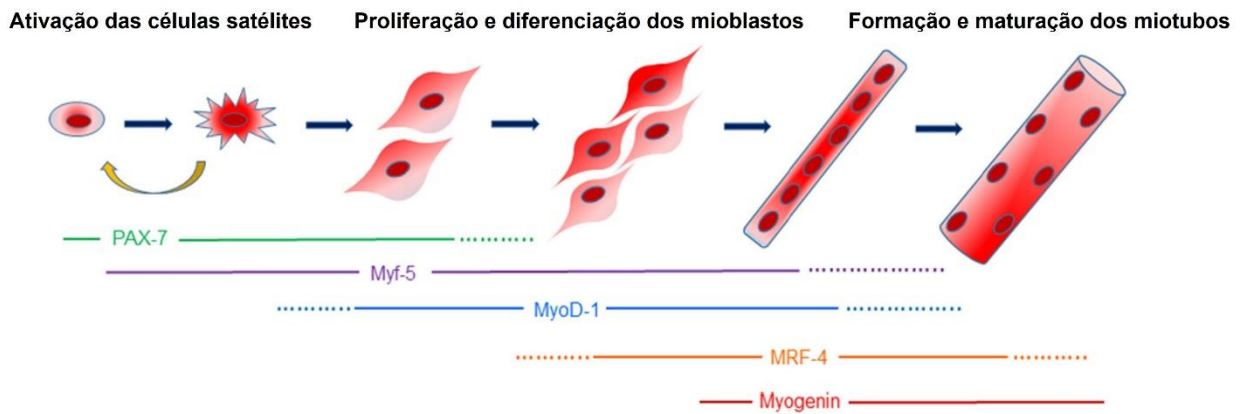


Figura 4. Atuação dos fatores de regulação miogênica (MRFs) no processo de miogênese embrionária e pós-natal. A diminuição de *pax7* leva a saída do estado de quiescência de células satélites que se diferenciam em mioblastos. Os MRFs primários *myf5* e *myod* estimulam a proliferação dos mioblastos, enquanto os MRFs secundários miogenina e *mrf4* (*myf6*) estimulam a fusão dos mioblastos e posterior diferenciação em miotubos (adaptado de Romagnoli e Brandi, 2021).

O microambiente tecidual também exerce forte influência sobre a atividade das células musculares, o que foi investigado principalmente em experimentos utilizando células musculares *in vitro*. O cultivo de células musculares da linhagem C2C12 em matrigel, uma membrana basal solubilizada, foi avaliado por Ding et al, 2020. Os autores observaram que as células cultivadas na presença de matrigel resultavam em miotubos mais longos e com maior diâmetro. Ainda, quando o fator SU9516, que estimula a expressão da integrina $\alpha7\beta1$, foi adicionado ao cultivo esses efeitos foram exacerbados, o que indica a importância da homeostase das interações entre as células musculares e matriz extracelular (MEC) para o desenvolvimento do tecido muscular (Ding et al, 2020).

Células C2C12 cultivadas na presença de fibronectina, colágeno ou de proteoglicanos advindos da MEC descelularizada proveniente do tecido muscular, rapidamente sintetizam glicoproteínas de matriz criando o seu próprio microambiente (Chaturvedi et al, 2015). Quando cultivadas em modelo 3D na presença da MEC descelularizada, essas células foram capazes de manter a proliferação e a organização celular, se estabelecendo de forma linear ou em padrão circular e seguindo a estrutura da MEC, indicando que a MEC pode organizar e direcionar células musculares em desenvolvimento (Chaturvedi et al, 2015). Além disso, os proteoglicanos presentes na MEC podem atuar na biodisponibilidade de fatores de crescimento como o TGF β

(Lund e Cornelison, 2013), indicando a importância da MEC não só na estruturação do tecido muscular, assim como para a interação das células musculares entre si e com outros fatores.

A miogênese e crescimento muscular pós-natal são processos complexos que envolvem uma série de eventos controlados por vias de sinalização e fatores de regulação distintos. O mecanismo e controle desses processos no músculo de peixes vem sendo investigados em experimentos utilizando modelos *in vitro*, uma vez que essa metodologia recapitula as etapas que ocorrem durante a miogênese (Vélez et al, 2016).

1.3. Cultura celular de músculo estriado de peixes

A cultura de células, nomeada primeiramente como cultura de tecidos, é uma técnica que foi desenvolvida para permitir o estudo das células animais sem a influência de variações externas e sistêmicas que podem ocorrer de forma normal ao longo do desenvolvimento dos organismos ou devido a situações patológicas e experimentais (Freshney, 2010).

Os experimentos com cultura de células permitem investigações nas mais diversas áreas do conhecimento. A fisiologia e crescimento dos peixes vem sendo avaliada em uma série de estudos que utilizam modelos *in vivo*. No entanto, devido às interações sistêmicas, algumas questões podem ser melhor elucidadas utilizando os modelos *in vitro* (Vélez et al, 2016). Um exemplo disso é avaliação de fatores de crescimento como o Igf1, uma vez que em estudos *in vivo* não é possível diferenciar se os níveis circulantes desse fator de crescimento são provenientes do tecido muscular esquelético ou do fígado (Vélez et al, 2016). Diversos outros desafios presentes na aquicultura foram investigados utilizando modelos *in vitro* como o controle da saúde dos animais, resposta a infecções virais e bacterianas, edição de genes específicos, aplicações toxicológicas e ambientais, além do estudo de nutrientes específicos (Goswani et al, 2022).

