



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

META-ANÁLISE INTEGRATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA
GLOBAL NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE PEIXES

ÉRIKA STEFANI PEREZ

MAELI DAL-PAI

BRUNO OLIVEIRA DA SILVA DURAN

ROBSON FRANCISCO DE CARVALHO

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

Maeli Dal-Pai

BOTUCATU – SP
2021

Érika S. Perez

Maeli Dal-Pai

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Perez, Érika Stefani.

Meta-análise integrativa da expressão gênica global no
músculo esquelético de peixes / Érika Stefani Perez. -
Botucatu, 2022

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

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Bruno Oliveira da Silva Duran

Coorientador: Robson Francisco de Carvalho

Capes: 20600003

1. Peixes. 2. Músculo esquelético - Crescimento.
3. Expressão gênica. 4. Metanálise.

Palavras-chave: Crescimento do músculo esquelético;
Meta-análise; Peixes.



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me dar força nos momentos mais difíceis e desafiadores.

Agradeço aos meus pais Alcides Aparecido Perez e Maria Salete Beraldo Perez pela família que construíram. Por dedicarem suas vidas para cuidar de mim, das minhas irmãs, Bruna e Isabela, e do meu sobrinho Rafael. Por se manterem fortes quando a vida nos apresentou obstáculos. Por acreditarem e confiarem em suas filhas para as quais deram todo apoio, atenção, educação, oportunidade e amor. Eu me orgulho tanto de vocês! Sempre os lembrarei e os amarei até o fim da minha vida.

Agradeço a minha querida orientadora, Maeli Dal Pai, por ter me incentivado a um novo desafio no mestrado. Agradeço por ter enxergado potencial em mim e por ter aberto as portas do seu laboratório em 2017. Sou grata pelo apoio emocional que me oferece, pelos ensinamentos, amizade e conselhos. Estarei sempre a sua disposição e espero um dia ser tão competente como uma senhora.

Agradeço aos meus co-orientadores Bruno Oliveira da Silva Duran e Robson Francisco Carvalho ensinamentos e conselhos científicos.

Agradeço aos colegas de laboratório Bruna Tereza Thomazini Zanella, Guilherme Gutierrez, Jéssica Silvino Valente e Mirelli Francine pela parceria.

Em especial, aos meus amigos Bruna Tereza Tomazini Zanella, Bruno Oliveira da Silva Duran e Sarah Santiloni Cury pela generosidade com que me acolheram, mesmo com as minhas inseguranças e pouca experiência. Por me incentivarem e ensinarem com tanta paciência. Obrigado pelo encorajamento e pelas palavras que mesmo à distância, funcionaram como um abraço. Contem comigo para o que precisarem!

Por fim, nestes tempos desafiadores para a pesquisa em nosso país, agradeço à CAPES pelo financiamento durante os dois anos de mestrado.

