



Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Curso de Graduação em Ciências Biológicas



Caroline Bredariol de Oliveira

**Influência do jejum seguido de realimentação
na expressão de genes do anabolismo e
catabolismo no músculo branco do pacu
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Botucatu
2016

Caroline Bredariol de Oliveira

**Influência do jejum seguido de realimentação
na expressão de genes do anabolismo e
catabolismo no músculo branco do pacu
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Trabalho de Conclusão do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
UNESP, Botucatu, SP.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maeli Dal Pai

Co-orientador: Tassiana Gutierrez de Paula

Botucatu
2016

Sumário

1. Resumo
2. Introdução 1
 2.1 Características do *Piaractus mesopotamicus* 4
3. Objetivo 5
4. Metodologia 6
 4.1 Análise estatística dos Dados 8
5. Resultados e Discussão 9
6. Conclusão 13
7. Referências 14

1. Resumo

A maior parte da massa corporal dos peixes é composta pelo músculo esquelético, sendo que o crescimento pode ocorrer por dois mecanismos: a hipertrofia e/ou hiperplasia de fibras, processos que podem ser influenciados por vários fatores como o estado nutricional. O crescimento, desenvolvimento e o fenótipo muscular ocorrem pelo balanço entre a ativação e/ou inibição de vias de sinalização que são responsáveis por controlar as atividades do anabolismo e catabolismo do tecido muscular. Sendo assim, estudos que buscam esclarecer o envolvimento dessas vias de sinalização, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o controle da massa muscular são necessários para melhor entendimento dessas vias no controle do crescimento muscular, tanto em condições de homeostase, quanto em situações de restrição alimentar seguida de realimentação. O objetivo desse trabalho foi avaliar na musculatura branca de juvenis de pacu (150g) submetidos a curto período de jejum (10 dias, Grupo J) seguido de realimentação (60 horas, Grupo R), a expressão de genes envolvidos com o anabolismo e catabolismo muscular. Em cada período, amostras do músculo branco foram retiradas (n=10) e congeladas em nitrogênio líquido para as análises de expressão gênica (Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR)). Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas após testes de normalidade e homocedasticidade. O período de jejum promoveu aumento na expressão dos genes do complexo *mTORC1* (*mTOR*, *RAPTOR* e *mTOR*) e o *IGF-1* não apresentou diferença estatística. O gene envolvido na via no catabolismo muscular, *FBXO25*, apresentou aumento durante o jejum. No período de realimentação não houve diferença estatística na expressão dos genes estudados quando em comparação ao controle. Nossos dados mostraram que 10 dias de jejum promoveu aumento na expressão de genes envolvidos com o catabolismo e anabolismo muscular, no músculo branco do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com a normalização na expressão após 60 horas de realimentação. O aumento do anabolismo muscular durante o jejum pode ter influenciado a taxa de síntese proteica como um mecanismo para a manutenção da demanda metabólica e do fenótipo muscular.

2. Introdução

A maior parte da massa corpórea dos peixes é representada pelo músculo estriado esquelético, sendo que este constitui de 40 a 75% do peso total do animal (Bone, 1978). O tecido muscular encontra-se distribuído em três compartimentos (branco, intermediário e vermelho), que possuem diferentes características metabólicas (Driedzic & Hochachka, 1976; Sängner & Stoiber, 2001).

O compartimento branco é constituído por fibras musculares brancas, de contração rápida, com metabolismo glicolítico, possuem grandes diâmetros (50-100 µm), baixo suprimento sanguíneo, baixa concentração de mioglobina, com poucas mitocôndrias e gotículas de lipídio (Driedzic & Hochachka, 1976; Sängner & Stoiber, 2001). É o tipo de musculatura recrutado em movimentos bruscos de natação, como a captura de alimento e fuga de predadores (Johnston et al., 1977). O compartimento vermelho é formado por fibras musculares vermelhas que apresentam contração lenta, metabolismo oxidativo, pequeno diâmetro (25-45 µm), grande concentração de mioglobina, muitas mitocôndrias, lipídios e alto suprimento sanguíneo. Essa musculatura é utilizada durante a realização de movimentos lentos e de sustentação, como a migração (Johnston et al., 1977; Sängner & Stoiber, 2001). Entre esses dois compartimentos, encontra-se o compartimento intermediário, que possui características intermediárias, com fibras de contração rápida e metabolismo oxidativo/glicolítico (Johnston et al., 1977; Sängner & Stoiber, 2001).