Especificamente em relação ao músculo esquelético, alterações no meio de cultivo são amplamente aplicadas para avaliar o efeito de fatores externos nos processos de proliferação, diferenciação e crescimento de células musculares de peixes. Bower e Johnston, 2010, suplementaram o meio de cultivo de células musculares de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) com Igf1 e aminoácidos para avaliar a expressão de Igfs e proteínas de ligação ao Igf, as Igfbps.

Castillo et al, 2004, 2006, avaliaram o efeito de Igf1 e insulina na proliferação e absorção de glicose e alanina em células musculares *in vitro* de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Jiang et al, 2017, avaliaram a deficiência ou suplementação de metionina no perfil proteômico de células musculares *in vitro* de *Scophthalmus maximus*. Recentemente, Luo et al, 2023, avaliaram a oxidação e esterificação de ácidos graxos em células musculares *in vitro* de carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com ácido linoleico. Nosso grupo de pesquisa também utilizou células musculares *in vitro* de pacu para investigar a influência de microRNAs durante a proliferação e diferenciação de células musculares (Duran et al, 2015), assim como para avaliar a resposta dessas células frente a suplementação com ácido ascórbico quando expostas a oxidante (Duran et al, 2019) ou restrição de nutrientes (Zanella et al, 2021).

Sendo assim, diversos são os estudos que demonstram a contribuição dos estudos *in vitro* para a compreensão de diferentes fenômenos biológicos em peixes, porém algumas inconsistências são observadas nas respostas moleculares entre modelos *in vitro* e *in vivo*, principalmente considerando os estudos farmacológicos onde há uma dificuldade na padronização de dosagem de drogas entre estes modelos experimentais (Otava et al, 2015).

McMullen et al, 2019, utilizaram dados públicos para avaliar a resposta transcricional em hepatócitos, *in vitro*, e em fígado de ratos, *in vivo*, frente a exposição a diferentes compostos. Os autores observaram uma discrepância tanto nas vias enriquecidas entre esses modelos experimentais, assim como na expressão de genes-alvos. Isolando as principais diferenças entre os modelos experimentais, ou seja, as vias que são comumente enriquecidas em cada modelo experimental independente do composto químico aplicado, os autores aumentaram em 36% a concordância entre a comparação dos resultados nos modelos *in vitro* e *in vivo*, destacando a necessidade de levar em conta as diferenças sistêmicas nas comparações entre modelos experimentais diferentes (McMullen et al, 2019).

Considerando especificamente as células do tecido muscular esquelético, a aplicação dos resultados obtidos em modelos *in vitro* enfrenta não só a barreira da extrapolação dos resultados para modelos e situações *in vivo*, como também apresenta diferenças fisiológicas entre espécies e linhagens celulares (Abdelmoez et al, 2020; Allen et al, 2023).

Abdelmoez et al, 2020, analisando dados públicos de transcriptoma de linhagens de células musculares C2C12 e L6, células musculares humanas em cultura primária e tecido muscular esquelético de camundongos e humanos observaram diferenças no padrão de expressão de genes relacionados ao metabolismo e função do músculo esquelético. Além disso, comparando experimentalmente células C2C12, L6 e células musculares humanas, os autores observaram diferenças na captação de glicose e atividade mitocondrial tanto em comparação entre os tipos celulares quanto em características espécies específicas (Abdelmoez et al, 2020).

As diferenças observadas entre os modelos *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionadas não só com as distinções entre as espécies, como também às características do cultivo de células em ambiente *in vitro*. Células musculares são comumente cultivadas na presença de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) e suplementadas com compostos derivados de animais como o soro fetal bovino e soro de cavalo. Apesar de a combinação desses fatores ser amplamente aplicada e ser ideal para proliferação e diferenciação das células musculares, uma dose de nutrientes supra fisiológica pode estar presente nesses meios de cultivo, o que pode alterar a forma de resposta dessas células (Allen et al, 2023). Apesar de estratégias para melhor adaptação do modelo *in vitro* às condições reais dos organismos serem aplicadas, como a utilização de plasma e soro humano para o cultivo de células, co-cultura e explante (Allen et al, 2023), essa metodologia ainda precisa ser mais bem padronizada, principalmente para organismos não modelos como os peixes.

As células *in vitro* podem ser obtidas a partir de culturas primárias e de linhagens celulares. Nas culturas primárias, o tecido alvo é retirado diretamente do animal, as células são separadas mecanicamente e/ou enzimaticamente e cultivadas em suspensão ou em um substrato sólido. Após diversos ciclos de proliferação e expansão, essas células podem ser subcultivadas, ou seja, diluídas e cultivadas em novos substratos. Esse processo pode dar origem às linhagens celulares, no qual as células mantêm a capacidade proliferativa após múltiplos subcultivos, podendo se tornar imortalizadas (Freshney, 2010).

Atualmente, o banco de dados Cellulosaurus que compila dados de linhagens celulares, possui 913 linhagens de células de peixes cadastradas. Essas células foram isoladas de diferentes fontes como nadadeiras, olhos, fígado e rins (Bairoch, 2018). No entanto, somente

linhagens de dezoito espécies foram isoladas de músculo esquelético, sendo que apenas duas dessas linhagens tem potencial miogênico confirmado (Bairoch, 2018). Nesse sentido, o desenvolvimento de linhagens de células musculares de peixes, assim como de melhores estratégias para manutenção dessas células, traz benefícios para o aprofundamento sobre a biologia do tecido muscular desses animais e para aplicações na produção de alimentos.