RESUMO

O crescimento muscular dos peixes, o qual desperta grande interesse do setor produtivo, é regulado por múltiplos genes que fazem deste, um complexo processo ainda pouco compreendido. Nesse contexto, a reanálise do perfil de mRNAs é uma estratégia significativa que permite a compreensão do crescimento desse tecido. Com base nisso, os objetivos deste estudo foram reanalisar, integrar e comparar o perfil de mRNAs do músculo esquelético de peixes, bem como encontrar possíveis genes alvos envolvidos com o crescimento e manutenção do fenótipo muscular. Foi realizada uma meta-análise utilizando palavras-chave no banco de dados *GEO Datasets* e *European Nucleotide Archive*. Os dados de *microarray* foram reanalisados e partir dos genes diferencialmente expressos (GDEs) de cada *dataset* foi realizada uma análise individual que identificou as vias mais comuns dos estudos ($p < 0.05$). Essas vias, presentes em pelo menos dois *datasets*, tiveram seus genes selecionados para a construção da rede de interação molecular. Com base nessa rede, foi obtida a importante relação entre ribossomos e ciclo celular em que alguns genes foram selecionados para investigação através de RT-qPCR: *rps27a*, *eef1a2*, *ccnd1*, *cdkn1a* e *pcna*, além da *mtor*. As investigações foram realizadas em pacus (*P. mesopotamicus*) de 12g submetidos ao jejum de 4 dias (J4d) e realimentação de 3 dias (R3d), e em pacus com 30g submetidos ao jejum de 15 dias (J15d) e realimentação de 6 horas (R6h) e 15 dias (R15d). O período mais curto de jejum (J4d) promoveu um aumento na expressão da *mtor*. A expressão de *rps27a*, *ccnd1*, *cdkn1a* e do *pcna* foi reduzida em R3d comparada ao J4d. No período mais prolongado de jejum e realimentação, a expressão da *mtor* foi reduzida em R15d em comparação à R6h, assim como do *pcna*. Considerando a expressão de *rps27a*, houve uma diminuição em R15d comparado ao grupo J15d, enquanto a expressão de *eef1a2* não se alterou. A expressão de *ccnd1* foi elevada em J15d e R6h em comparação aos grupos C e R15d. Alterações importantes também foram observadas na expressão da *cdkn1a* que manteve altos níveis no grupo Controle (C) e J15d e diminuição em R6h e R15d. Considerando a importante relação entre os ribossomos e o ciclo celular obtida pela meta-análise, a investigação desses genes selecionados demonstra estratégias adotadas pela musculatura que inclui a manutenção da capacidade traducional, sustentada pela biogênese dos ribossomos, a otimização da polimerização proteica e o reparo do tecido diante do estresse decorrente da falta de alimento. Além disso, considerando o ciclo-celular, a expressão de seus reguladores é modulada frente à redução e ao reestabelecimento das condições pró-proliferação, visando a sobrevivência celular durante o estresse nutricional. Dessa maneira, nosso estudo pode fornecer novos *insights* acerca da importância dos genes que regulam a tradução, transcrição e replicação, como marcadores associados à manutenção do fenótipo e função muscular, visando o crescimento dos peixes.

Palavras chave: meta-análise, peixes, crescimento do músculo esquelético.

ABSTRACT

The muscle growth of fish, which arouses great interest in the productive sector, is regulated by multiple genes that make this a complex process that is still poorly understood. In this context, the reanalysis of the mRNAs profile is a significant strategy that allows the understanding of the growth of this tissue. Based on this, the objectives of this study were to reanalyze, integrate and compare the fish skeletal muscle mRNA profile, as well as find possible target genes involved in the growth and maintenance of the muscle phenotype. A meta-analysis was performed using keywords in the GEO Datasets and European Nucleotide Archive database. The microarray data were reanalyzed and from the differentially expressed genes (GDEs) of each dataset, an individual analysis was performed that identified the most common pathways in the studies ($p < 0.05$). These pathways, present in at least two datasets, had their genes selected for the construction of the molecular interaction network. Based on this network, the important relationship between ribosomes and cell cycle was obtained, in which some genes were selected for investigation through RT-qPCR: *rps27a*, *eef1a2*, *ccnd1*, *cdkn1a* and *pcna*, in addition to *mtor*. Investigations were performed in 12g pacus (*P. mesopotamicus*) submitted to 4 days fasting (J4d) and 3 days refeeding (R3d), and in 30g pacu submitted to 15 days fasting (J15d) and 6 hours refeeding (R6h) and 15 days (R15d). The shorter period of fasting (J4d) promoted an increase in *mtor* expression. The expression of *rps27a*, *ccnd1*, *cdkn1a* and *pcna* was reduced in R3d compared to J4d. In the longer period of fasting and refeeding, *mtor* expression was reduced in R15d compared to R6h, as well as *pcna*. Considering the expression of *rps27a*, there was a decrease in R15d compared to the J15d group, while the expression of *eef1a2* did not change. The expression of *ccnd1* was elevated in J15d and R6h compared to groups C and R15d. Important changes were also observed in *cdkn1a* expression, which maintained high levels in the Control (C) and J15d groups and decreased in R6h and R15d. Considering the important relationship between the ribosomes and the cell cycle obtained by the meta-analysis, the investigation of these selected genes demonstrates strategies adopted by musculature that include the maintenance of the translational capacity, supported by the biogenesis of the ribosomes, the optimization of protein polymerization and the repair of the tissue in the face of stress resulting from lack of food. Furthermore, considering the cell cycle, the expression of its regulators is modulated against the reduction and reestablishment of pro-proliferation conditions, aiming at cell survival during nutritional stress. In this way, our study may provide new insights into the importance of genes that regulate translation, transcription and replication, as markers associated with the maintenance of phenotype and muscle function, targeting fish growth.