A miogênese embrionária tem seu início a partir de mioblastos localizados nos somitos. Os mioblastos proliferam e fundem-se uns aos outros, formando miotubos multinucleados que irão se diferenciar em fibras musculares (Devoto et al., 1996). Durante esse processo, alguns mioblastos não se fundem, permanecendo como células indiferenciadas no tecido muscular. Essas células indiferenciadas são conhecidas como mioblastos adultos, precursores miogênicos ou células satélites, localizando-se na periferia das fibras musculares. (Mauro, 1961; Campion, 1984). Essas células expressam marcadores específicos, como o *Pax-7* (paired box), que através de sua expressão, determina o estado quiescente das mesmas, mantendo a população celular que fornecerá núcleos durante o processo de crescimento muscular (Hawke & Garry, 2001).

Para que ocorra o crescimento muscular pós-embriológico em peixes, é necessária a ativação, proliferação e diferenciação das células satélites, que são responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans & Akster, 1995). Durante a hiperplasia, ocorre a fusão entre as células satélites ativadas, resultando na formação de novos miotubos na superfície das fibras já existentes, que irão se diferenciar em novas fibras musculares. Já, no processo de crescimento por hipertrofia, as células satélites ativadas fundem-se com fibras musculares já existentes, aumentando desse modo o número de núcleos para que ocorra maior síntese de miofibrilas, o que leva a um aumento na área da fibra muscular (Koumans & Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowleron & Veggetti, 2001). A hipertrofia e a hiperplasia têm contribuições variáveis para o crescimento muscular, podendo depender da espécie, fase de crescimento e do estado nutricional do animal (Dal Pai et al., 2000; Almeida et al., 2008, 2010, Bonaldo e Sandri, 2013).

A ativação ou inibição dos componentes das várias vias de sinalização são necessárias durante os processos de desenvolvimento, crescimento e manutenção do fenótipo muscular, entre as quais, destacam-se as vias anabólicas (síntese) e catabólicas (degradação) (Medeiros et al., 2009, Kirby e McCarthy, 2013). Entre as moléculas que podem ser ativadas ou inibidas, está o fator de crescimento *IGF-1* (*insulin-like growth factor*), que é descrito como um potente controlador do equilíbrio entre as vias do catabolismo e anabolismo muscular (Seilliez et al., 2008a,b; Rahimi et al., 2010, Bower et al., 2013; Fuentes et al., 2013).

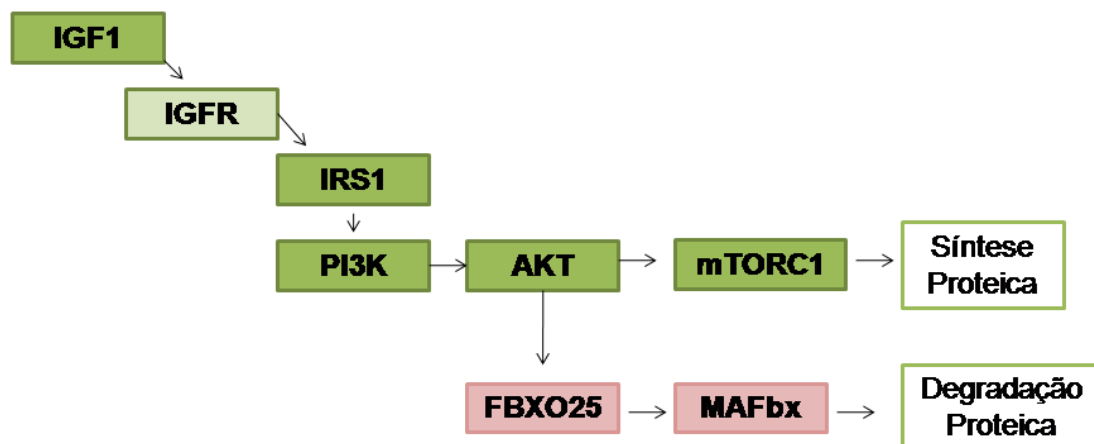
A via do *IGF-1* tem sido descrita como uma das principais envolvidas no crescimento muscular (Schiaffino et al., 2013). A ativação do *IGF-1* leva a estimulação da síntese proteica pela ativação de *PI3K* (*phosphatidylinositol-3 kinase*), que ativa a *AKT* (*serine-threonine kinase*). Quando ativa, essa quinase leva a fosforilação do complexo *mTORC1* (*mammalian target of rapamycin*), constituído pelas subunidades (*mTOR*, *mLST8* e *RAPTOR*), que atua estimulando a síntese proteica através da ativação da proteína p70S6K (Figura 1) (Schiaffino et al., 2013).