Nessa linha de investigação, Zhi et al, 2023, estabeleceram uma linhagem de células musculares de *Cyprinus carpio haematopterus* e testaram sua resposta frente a infecções bacterianas, pesticidas, metais pesados e alterações genéticas. Embora o objetivo principal não tenha sido monitorar as características específicas das células musculares, o estabelecimento e caracterização dessa linhagem celular pode ser útil para estudos futuros, considerando que o cultivo desse animal e estudos em toxicologia *in vivo* levam longos períodos para serem finalizados (Zhi et al, 2023). Em um estudo pioneiro, Saad et al, 2023, isolaram e propagaram células musculares esqueléticas de *Scomber scombrus* que foram capazes de manter as características miogênicas e a capacidade de proliferação mesmo após múltiplos cultivos. Além disso, essas células demonstraram a capacidade de acumular lipídeos quando estimuladas, o que pode ser de grande auxílio no desenvolvimento de carne *in vitro* de peixes (Saad et al, 2023).

Como descrito nos tópicos anteriores, a aquicultura vem aumentando seus números globalmente de forma rápida e constante. No entanto, ainda há desafios a serem enfrentados quanto a segurança e qualidade dos produtos comercializados. Nesse sentido, a produção de carne *in vitro* pode solucionar problemas enfrentados pelos sistemas de cultivo e captura de peixes, além de reduzir os riscos de contaminações e as pressões na obtenção dos recursos naturais e exploração do meio ambiente (Goswani et al, 2022).

Sendo assim, a comparação entre os perfis de respostas e assinatura transcricional nos sistemas *in vitro* e *in vivo* pode auxiliar na extrapolação dos dados observados em sistemas isolados para os organismos com um todo e na aproximação dos dois modelos experimentais, reduzindo o número de animais utilizados em experimentos e ampliando os conhecimentos sobre a manutenção de células musculares de peixes em ambiente *in vitro*.

1.4. Fatores pró-crescimento

São inúmeros os efetores que podem modular o fenótipo do tecido muscular esquelético em peixes. Dentre estes, o Igfl (insulin-like growth factor 1) é um dos fatores mais estudados e um dos principais promotores de crescimento muscular em peixes (Vélez et al, 2017). Similarmente ao observado em mamíferos, o polipeptídeo de Igfl em teleósteos é formado por aproximadamente 68 a 70 aminoácidos. A expressão do gene que codifica esse fator de crescimento foi observada em peixes desde a embriogênese até a fase adulta em diferentes tecidos e órgãos como músculo esquelético, tecido adiposo, intestino, fígado, coração e rim, sendo que a maior expressão tende a ser no fígado na maioria das espécies (Wood et al, 2005).

A partir da ligação de Igfl ao seu receptor ocorre uma série de fosforilações em seus alvos *downstream* resultando na síntese de proteínas e hipertrofia das fibras musculares (Glass, 2010) (Fig. 5). Apesar da conservação estrutural dos receptores de Igfl entre as espécies de peixes e entre peixes e mamíferos (Wood et al, 2005), os estudos que realizaram as primeiras identificações desses receptores em peixes indicaram grande quantidade de receptores de Igfl presentes nos tecidos, principalmente quando comparado ao número de receptores de insulina (Parrizas et al, 1995; Vélez et al, 2017). Posteriormente, esses achados foram confirmados nos compartimentos oxidativos e glicolíticos do músculo esquelético, assim como no coração e em células musculares *in vitro* de diferentes teleósteos. Essa grande quantidade de receptores de Igfl em peixes pode facilitar a atuação desse fator de crescimento e indicar funções metabólicas além daquelas observadas em mamíferos (Vélez et al, 2017).