Keywords: meta-analysis, fish, skeletal muscle growth.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 <i>Peixes</i>	8
1.2 <i>Músculo esquelético e Miogênese</i>	9
1.3 <i>Crescimento muscular pós-embriônico</i>	13
1.4 <i>Crescimento muscular e fatores associados</i>	14
1.5 <i>Metanálise: aplicações para o estudo do músculo esquelético e identificação de biomarcadores</i>	15
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 <i>Objetivo geral</i>	17
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	17
4. METODOLOGIA	17
4.1 <i>Meta-análise integrativa Animais e grupos experimentais</i>	17
4.2 <i>Reanálise dos dados de microarranjo e Genes Diferencialmente Expressos (GDEs)</i>	19
4.3 <i>Ontologias e Rede de Interações Moleculares</i>	19
4.4 <i>Animais</i>	20
4.5 <i>Extração de RNA total, quantificação e análise de pureza</i>	20
4.6 <i>Síntese do cDNA e RT-qPCR</i>	21
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
6. RESULTADOS	22
6.1 <i>Análises in silico</i>	22
6.2 <i>Análise de expressão gênica</i>	26
7. DISCUSSÃO	30
8. CONCLUSÕES	38
9. REFERÊNCIAS	40



PG-BGA

RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO DO MESTRADO (01/2020 – 01/2021)

- Atividades acadêmicas

Disciplinas do programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada: 19 créditos

Tópicos em Biologia Geral e Aplicada: 2 créditos;

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada "*Signaling pathway that control skeletal muscle phenotype*": 2 créditos;

Cultura celular animal: 3 créditos;

Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia: 6 créditos;

Prática Pedagógica no Ensino Superior (II): Recursos de Aprendizagem: 3 créditos;

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada "*Making Sense of OMICS: Generation, Analysis and Interpretation of Large Datasets*": 3 créditos.

- Atividades de Ensino

Monitoria na disciplina de Histologia Básica e Comparada – Ciências Biológicas (Bach/Lic) – 60 horas. 2020

Monitória do curso de férias "Virando a célula do avesso". 2021

- Co-orientação

Guilherme Gutierrez Pereira – Iniciação Científica em andamento.

Gustavo Ferreira da Silva - Capacitação para aquisição de competências específicas (128 horas). 2021

- Atividade de Extensão

Organização do Darwin Day UNESP. 2020

- Formação Complementar

The Data Scientist's Toolbox - Johns Hopkins University. 2020

Learning How to Learn - McMaster University. 2020

- Participação em eventos

1º Simpósio Brasileiro de Biologia Muscular (SBBMusc). 2021

1º Simpósio de Morfologia Comparada (Simorf). 2021

Webinar Happy Fish Hour – Conversando sobre peixes. 2020

Webinar Zebrafish as Experimental Model for Research. 2021

XXXV Reunião Anual FeSBE 2021

9º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes. 2021

- Resumos em eventos

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

Zanella, B. T. T.; Duran, B. O. S.; **Perez, E. S.**; Mareco, E. A.; Pai-Silva, M. D. *Transcriptional profile of fish isolated muscle cells treated with amino acids and Igf1. XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology (SBBC).*2021.

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

Zanella, B. T. T.; **Perez, E. S.**; Mareco, E. A.; Duran, B. O. S.; Pai-Silva, M. D. Aminoácidos são mais eficientes que o IGF1 na estimulação de vias de desenvolvimento e crescimento em células do músculo pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 9º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes. 2021

- Artigos publicados

Valente, J.S.; **Perez, E.S.**; Zanella, B.T.T.; De Paula, T.G.; Dos Santos, Sa.; Duran, B.O.S.; Carvalho, R.F.; Justulin, L.A.; Fantinatti, B.E.A.; Silva, M.D. *Maternal protein restriction changes structural and metabolic gene expression in the skeletal muscle of aging offspring rats. HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY*, 2021.

Fantinatti, Bruno; **Perez, E.S.**; Zanella, Bruna T. T.; Valente, Jéssica S.; De Paula, Tassiana G.; Mareco, Edson A.; Carvalho, Robson F.; Piazza, Silvano; Denti, Michela A.; Dal-Pai-Silva, Maéli. *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.