Condições como a falta de exercício, envelhecimento, diabetes, estresse e hormônios podem diminuir os níveis de *IGF-1* resultando numa queda da síntese proteica que pode comprometer o crescimento muscular (Bower e Johnston, 2010;

Bower et al., 2010; Johnston et al., 2011; Fuentes et al., 2013; Schiaffino et al., 2013). Os baixos níveis de *IGF-1* levam a inativação da via *AKT* e a desfosforilação do *FOXO* (*fator transcricional da família Forkhead Box O*) que está envolvido com o catabolismo celular (Eijkelenboom e Burgering, 2013). Quando desfosforilado, o *FOXO* é translocado para o núcleo, regulando a transcrição de fatores atrogênicos, como o *MuRF* (*Muscle RING Fingerprotein*), *MAFbx* (*MuscleAtrophyF-box* ou *atrogina-1*) desencadeando a degradação protéica e o *FBXO25* (*F-box Protein 25*) (Figura 1) (Bower, et al., 2010, Eijkelenboom e Burgering, 2013).

Fatores ambientais como jejum também pode afetar a homeostase dos peixes, promovendo a desregulação entre o anabolismo e o catabolismo muscular (Bower, et al., 2010, Johnston et al., 2011). Em peixes, períodos de jejum são comuns no ambiente natural e até em sistemas de criação fechado, podendo ocorrer quando há a superpopulação de animais no tanque e em períodos de migração em ambientes naturais (Zamal e Ollevier, 1995; Castranova et al., 2011; Gallo e Jeffery, 2012; Bower, et al., 2010). Com a restrição alimentar, os níveis de *IGF* diminuem, resultando na inativação da via *AKT* e ativação da via *FOXO*, ou seja, ocorre queda da síntese protéica e ativação da degradação das proteínas musculares. Quando restabelecidas as condições favoráveis à espécie, a homeostase e o crescimento muscular são retomados (Johnston et al., 2011, Fuentes et al., 2013, Bower et al., 2013).

Para investigar o envolvimento da via do *IGF* no controle da massa muscular durante a transição do catabolismo para o anabolismo celular, protocolos de jejum e realimentação têm sido utilizados (Bower e Johnston, 2010, 2012; Cleveland & Weber, 2013). Os resultados demonstram que períodos de jejum seguidos de realimentação podem levar a retomada do crescimento muscular, dependendo do estágio nutricional do peixe, duração do jejum, fase de desenvolvimento e espécie estudada (Johnston et al., 2011).



Adaptado: Bonaldo & Sandri, 2013

Figura 1: Vias de sinalização envolvidas com os processos de anabolismo e catabolismo muscular. A partir de um estímulo (intrínseco ou extrínseco), a liberação de *IGF-1* é induzida e este se liga ao receptor *IGFR* na superfície celular, ativando eventos através da via *IRS1 – PI3K – AKT – mTORC1*, aumentando a síntese protéica. Com a inativação da via *AKT*, ocorre a desfosforilação do *FBXO25* regulando o fator atrogênico *MAFbx*, levando a degradação protéica.

2.1 Características do *Piaractus mesopotamicus*

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe neotropical com excelentes características zootécnicas como rusticidade, fecundidade elevada, rápido crescimento, ótima adaptação à alimentação artificial em situações de baixa disponibilidade de alimento. Sendo assim, estudos que buscam esclarecer as vias de sinalização e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o controle da massa muscular são necessários visando melhor entender a real contribuição dessas vias no crescimento muscular em condições de quebra de homeostase entre anabolismo e catabolismo como em situações de restrição alimentar seguida de realimentação.

3. Objetivo

O objetivo desse trabalho foi investigar a expressão dos genes envolvidos com o anabolismo (*IGF-1* e complexo *mTORC1* (*mTOR*, *mLST8* e *RAPTOR*) e catabolismo (*MAFbx* e *FBXO25*) na musculatura branca de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a um curto período de jejum seguido de realimentação.

4. Metodologia

Os peixes foram cultivados no Pólo Regional da Alta Sorocabana, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), com sede em Presidente Prudente (SP). Juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com aproximadamente 150g, foram distribuídos em caixas d'água (0,5m³) em sistemas de recirculação distintos. O oxigênio dissolvido da água foi monitorado diariamente e os parâmetros amônia, nitrito e nitrato, semanalmente. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia, até a saciedade, com ração comercial apropriada para a fase de desenvolvimento destes, durante sete dias para adaptação dos animais ao delineamento experimental. Após esse período, os animais foram submetidos a um período de jejum de 10 dias, seguido de um período de realimentação de 60 horas.

Após o período experimental, os animais (n=10) nos períodos iniciais (Grupo Controle), após 10 dias de jejum (Grupo J) e após 60 horas de realimentação (Grupo R) foram anestesiados com benzocaína (100-200mg/L de água) e eutanasiados.