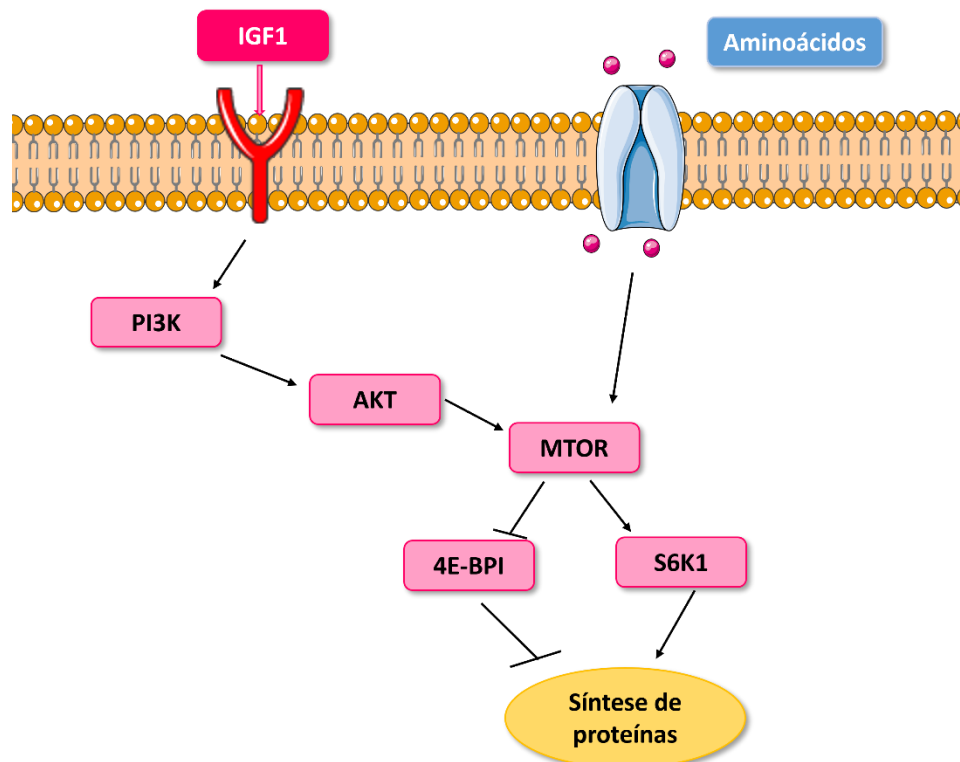


Figura 5. Estímulo e ativação de componentes downstream por fatores pró-crescimento. Após a ligação de IGF1 ao seu receptor, ocorre a fosforilação nos alvos *downstream* PI3k (phosphatidylinositol 3-kinase), Akt (proteín kinase B) e Mtor (mechanistic target of rapamycin kinase). Uma vez fosforilada, Mtor fosforila 4e-bpi (eukaryotic translation initiation factor 4e-binding protein 1), inibidor do anabolismo, e S6k1 (ribosomal protein s6 kinase), efetor do anabolismo, resultando na síntese de proteínas. Alternativamente, os aminoácidos também são capazes de promover a fosforilação e ativação de Mtor. Adaptado de Vélez et al, 2017. Ícones obtidos em smart.servier.com.

Os efeitos de IGF1 na síntese proteica e hipertrofia são bem caracterizados em diversas espécies de peixes como *sea bream* (*Sparus aurata*), truta arco-íris, *Lates calcarifer* e *Fundulus grandis* (revisado por Fuentes et al, 2013). A correlação entre os níveis plasmáticos de IGF1 e as taxas de crescimento em salmão também foram observadas, assim como a administração direta de IGF1 levou ao aumento do tamanho corporal de juvenis dessa mesma espécie (revisado por Vélez et al, 2017). Além disso, o estímulo de IGF1 nos processos de proliferação e diferenciação celular foi comprovado em células musculares *in vitro* de peixes, como truta arco-íris e *sea bream* (Castillo et al, 2004; Vélez et al, 2014; Hue et al, 2023) e em diferentes meios de cultivos em mioblastos *in vitro* de truta arco-íris (Gabillard et al, 2010). Ainda, a suplementação de IGF1 estimulou maior captação de glicose comparada ao tratamento com insulina em truta arco-íris (Castillo et al, 2004), assim como estimulou a expressão de Glut4 (glucose transporter 4) em

mioblastos de juvenis dessa mesma espécie (Díaz et al, 2009) e mioblastos de *sea bream* (Montserrat et al, 2012), indicando efeitos adicionais de Igfl, além dos efeitos mitôgenicos, em células musculares de peixes.

A atuação e expressão de Igfl sofre influência de hormônios, como o Gh (*growth hormone*), hormônios sexuais esteroides, glicocorticoides e hormônios tireoidianos (3,5,3'-triiodothyronine, T3) e de variações ambientais e nutricionais (Wood et al, 2005). Da mesma forma, os componentes da via Igfl também podem ser influenciados por esses fatores e serem ativados independentemente da atividade de Igfl. Exemplo disso é a ativação de Mtor a partir da adição de aminoácidos na alimentação ou meio de cultivo celular de mioblastos de truta arco-íris (Seiliez et al, 2008) e *sea bream* (Vélez et al, 2014).

De fato, células musculares *in vitro* de salmão do Atlântico mantidas em restrição de nutrientes apresentaram aumento da fosforilação de Mtor e da expressão de *hsp90α*, assim como de co-chaperonas indicando a ativação da resposta ao processamento de proteínas quando aminoácidos foram adicionados ao meio de cultivo (Garcia de la Serrana e Johnston, 2013). Similarmente, a adição de aminoácidos junto a suplementação de insulina em mioblastos de truta arco-íris foi capaz de aumentar os efeitos anabólicos da insulina, maximizando a fosforilação de componentes da via de sinalização de Igfl (Seiliez et al, 2008). Em concordância, Vélez et al, 2014, observaram a ativação de Mtor, de forma independente da presença de Igfl, em células musculares de *sea bream* suplementadas com aminoácidos. A presença de aminoácidos também foi capaz de regular a transcrição e ativação de outros componentes do sistema de Igfs, como as Igfbps, fato observado em experimentos com salmão do Atlântico (Bower e Johnston, 2010; de la Serrana e Johnston, 2013).

Os resultados investigados até o momento indicam que em peixes tanto o Igfl quanto outros fatores pró-crescimento, como os aminoácidos, possuem atuação direta no crescimento muscular e que, aparentemente, os aminoácidos são capazes de estimular o crescimento muscular de forma efetiva independente de Igfl (Seiliez et al, 2008; Vélez et al, 2014). No entanto, até onde tange nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a modulação global de vias moleculares por esses fatores isoladamente na proliferação, diferenciação e hipertrofia de

células musculares de peixes. Estudos nesse sentido podem contribuir para caracterização da ação de Igf1 e aminoácidos especificamente nas células musculares e contribuir com novas estratégias de produção na aquicultura.

3. Referências gerais

Abdelmoez, A.M., Puig, L.S., Smith, J.A.B., Gabriel, B.M., Savikj, M., Dollet, L., Chibalin, A.V., Krook, A., Zierath, J.R., Pilon, N.J., 2020. Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 318: C615–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00540.2019>.

Allen, S.L., Elliott, B.T., Carson, B.P., Breen, L. 2023. Improving physiological relevance of cell culture: the possibilities, considerations, and future directions of the ex vivo coculture model. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023 324:2, C420-C427. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00473.2022>

Animal Diversity Web. Acesso em 23 de julho de 20203. Disponível em: https://animaldiversity.org/collections/contributors/Grzimek_fish/structure_function/v04_id131_con_axialmu/

Bairoch, A., 2018. The Cellosaurus, a cell line knowledge resource. *J. Biomol. Tech.* 29:25-38. <https://doi.org/10.7171/jbt.18-2902-002>.