Duran, B.O.S.; Garcia de la Serrana, D.; Zanella, B.T.T.; **Perez, E.S.**; Mareco, E.A.; Santos, V.B.; Carvalho, R.F.; Dal-Pai-Silva, M. *An insight into the impact of teleost whole genome duplication on the regulation of the molecular networks controlling skeletal muscle growth*. *PLoS One*, 2021

1. INTRODUÇÃO

1.1 Peixes

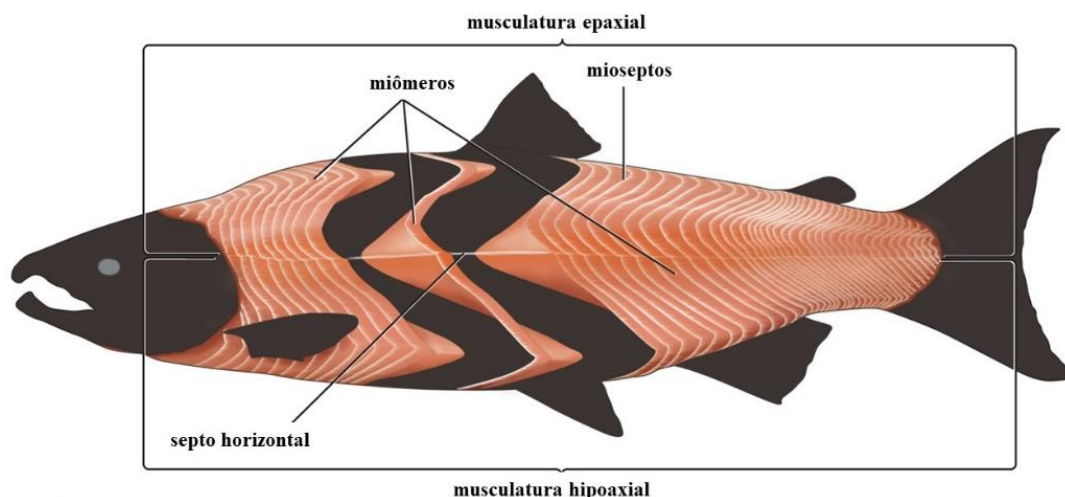
Os peixes são os vertebrados vivos mais diversificados do planeta, exibindo impressionantes adaptações aos mais variados habitats. Grande parte dessa diversidade se concentra nos ambientes dulcícolas que correspondem a uma pequena parcela de águas da superfície terrestre quando comparados aos ambientes de água salina. Esses animais possuem grande importância ecológica como mantenedores do fluxo de energia e matéria nas cadeias tróficas. Além desse aspecto, são significativos dispersores de sementes em ambientes tropicais, atuando também como bioindicadores. Com igual importância para a ciência e sociedade, esses vertebrados são modelos adequados para estudos em diversas áreas, cujas descobertas beneficiam as mais variadas esferas sociais (Nelson et al., 2016). Ainda sobre sua importância, o cultivo de peixes gera empregos e fornece segurança alimentar para populações ao redor do mundo todo (FAO 2020). Segundo o relatório “O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2020” publicado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO 2020), até 2018 a produção de peixes alcançou aproximadamente 179 milhões de toneladas, sendo o equivalente a 20.5kg/per capita de peixes consumidos. Até 2025 há a previsão de que ocorra um relevante impulso na aquicultura no Caribe e América Latina, chegando até a 3,7 milhões de toneladas de peixes produzidos (Altair Albuquerque 2018). Para o Brasil, segundo dados da Embrapa Pesca e Aquicultura (TO), de 2005 até 2015 ocorreu um aumento de 123% na aquicultura brasileira sendo que da produção aquícola, de acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) para o ano de 2015, a produção de peixes dulcícolas correspondeu à 84%, sendo 16% referente à aquicultura marinha. O Brasil possui clima e condições hidrográficas que favorecem a grande diversidade de peixes e a produção, contando com bacias hidrográficas formadas pelos maiores rios do mundo e uma costa com 7500 quilômetros (Reis et al., 2016). Apesar da grande riqueza e abundância de espécies, a produção de peixes nativos do Brasil ainda é baixa (40%) se comparada com a dos países asiáticos, em que a aquicultura é baseada quase inteiramente em espécies nativas (Saint-Paul et al., 2017). No Brasil, os peixes da família Serrasalminidae, dos gêneros *Piaractus* e