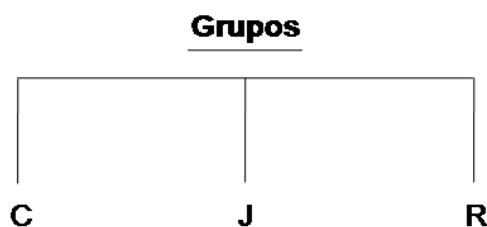


Figura 2: Grupos utilizados na análise da expressão gênica: C (controle): antes do jejum; J (jejum): após 10 dias de jejum; R (realimentação): após 60 horas de realimentação.

As amostras musculares foram retiradas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento

Para avaliação dos genes foi extraído o RNA total das amostras com o reagente *TRIzol*® (Invitrogen Life Technologies, USA), conforme instruções do protocolo. Para a quantificação do RNA foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue*TM

Plus (GE Healthcare, USA) pelo qual foi possível estimar a qualidade da extração pela medida da densidade óptica a 260 nm (quantidade de RNA) e 280 nm (quantidade de proteínas). A pureza do RNA foi garantida pela obtenção de uma razão 260/280 nm superior a 1,8. A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e pelo sistema 2100 *Bioanalyzer* (Agilent,USA) que utiliza plataforma baseada em micro fluídos para fornecer um número de integridade do RNA (RIN). Amostras com RIN superior a 7.0 foram consideradas íntegras. O RNA total extraído das amostras musculares foi submetido ao tratamento com o kit *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies, USA) para eliminar qualquer possível resíduo de DNA genômico contaminante das amostras. Para a análise da expressão dos mRNAs dos genes selecionados foi realizada a transcrição reversa do RNA extraído pelo *High Capacity cDNA archive kit* (Applied Biosystems,USA), seguindo as orientações do fabricante.

Os níveis de expressão dos mRNAs dos genes escolhidos foram detectados por RT-qPCR, através da plataforma *ABI 7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, USA). O DNA complementar (cDNA) dos genes escolhidos foram amplificados utilizando-se o *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, USA) e primers sintetizados pela Life Technologies (USA) que foram desenhados através do software *Primer Express 3.0 ®* (Applied Biosystems, USA). Quantificação relativa da expressão foi realizada pelo método do CT comparativo (Livak & Schmittgen, 2001). A expressão do mRNAs dos genes selecionados foi normalizada pela expressão do gene de referência da β -actina.

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados na amplificação dos genes analisados.
F: forward, R: reverse.

Gene	Sequência dos primers
<i>mTOR</i>	F: TTGGGAGAGACGTACTGC R: CACAGGACTGGTGTAGGAA
<i>GAPDH</i>	F: ACACACGACGACAAGACCAA R: GTCCCTCTCGCTGAAAAGT
<i>RAPTOR</i>	F: TGTTCACGACTGCTCCAA R: GAGGGTGGTTCGGGTTTATT
<i>mLST8</i>	F: TCCCAAGACCAAAATTCCTG R: AAAGTTTGAGGTTGCCAGA
<i>IGF-1</i>	F: ATTCAGCAAGCCAACAGGT R: CGCACAATACATCTCAAGTCG
<i>FBXO25</i>	F: CGTAGGTGAAGTAGCCGCCA R: GGAGAAGTCCAGCCTGTTGA
<i>MAFbx</i>	F: TCTTTGGTGCTCCCCTTGTG R: TAAAACCGAGGACGGCTGG

4.1 Análise estatística dos Dados

Foi utilizado Kolmogorov-Smirnov como teste estatístico de normalidade e para comparação entre os períodos analisados, o teste de Mann-Whitney. Para todos os testes, o intervalo de confiança adotado foi de 95%.

5. Resultados e Discussão

Observamos que o período de jejum e realimentação estudados promoveu alteração na expressão dos genes envolvidos com o anabolismo e catabolismo muscular. Dez dias de jejum, no pacu, promoveu o aumento na expressão dos genes *mLTS8*, *RAPTOR* e *mTOR*, componentes do complexo da *mTORC1*, envolvido com o anabolismo, na musculatura branca, (Figura 3). Embora a expressão do gene *IGF-1* não apresentou diferença estatística dentre os períodos observados, também houve uma tendência no aumento durante o período de jejum e queda no período de realimentação (Figura 4). O período de jejum promoveu aumento na expressão dos genes *FBXO25* e *MAFbx*, envolvidos com a via do catabolismo (Figura 5). Após 60 horas de realimentação, a expressão de todos os genes analisados foi semelhante ao grupo Controle (C).

Vários mecanismos regulam o catabolismo muscular, dentre os quais se destaca a via ubiquitina-proteossoma, a qual é considerada uma das principais responsáveis pela degradação protéica que ocorre no músculo. Essa via é ativada a partir da regulação da transcrição de genes E3 ubiquitina-ligases (*FBXO25* e *MAFbx*), que participam de processos de atrofia muscular. As E3 ubiquitina-ligases são enzimas importantes no processo de degradação protéica (enzimas-chave) ligando-se às proteínas alvo, sendo capazes de promover a ubiquitinação e a consequente degradação protéica (Bower & Johnston, 2010; Fuentes et al., 2012; Tacchi et al., 2010, 2012; Valente et al., 2012). Os níveis elevados de expressão de *FBXO25* sugerem o aumento da degradação protéica após 10 dias de jejum.