Biga, P.R., Goetz, F.W., 2006. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291; 5:R1327-37. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00905.2005>.

Blagden, C.S., Currie, P.D., Ingham, P.W., Hughes, S.M., 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev.* 11; 17:2163-75. <https://doi.org/10.1101/gad.11.17.2163>.

Bone, Q., 1978. Locomotor muscle, in: *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 361–424. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60168-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60168-5)

Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and insulin-like growth factors during myogenesis in Atlantic salmon. *PLoS One*; 5(6):e11100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011100>.

Buckingham, M., Rigby, P.W., 2014. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev Cell.* 28; 3:225-38. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020>.

- Castillo, J., Codina, M., Martínez, M. L., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2004. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 286, R935–R941. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00459.2003>.
- Castillo, J., Ammendrup-Johnsen, I., Codina, M., Navarro, I. and Gutiérrez, J., 2006. IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1683–R1690. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00294.2005>.
- Chaturvedi, V., Dye, D.E., Kinnear, B.F., van Kuppevelt, T.H., Grounds, M.D., Coombe, D.R., 2015. Interactions between Skeletal Muscle Myoblasts and their Extracellular Matrix Revealed by a Serum Free Culture System. *PLoS One.* 10; 6:e0127675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127675>.
- Currie, P.D., Ingham, P.W., 2001. Introduction and Patterning of Embryonic Skeletal Muscle Cells in the Zebrafish. In: Johnston, I. A. *Muscle development and growth*. Academic Press, 2001. p. 1–14.
- Dal-Pai-Silva, M., Zanella, B.T.T., Duran, B.O.S., Almeida, F.L.A., Mareco, E.A., Paula, T.G., 2019. Cellular and molecular features of skeletal muscle growth and plasticity In: Baldisseroto, Urbinati e Cyrino. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press, pp. 165.
- 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; 11:3371-80. <https://doi.org/10.1242/dev.122.11.3371>.
- Díaz, M., Vraskou, Y., Gutiérrez, J., Planas, J.V., 2009. Expression of rainbow trout glucose transporters GLUT1 and GLUT4 during in vitro muscle cell differentiation and regulation by insulin and IGF-I. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 296, R794–R800. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90673.2008>.
- Ding, R., Horie, M., Nagasaka, S., Ohsumi, S., Shimizu, K., Honda, H., Nagamori, E., Fujita, H., Kawamoto, T., 2020. Effect of cell-extracellular matrix interaction on myogenic characteristics and artificial skeletal muscle tissue. *J Biosci Bioeng.* 130; 1:98-105. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.02.008>.
- Duran, B.O.S., 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* 10; 11:e0141967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141967>.
- Duran, B.O.S., Góes, G.A., Zanella, B.T.T., Freire, P.P., Valente, J.S., Salomão, R.A.S., Fernandes, A., Mareco, E.A., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2019. Ascorbic acid stimulates the in vitro myoblast proliferation and migration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Sci Rep.* 9; 1:2229. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38536-4>.
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Freshney, R. I., 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. 732p, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Froehlich, J.M., Galt, N.J., Charging, M.J., Meyer, B.M., Biga, P.R., 2013a. In vitro indeterminate teleost myogenesis appears to be dependent on Pax3. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 49; 5:371-85. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9616-2>.
- Froehlich, J.M., Fowler, Z.G., Galt, N.J., Smith, D.L., Biga, P.R., 2013b. Sarcopenia and piscines: the case for indeterminate-growing fish as unique genetic model organisms in aging and longevity research. *Front Genet.* 4; 159. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00159>.
- Fuentes, E.N., Valdés, J.A., Molina, A., Björnsson, B.T., 2013. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone--insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol.* 192; 136-48. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.009>.
- Gabillard, J.C., Sabin, N., Paboeuf, G., 2010. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell Tissue Res* 342, 471–477. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1071-8>
- Garcia de la serrana, D., Johnston, I. A., 2013. Expression of Heat Shock Protein (Hsp90) Paralogues Is Regulated by Amino Acids in Skeletal Muscle of Atlantic Salmon. *PLoS One* 8, <https://doi.org/e74295.10.1371/journal.pone.0074295>.
- Glass, D.J., 2010. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13, 225–229. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833862df>
- Goswami, M., Yashwanth, B.S., Trudeau, V., Lakra, W.S., 2022. Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. *Mol Biol Rep.* 49(3):2393-2411. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06997-4>.

Hue, I., Capilla, E., Rosell-Moll, E., Balbuena-Pecino, S., Goffette, V., Gabillard, J.C., Navarro, I., 2023. Recent advances in the crosstalk between adipose, muscle and bone tissues in fish. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14; 1155202. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1155202>.

IBGE, 2022. Produção da Aquicultura. Pesquisa da Pecuária Municipal. URL <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940#resultado> (acesso em 07.07.2023).

Jiang, H., Bian, F., Zhou, H., Wang, X., Wang, K., Mai, K., He, G., 2017. Nutrient sensing and metabolic changes after methionine deprivation in primary muscle cells of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J Nutr Biochem.*; 50:74-82. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.08.015>.

Johnston, I.A., Davison, W., Goldspink, G., 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol. B: Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 114, 203–216 <https://doi.org/10.1007/BF00688970>.

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; 1617-28. <https://doi.org/10.1242/jeb.038620>.

Keenan, S.R., Currie, P.D., 2019. The Developmental Phases of Zebrafish Myogenesis. *J Dev Biol.* 7, 2:12. <https://doi.org/10.3390/jdb7020012>.

Kim, J.H., Jin, P., Duan, R., Chen, E.H., 2015. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr Opin Genet Dev.* 32:162-70. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.006>.