O *IGF* (*insulin-like growth factor*) é um fator de crescimento considerado potente controlador do equilíbrio entre as vias anabólicas e catabólicas através da ativação da via *PI3K*→*AKT*→*mTOR*→*FoxO*, sendo o *FOXO* responsável pela degradação protéica. Quando ligado ao receptor, o *IGF* promove a ativação da *PI3K* (*phosphatidylinositol-3 kinase*) que fosforila a *AKT* (*Serine-threonine kinase*), que quando ativa, fosforila o *mTOR* (*mammalian target of rapamycin*) possibilitando a fosforilação da p70S6K (p70s6 Kinase) dando início a síntese protéica (Seilliez et al., 2008a,b, Fuentes et al., 2012, 2013). Os picos de expressão de *IGF-1* durante o jejum e realimentação observados neste estudo corroboram com os dados encontrados por Mareco et al., 2015, também em alevinos de pacu, no qual ocorreu aumento da

expressão de *IGF-1* durante o jejum e queda na expressão no período de realimentação. Estudo com juvenis de salmão sob período de jejum (uma semana) seguido de realimentação demonstrou aumento no nível de expressão do gene *IGF-2*, também constituinte da via do anabolismo, e diminuição do mesmo após a realimentação. (Valente et al, 2012). Desta forma, acreditamos que o *IGF-1* foi o mediador do aumento dos demais componentes da via ativando a maquinaria da síntese protéica durante o período de jejum estudado. Possivelmente o comportamento da expressão dos genes do anabolismo (*mLTS8*, *RAPTOR* e *mTOR*) foi uma estratégia metabólica para a condição de privação de alimento e pode ser explicada com base em outros estudos, como por exemplo o de Yoshiwaza et al, 1995 no qual, segundo os autores, a tradução de mRNA aumenta durante a realimentação, como demonstrado em ratos submetidos a um período de jejum seguido de realimentação, aumentando assim, os níveis protéicos, ou seja, a atividade ribossomal. Sendo assim, os níveis de expressão de mRNA dos genes analisados (*mTOR* e seus componentes) na fase de realimentação podem ter diminuído devido a um aumento da tradução de mRNA desencadeada pela retomada da ingestão de aminoácidos através da alimentação e pela transcrição de mRNA iniciada durante o jejum. Isso pode vir a ocorrer devido a outro potente regulador para a ativação da via da autofagia, o *ULK1* (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*), que é controlado positivamente pela ativação de *AMPK* (*Protein Kinase, AMP-Activated*) em situações com restrição alimentar e negativamente regulado pela ativação do complexo *mTORC1* (Egan et al., 2011; Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009; Kim et al., 2011)., na presença de aminoácidos, oriundos do processo de degradação proteica (Zhang et al. 2014). Sendo assim, os níveis basais de expressão para os parálogos do gene *ULK1* (A e B) na musculatura branca na fase de jejum, possa estar envolvido com a ativação do complexo *mTORC1* durante esse período, como foi observado nesse estudo.

A restrição alimentar pode desencadear a desfosforilação do *FOXO* (*fator transcricional da família Fork head Box O*) que está envolvido com o catabolismo celular e que quando desfosforilado é translocado para o núcleo regulando fatores atrogênicos, tais como o *MAFbx* e a ubiquitina ligase *FBXO25* (Valente et al, 2012; Gomes et al, 2001). A atividade da via do *FOXO* que resulta na perda de massa muscular, pode ser modulada por interações com fatores transcricionais tal como o

PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha) que é um cofator essencial para a biogênese mitocondrial (Schiaffino, et al., 2013; Puigserver, 2003, Geng, et al., 2011). Desse modo, o aumento na expressão do gene do *FBXO25* durante o jejum seguido de queda na realimentação pode estar envolvido com a ativação da via do catabolismo durante a restrição alimentar, com queda após a realimentação. Em condições catabólicas, altos níveis dessa molécula, podem atuar inibindo a atrofia muscular, mantendo a massa muscular e estimulando a transcrição de *IGF*. Sendo assim, o aumento na expressão dos genes atrogênicos durante o jejum tenha induzido aumento na transcrição de *PGC1 α* , tendo em vista uma melhor adaptação dos animais para tentativa de manutenção dos processos metabólicos da massa muscular (Sandri, et al., 2006; Fuentes et al., 2013; Hoppeler, 2016)