Landemaine, A., Rescan, P.Y., Gabillard, J.C., 2014. Myomaker mediates fusion of fast myocytes in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 451; 4:480-4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.093>.

Lund, D.K., Cornelison, D.D., 2013. Enter the matrix: shape, signal and superhighway. *FEBS J.* 280; 17:4089-99. <https://doi.org/10.1111/febs.12171>.

Luo, Y., Jiao, J., Jin, A., Hussain, D., Chen, L., Qiao, F., Zhang, M., Du, Z., 2023. Metabolism of linoleic and linolenic acids in muscle cells of two freshwater fish with n-3 or n-6 fatty acid requirements. *Aquaculture*; 563, 738994. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738994>.

Macmillan learning. Acesso em 23 de julho de 2023. Disponível em https://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/hillis2e_ch33_4.html.

- McMullen, P.D., Pendse, S.N., Black, M.B., Mansouri, K., Haider, S., Andersen, M.E., Clewell, R.A., 2019. Addressing systematic inconsistencies between in vitro and in vivo transcriptomic mode of action signatures. *Toxicol. Vitro*. 58, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.014>.
- Montserrat, N., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2012. Metabolic Effects of Insulin and IGFs on Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Muscle Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 26; 3:55. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00055>.
- Otava, M., Shkedy, Z., Talloen, W., Verheyen, G.R., Kasim, A., 2015. Identification of in vitro and in vivo disconnects using transcriptomic data. *BMC Genomics* 16, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1726-7>
- Párrizas, M., Plisetskaya, E.M., Planas, J., Gutiérrez, J., 1995. Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen Comp Endocrinol*. 98; 1:16-25. <https://doi.org/10.1006/gcen.1995>.
- Romagnoli, C., Brandi M.L., 2021. Muscle Physiopathology in Parathyroid Hormone Disorders. *Front. Med*. 8:764346. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.764346>
- Saad, M.K., Yuen, J.S.K., Joyce, C.M. L., Li, X., Lim, T., Wolfson, T.L., Wu, J., Laird, J., Vissapragada, S., Calkins, O.P., Ali, A., Kaplan, D.L., 2023. Continuous fish muscle cell line with capacity for myogenic and adipogenic-like phenotypes. *Sci Rep* 13, 5098. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31822-2>.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity. In: *Muscle development and growth*. San Diego: Academic Press, pp. 187–250.
- Seilliez, I., Gabillard, J.-C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutierrez, J., Kaushik, S., Panserat, S., Tesseraud, S., 2008. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol*. 295, R329–R335. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00146.2008>.
- Shi, J., Bi, P., Pei, J., Li, H., Grishin, N.V., Bassel-Duby, R., Chen, E.H., Olson, E.N., 2017. Requirement of the fusogenic micropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114; 45:11950-11955. <https://doi.org/10.1016/10.1073/pnas.1715229114>.
- Stickney, H.L., Barresi, M.J.F., Devoto, S.H., 2000. Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn*. 219, 287 – 303. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A).

- Urbinati, E.C., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil*. UFSM - Santa Maria, pp. 225–255.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Jiménez-Amilburu, V., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2014. IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.05.024>.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Azizi, S., Montserrat, N., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2016. Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle physiology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*; 199:67-73. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.12.003>.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Azizi, S., Perelló, M., Salmerón, C., Riera-Codina, M., Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2017. Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture* 467; 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.004>.
- Volkoff, H., Esatevan Sabioni, R., Coutinho, L.L., Cyrino, J.E.P., 2017. Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Tissue distribution and effects of food quantity and quality on gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 203, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.022>.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55; 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb01042.x>.
- Watabe, S., 2001. Myogenic Regulatory factors. In: Johnston, I.A. *Muscle development and growth*. Academic Press, pp. 19–36.
- Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int Rev Cytol.* 243; 215-85. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43004-1).
- Zanella, B.T.T., Magiore, I.C., Duran, B.O.S., Pereira, G.G., Vicente, I.S.T., Carvalho, P.L.P.F., Salomão, R.A.S., Mareco, E.A., Carvalho, R.F., Paula, T.G.d., Barros, M.M., Dal-Pai-Silva, M., 2021. Ascorbic Acid Supplementation Improves Skeletal Muscle Growth in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Juveniles: In Vivo and In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2995. <https://doi.org/10.3390/ijms22062995>.

Zhi, S., Wang, J., Wang, Y., Yang, L., Qin, C., Yan, X., Zhao, M., Liu, M., Qu, L., Nie, G., 2023. Establishment and characterization of Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematopterus*) muscle cell line and its application to fish virology and immunology. *Fish Shellfish Immunol.*;139:108859. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108859>.

6. Conclusões gerais

Neste trabalho, caracterizamos molecularmente células musculares *in vitro* de pacu e destacamos as principais discrepâncias desse modelo experimental em relação ao tecido *in vivo*. Além disso, aplicamos esse modelo na avaliação do mecanismo de ação dos fatores pró-crescimento Igfl e aminoácidos.

Quanto ao capítulo I, observamos que as principais diferenças moleculares entre os modelos *in vitro* e *in vivo* foram relacionadas à proliferação e diferenciação celular, estabelecimento de matriz extracelular e comunicação célula-célula, sendo estes processos mais enriquecidos no modelo *in vitro*, e processos de obtenção de energia, sendo que no modelo *in vivo* esses processos foram mais diversos. Ainda, foi possível identificar possíveis processos de comunicação entre o músculo esquelético e outros tecidos que podem ser afetados molecularmente a partir do isolamento e cultivo das células musculares de pacu em cultura. Nossos dados permitem delinear estratégias que possam garantir o sucesso do modelo *in vitro* e aproximá-lo do modelo *in vivo*, além de elucidar e caracterizar o perfil molecular do músculo esquelético de peixes tanto especificamente da célula muscular como do tecido muscular como um todo, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novos artifícios para maximizar a produção na aquicultura de forma sustentável.

Quanto ao capítulo II, observamos que os aminoácidos tiveram um efeito direto e terminal no crescimento muscular, estimulando processos de proliferação e diferenciação das células musculares, enquanto o tratamento com Igfl teve um efeito inicial e indireto, estimulando a síntese de proteínas e componentes de sua própria via de sinalização. Ainda, identificamos genes chaves modulados por esses fatores pró-crescimento que podem ser utilizados futuramente como possíveis marcadores moleculares da modulação do crescimento muscular por fatores específicos.

Em conjunto, os achados obtidos reforçam a importância da cultura de células *in vitro* como ferramenta para o estudo do músculo esquelético de peixes, destacando as possíveis limitações e vieses do modelo. Ademais, nossos dados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para melhor manutenção de células musculares de peixes, o que pode ser aplicado na produção de carne desses animais em ambiente *in vitro* e na melhoria e maximização dos processos e produção em aquicultura

7. Apêndice – atividades complementares

7.1. Artigos publicados

Mareco EA, de la Serrana DG, de Paula TG, **Zanella BTT**, da Silva Duran BO, Salomão RAS, de Almeida Fantinatti BE, de Oliveira VHG, Dos Santos VB, Carvalho RF, Dal-Pai-Silva M. Transcriptomic insight into the hybridization mechanism of the Tambacu, a hybrid from *Colossoma macropomum* (Tambaqui) and *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2023; 45:101041. doi: 10.1016/j.cbd.2022.101041.

de Paula TG, **Zanella BTT**, de Moraes LN, Valente JS, Nascimento-Oliveira JI, Mareco EA, Fernandez GJ, Dal-Pai-Silva M. Degree of piRNA sharing and Piwi gene expression in the skeletal muscle of *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Colossoma macropomum* (tambaqui), and the hybrid tambacu. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2022; 264:111120. doi: 10.1016/j.cbpa.2021.111120.

Duran BOS*, **Zanella BTT***, Perez ES, Mareco EA, Blasco J, Dal-Pai-Silva M, Garcia de la Serrana D. Amino Acids and IGF1 Regulation of Fish Muscle Growth Revealed by Transcriptome and microRNAome Integrative Analyses of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Myotubes. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(3):1180. doi: 10.3390/ijms23031180. *mesmo nível de contribuição.

Perez ÉS, Cury SS, **Zanella BTT**, Carvalho RF, Duran BOS, Dal-Pai-Silva M. Identification of Novel Genes Associated with Fish Skeletal Muscle Adaptation during Fasting and Refeeding Based on a Meta-Analysis. *Genes (Basel)*. 2022; 13(12):2378. doi: 10.3390/genes13122378.

Zanella BTT, Magiore IC, Duran BOS, Pereira GG, Vicente IST, Carvalho PLPF, Salomão RAS, Mareco EA, Carvalho RF, Paula TG, Barros MM, Dal-Pai-Silva M. Ascorbic Acid Supplementation Improves Skeletal Muscle Growth in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Juveniles: In Vivo and In Vitro Studies. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(6):2995. doi: 10.3390/ijms22062995.

Fantinatti BEA, Perez ES, **Zanella BTT**, Valente JS, de Paula TG, Mareco EA, Carvalho RF, Piazza S, Denti MA, Dal-Pai-Silva M. Integrative microRNAome analysis of skeletal muscle of *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Piaractus mesopotamicus* (pacu), and the hybrid tambacu, based on next-generation sequencing data. *BMC Genomics*. 2021; 22(1):237. doi: 10.1186/s12864-021-07513-5.

Valente JS, Perez ÉS, **Zanella BTT**, Gutierrez de Paula T, Alcantara Dos Santos SA, Duran BOS, Carvalho RF, Justulin LA, de Almeida Fantinatti BE, Dal-Pai-Silva M. Maternal protein restriction changes structural and metabolic gene expression in the skeletal muscle of aging offspring rats. *Histol Histopathol.* 2021; 36(8):853-867. doi: 10.14670/HH-18-337.

Duran BOS, Garcia de la Serrana D, **Zanella BTT**, Perez ES, Mareco EA, Santos VB, Carvalho RF, Dal-Pai-Silva M. An insight on the impact of teleost whole genome duplication on the regulation of the molecular networks controlling skeletal muscle growth. *PLoS One.* 2021;16(7):e0255006. doi: 10.1371/journal.pone.0255006

Perez ES, Duran BOS, **Zanella BTT**, Dal-Pai-Silva M., 2023. Understanding fish muscle biology in indeterminate growth species: pacu (*Piaractus mesopotamicus*), as a model. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*; 285:111502. doi: 10.1016/j.cbpa.2023.111502.

7.2. Artigos submetidos – em revisão

Valente JS, Colombelli K, Pereira LL, Perez ES, **Zanella BTT**, Delgado A, Bosqueiro JR, Padovani CR, Vechetti IV, Damasceno DC, Justulin LA, Dal-Pai-Silva M. Aerobic exercise attenuates changes in skeletal muscle glycolysis metabolism and glycogen content in offspring rats submitted to a maternal low protein diet – submetido para a revista Life Sciences.

7.3. Formação complementar

2021 - Docência no ensino superior: fundamentos e práticas pedagógicas. - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

2020 - Speaking to inform: Discussing complex ideas with clear explanations. - University of Washington.