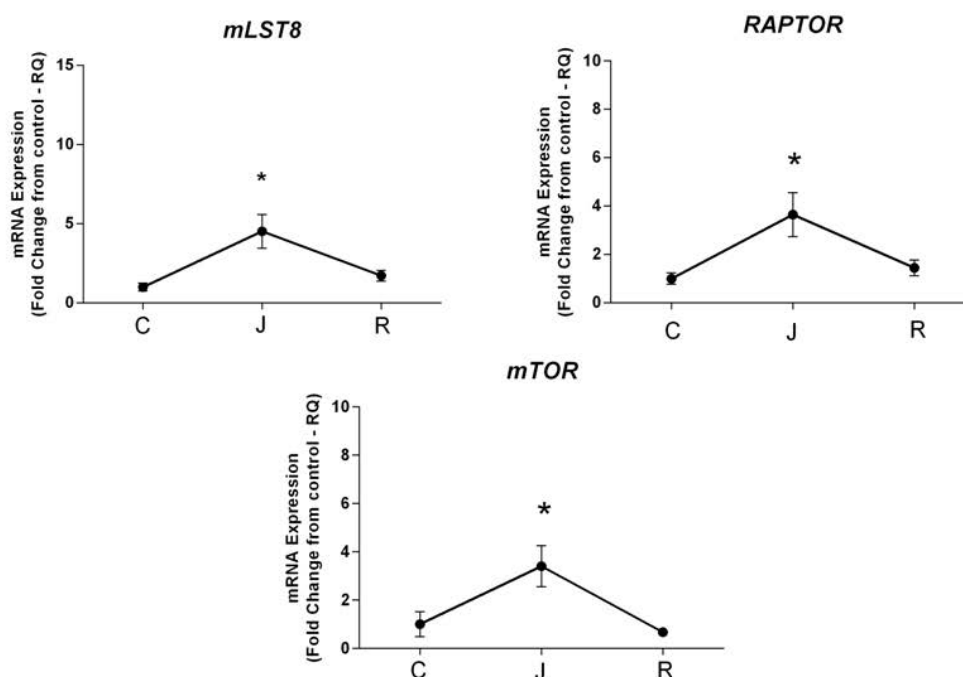


Figura 3: Expressão dos genes do complexo *mTORC1* (*mTOR*, *mLST8* e *RAPTOR*) envolvidos com o anabolismo muscular. C: Grupo Controle, J: Grupo Jejum e R: Grupo Realimentação.

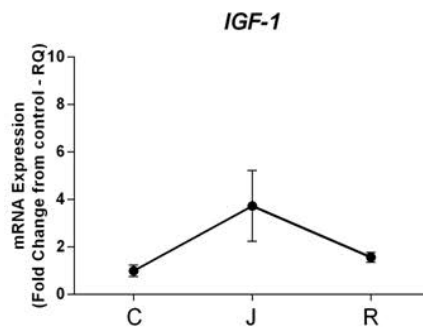


Figura 4: Expressão do gene *IGF-1* envolvido na via do anabolismo muscular. C: Grupo Controle, J: Grupo Jejum e R: Grupo Realimentação

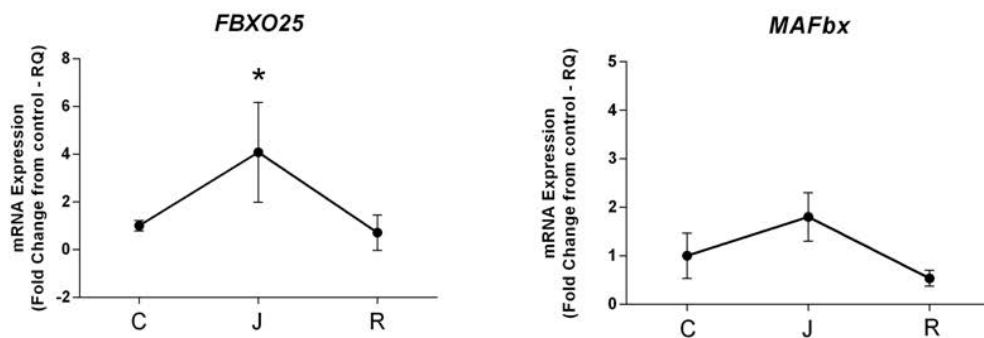


Figura 5: Expressão dos genes envolvidos na via do catabolismo muscular. C: Grupo Controle, J: Grupo Jejum e R: Grupo Realimentação.

6. Conclusão

Nossos dados mostraram que 10 dias de jejum promoveu aumento na expressão de genes envolvidos com o catabolismo e anabolismo muscular, no músculo branco do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com a normalização na expressão após 60 horas de realimentação. O aumento do anabolismo muscular durante o jejum pode ter influenciado a taxa de síntese proteica como um mecanismo para a manutenção da demanda metabólica e do fenótipo muscular.

Os dados obtidos também fornecem informações importantes para a melhor compreensão da interação dos componentes das vias de sinalização que controlam o balanço entre o anabolismo e o catabolismo na musculatura branca do pacu durante condições de jejum/realimentação.

7. Referências

Almeida, FLA, Carvalho, RF, Pinhal, D, Padovani, CR, Martins, C, Dal Pai-Silva, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron* 39, 1306-1311, 2008.

Almeida, FLA., Pessotti, NS, Pinhal, D, Padovani, CR, Leitão, NJ, Carvalho, RF, Martins, C, Portella, MC, Dal Pai-Silva, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron* 41, 997-1004, 2010.

Blackwell, T, Weintraub, H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104-1110, 1990.

Bonaldo, P e Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms* 6, 25-39, 2013.

Bone, Q. Locomotor muscle. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 361-424, 1978.

Bower, NI, Johnston, IA. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and Insulin-Like Growth factors during myogenesis in atlantic salmon. *PLoS ONE* 5, e11100, 2010.

Bower, N.B., Garcia de la serrana, D e Johnston, IA. Characterisation and differential regulation of MAFbx/Atrogin-1 a and b transcripts in skeletal muscle of Atlantic

salmon (*Salmo salar*). Biochemical and Biophysical Research Communications 396, 265–271, 2010.

Campion, DR. The muscle satellite cells. Int. Ver. Cytol. 87, 225-251, 1984.

Castranova, D, Lawton, A, Lawrence, C, Baumann, DP, Best, J, Coscolla, J, Doherty, A, Ramos, J, Hakkesteg, J, Wang, C, Wilson, C, Malley, J, Weinstein, BM. The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish (*Daniorerio*). Zebrafish. 8, 141-6, 2011.

Cleveland, BM, Weber, GM, 2013. Effects of triploidy on growth and protein degradation in skeletal muscle during recovery from feed deprivation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Biochem Physiol A Mol Integr. Physiol. 166, 1:128-37, 2013.

Dal Pai, V, Dal Pai-Silva, M, Carvalho, ED, Fujihara, CY, Gregório, EA, Curi, PR. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). Anat. Histol. Embriol. 29, 283- 289, 2000.

Devoto, SH, Melançon, E, Eisen, JS, Westerfield, M. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. Development 122, 3371-3380, 1996.

Driedzic, WR, Hochachka, PW. Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol. 230, 579-582, 1976.

Eijkelenboom, A, e Burgering, BMT. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14, 2:83-9, 2013

Egan, DF; Shackelford, DB; Mihaylova, MM; Gelino, S, Kohnz, RA; Mair, W. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. Science; 331:456–61, 2011.

Fuentes, NF, Safian, D, Einarsdottir, IE, Valdés, JA, Elorza, AA, Molina, A, Björnsson, BT. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK and TOR activation, and mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism and growth in skeletal muscle of the fine flounder. *General and Comparative Endocrinology* 186, 172–180, 2013.

Gallo, ND, Jeffery, WR, 2012. Evolution of space dependent growth in the Teleost *Astyanax mexicanus*. *PLoS One* 7(8):e41443, 2012.

Ganley, IG; Lam du, H; Wang, J; Ding, X; Chen, S; Jiang, X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*; 284:12297–305, 2009

Geng, T; Li, P; Yin, X; Yan, Z. PGC-1 α promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice. *Am. J. Pathol*; 178:1738–48, 2011.

Hawke, TJ, Garry, DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecularbiology. *J. Appl. Physiol.* 91, 534-551, 2001.

Hoppeler, H. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. *Journal of Experimental Biology* 219, 205-213 doi: 10.1242/jeb.128207, 2016

Hosokawa, N; Hara, T; Kaizuka, T; Kishi, C; Takamura, A; Miura, Y. Nutrient dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*;20:1981–91, 2009

Johansen, KA, Overturf, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* 7, 576-587, 2005.

Johnston, IA. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115, 1999.

Johnston, IA, Bower, NI e Macqueen, DJ. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*. v. 214, p. 1617-1628, 2011.

Johnston, IA, Davison, W, Goldspink, G. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol.* 114, 203-216, 1977.

Joulia, D, Bernardi, H, Garandel, V, Rabenoelina, F, Vernus, B, Cabello, G. Mechanism involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.* 286, 263-275, 2003.

Jung, CH; Jun, CB; Ro, SH; Kim, YM; Otto, NM; Cao, J. ULK–Atg13–FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*; 20:1992–2003, 2009

Kim, J; Kundu, M; Viollet, B; Guan, K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*; 13:132–41, 2011.

Kirby, TJ e McCarthy, JJ. MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radical Biology and Medicine* 64, 95– 105, 2013.