2020 - Data Science Toolbox. - Johns Hopkins University.

2020 - Preparo e Padronização de Soluções Químicas. - Instituto de Biociências de Botucatu.

7.4. Participação em projetos de extensão

2022 - Descomplicando: da célula ao organismo animal

2022 – Cursinho pré-vestibular Athena

7.5. Atividades didáticas

2021 – 2022 Estágio docência realizado na disciplina de Histologia Básica e Comparada do Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Integral.

2022 – Aula ministrada para o curso de graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré: Extração de DNA e RNA, PCR, Eletroforese, Sequenciamento e Bioinformática.

2020 – Aula ministrada para o Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada: Cultura Celular de Mioblastos de Peixes.

7.6. Participação em comissões avaliadoras

2021 - Avaliação de trabalhos na modalidade Ciências Biológicas no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

2020 - Participação em banca de Victor Hugo Garcia de Oliveira. Caracterização do transcriptoma do músculo estriado esquelético de juvenis e adultos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Oeste Paulista.

2020 - Participação em banca de Pollyana Coelho dos Santos, Identificação de genes parálogos no transcriptoma do músculo estriado esquelético de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Oeste Paulista.

7.7. Coorientação de alunos

2018 – 2020 Isabele Cristina Magiore - Iniciação científica

2019 – 2022 Guilherme Gutierrez Pereira - Iniciação científica

2021 – atual Mirely Francine dos Santos Barbosa - Iniciação científica

2022 – 2023 Ana Carolina Souza Fria - Iniciação científica

2022 Thaynara Lima Cassineli - PIBIC EM

2021 Gustavo Ferreira da Silva - Capacitação em aquisição de competências específicas

2022 Victor Seiji Oyamada Capacitação em aquisição de competências específicas

7.8. Apresentação de trabalhos e participação em eventos científicos

2022 Gutierrez, G.P.; Pai-Silva, M.D.; Barbosa, M.F.S.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Identificação de genes associados ao crescimento do músculo esquelético de peixes a partir de meta-análise. Apresentação de Trabalho/Congresso – XXXIV CIC Unesp.

2022 Barbosa, M.F.S.; Pai-Silva, M.D.; Gutierrez, G.P.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Associação dos genes ribossomais com o crescimento e manutenção do músculo esquelético de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Apresentação de Trabalho/Congresso – XXXIV CIC Unesp.

2022 Perez, E.S.; **Zanella, B.T.T.**; Fantinatti, B.E.A.; Nóbrega, R.H., Duran, B.O.S.; Pai-Silva, M.D. Determinate and indeterminate muscle growth of fish: a transcriptomic approach. Apresentação de Trabalho/Congresso - XX Workshop de Genética.

2022 Brachmann, J.E.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S.; Serrana, D.G.; Dal-Pai-Silva, M.; Duran, B.O.S. Caracterização do transcriptoma e microRNAoma de células musculares do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com aminoácidos e IGF1. Apresentação de Trabalho/Congresso – 19º Conpeex.

2021 **Zanella, B.T.T.**; Duran, B.O.S.; Perez, E.S.; Mareco, E.A.; Dal-Pai-Silva, M. Transcriptional profile of fish isolated muscle cells treated with amino acids and Igfl. Apresentação de Trabalho/Congresso - XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology.

2021 Perez, E.S.; Cury, S.S.; Duran, B.O.S.; **Zanella, B.T.T.**; Carvalho, R.F.; Dal-Pai-Silva, M. Meta-analysis of microarray data identifies a ribosomal protein as a possible biomarker related to fish muscle growth. Apresentação de Trabalho/Congresso - XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology.

2021 **Zanella, B.T.T.**; Duran, B.O.S.; Perez, E.S.; Mareco, E.A.; Dal-Pai-Silva, M. Amino acids are more efficient than IGF1 in stimulating pathways of development and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) muscle cells. Apresentação de Trabalho/Congresso - 9º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes.

2021 Perez, E.S.; **Zanella, B.T.T.**; Cury, S.S.; Fantinatti, B.E.A; Carvalho, R.F.; Duran, B.O.S.; Dal-Pai-Silva, M. Potenciais biomarcadores de crescimento muscular em peixes de crescimento determinado e indeterminado. Apresentação de Trabalho/Congresso - XXXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.

2021 **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S.; Duran, B.O.S.; Dal-Pai-Silva, M. Perfil transcricional de células musculares isoladas: caracterização em relação ao modelo in vivo. Apresentação de

Trabalho/Congresso - XXXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.

2021 Barbosa, M.F.S.; Pai-Silva, M.D.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Metabolismo glicolítico como preferência de células musculares em modelos in vitro. Apresentação de Trabalho/Congresso - XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

2021 Gutierrez, G.P.; Pai-Silva, M.D.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Meta-análise como ferramenta para identificação de alvos moleculares no músculo esquelético de peixes. Apresentação de Trabalho/Congresso - XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

2022 Participação como ouvinte no 2º Simpósio Brasileiro de Biologia Muscular.

2022 Participação como expositora no XIV Venha Conhecer o IB. Expositora do Projeto de extensão: Descomplicando da Célula ao Organismo Animal.

2021 Participação como ouvinte no 1º Simpósio Brasileiro de Biologia Muscular.

2021 Participação como ouvinte no ACS on Campus - Sao Paulo State University (UNESP).

2021 Participação como ouvinte no Fórum de avaliação do ensino remoto no IBB.

2021 Participação como ouvinte no I Encontro de Extensão Universitária no IBB.

2020 Participação como ouvinte no evento Metodologias ativas em tempo de ensino remoto.