Kocabas, AM, Kucuktas, H, Dunham, RA, Liu, Z. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1575, 99-107, 2002.

Koumans, JTM, Akster, HA. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 3-20, 1995.

Lee, SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 61-86, 2004.

Mareco, EA; Garcia de la Serrana, D; Johnston, IA; Dal-Pai-Silva, M. Characterization of the transcriptome of fast and slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). BMC Genomics, 16:182, 2015.

Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J. Bioph. Biochem. Cytol. 9, 493-494, 1961.

McPherron, AC, Lawler, AM, Lee, SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. Nature 387, 83-90, 1997.

Medeiros, EF, Phelps, MP, Fuentes, FD, Bradley, TM. Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 297, 235 – 242, 2009

Megeney, LA, Rudnicki, MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. Biochem. Cell Biol. 73, 723-732, 1995.

Murre, C, Mccaw, PS, Vaessin, H, Caudy, M, Jan, LY, Yan, JN, Cabrera, CV, Buskin, JN, Hauschka, SD, Lassar, AB, Weintraub, H, Baltimore, D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell 58, 537-544, 1989

Patrino, M, Sivieri, S, Poltronieri, C, Sacchetto, R, Maccatrozzo, L, Martinello, T, Funkenstein, B, Radaelli, G. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). Cell Tissue Res. 331, 643-58, 2008.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. Nature; 423:550–5, 2003.

Rahimi, R, Farhangi, M, Amiri, BM, Rezai, F, Norouzitallab, P, Afzali, A. Compensatory growth assessment by plasma IGF-I hormone measurement and growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Afr. J. Biotechnol. 9, 3949–3954, 2010.

Ríos, R, Carneiro, I, Arce, VM, Devesa, J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 282, 993-999, 2002.

Rowlerson, A, Veggetti, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press, London, pp. 103-139, 2001.

Rudnicki, MA, Jaenish, R. The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. Bioessays 17, 203-209, 1995.

Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; 103:16260–5, 2006.

Sänger, AM, Stoiber, W. Muscle fiber diversity and plasticity In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press London, pp. 187-250, 2001.

Schiaffino S, Dyar Ka, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. FEBS J.; 280:4294–314, 2013.

Seilliez, I, Gabillard, JC, Skiba-Cassy, S, Garcia-Serrana, D, Gutierrez, J, Kaushik, S, Panserat, S, Tesseraud, S. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295, R329 –R335, 2008a.

Seilliez, I, Panserat, S, Skiba-Cassy, S, Fricot, A, Vachot, C, Kaushik, S, Tesseraud, S. Feeding status regulates the polyubiquitination step of the ubiquitin – proteasome

-dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. J. Nutr. 138, 487–491, 2008b.

Kaushik, S, Panserat, S, Tesseraud, S. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Am. J. Physiol. Regul.Integr. Comp. Physiol. 295, R329 –R335, 2008a.

Seilliez, I, Panserat, S, Skiba-Cassy, S, Fricot, A, Vachot, C, Kaushik, S, Tesseraud, S. Feeding status regulates the polyubiquitination step of the ubiquitin – proteasome -dependent proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. J. Nutr. 138, 487–491, 2008b.

Thomas, M, Langley, B, Berry, C, Sharma, M, Kirk, S, Bass, J, Kambadur, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J. Biol. Chem. 275, 40235-40243, 2000.

Valente, LM; Bower, NI; Johnston, IA. Postprandial expression of growth-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) juveniles fasted for 1 week and fed a single meal to satiation. British Journal of Nutrition 108, 2148–2157, 2012.

Xu, C, Wu, G, Zohar, Y, Du, SJ. Analysis of myostatin gene structure, expression and van Rooij, E., Liu, N., Olson, E.N., 2008. MicroRNAs flex their muscles. Trends Genet. 24, 159-166, 2003.

Ye, HQ, Chen, SL, Sha, ZX, Liu, Y. Molecular cloning and expression analysis of the myostatin gene in sea perch (*Lateolabrax japonicus*). Mar. Biotechnol. 9, 262-272, 2007.

Yoshizawa, F; Endo, M; Ide, H; Yagasaki, K; Funabiki, R. Translational regulation of protein synthesis in the liver and skeletal muscle of mice in response to refeeding. Nutritional Biochemistry 6:130-136, 1995.

Watabe, S. Myogenic regulatory factors In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. Academic Press London, pp. 19-41, 2001

Zamal, H; Ollevier, F. Effect of feeding and lack of food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile catfish. J. Fish Biol., London, v.46, p.404-414, 1995.

Zhang Y, Nicholatos J, Dreier JR, Ricoult SJH, Widenmaier SB, Hotamisligil GS, et al. Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. Nature Research, 513: 440–443, 2014.