Colossoma, contribuem com aproximadamente 11 e 40 mil toneladas da produção piscícola, respectivamente (<https://panoramadaaquicultura.com.br/ibge-o-desempenho-da-aquicultura-brasileira-em-2019/>). Esse elevado número associado aos pacus (*Piaractus mesopotamicus*), peixe de grande porte (8kg à 25 kg), se deve a características que favorecem sua produção. Dentre essas características, a robustez, o alto rendimento da carcaça, a boa adaptação à alimentação artificial, rápido crescimento e grande apreciação comercial o torna uma das espécies mais cultivadas no país (Dias et al., 2005). Ainda associado ao setor produtivo, essa espécie é bastante utilizada para o estudo das respostas fisiológicas a fatores como bactérias, hipóxia e pesticidas, comumente associados aos ambientes de cultivo (Jomori et al., 2003; Gutierrez et al., 2014; Dos Santos et al., 2017; Nitz et al., 2020; Silva et al., 2021). Nos últimos anos, porém, estudos utilizando esse peixe redondo têm avançado. O emprego de técnicas modernas, como o sequenciamento e cultura celular primária, possibilitam não apenas a compreensão da relação entre o ambiente de cultivo e o desenvolvimento e crescimento dos peixes, como também de sua genética. Esse último aspecto atribui características como a grande capacidade de crescimento e o volumoso tecido muscular dos pacus (Duran et al. 2015; Duran et al. 2019; Fantinatti et al. 2021).

1.2 Músculo Esquelético e Miogênese

O músculo esquelético é um tecido complexo e dinâmico que possui origem independente ao longo da evolução dos eumetazoa. Inicialmente, surgiu com tipos celulares mais simples até a adição de novas proteínas que compõem sua morfologia característica com estriações (Steinmetz et al. 2012). Nos vertebrados atuais, esse tecido é formado por fibras musculares que são células longas, cilíndricas e com múltiplos núcleos periféricos as quais são responsáveis por transformar energia química em energia mecânica para geração de força e movimentos essenciais à vida (Ramírez-Oseguera et al. 2013). Nos peixes, esse tecido é o mais abundante, compondo cerca de 60% de sua massa corporal que além de permitir a movimentação e sustentação corpórea, representa uma copiosa reserva de aminoácidos e, assim, de energia, requerida em um ambiente denso como a água (Bone, 1978). A anatomia segmentada do tecido muscular permite a grande habilidade de natação dos peixes e seu movimento ondulatório, em que esses segmentos são denominados miômeros, definidos como unidades em formato de “W” que se repetem ao longo do corpo do animal (Listrat et al., 2016; Sanger et al., 2001). Esses miômeros são segmentados por mioseptos que são compostos por tecido conjuntivo o qual recebe diferentes classificações de acordo com a sua localização no músculo (L.C, Junqueira José, 2012). O tecido conjuntivo ainda se faz presente no miosepto horizontal que divide a musculatura dos peixes em epaxial e hipoaxial (**Fig 1**). O tecido conjuntivo mais externo e que envolve o músculo em sua totalidade é denominado

epimísio. Envolvendo feixes de fibras musculares está o perimísio e, por fim, em torno de cada fibra muscular há o endomísio. Esse arranjo bem organizado garante a transmissão de força de contração entre as diferentes fibras musculares durante movimentos ondulatórios de natação (Listrat et al., 2016)



© 2013 Encyclopædia Britannica, Inc.

Fig 1. Musculatura de peixe demonstrando os miômeros em formato de W conectados pelos mioseptos de tecido conjuntivo. O septo horizontal segmenta a musculatura em epaxial e hipoaxial (adaptado de <https://www.britannica.com/science/muscle>).

Nos mamíferos, as fibras do músculo esquelético estão arranjadas em mosaico caracterizado pela mistura dos diferentes tipos de fibras as quais diferem quanto à velocidade de contração e metabolismo, devido à presença de diferentes isoformas da cadeia pesada da miosina (MyHC) (Ciciliot et al. 2013). Já nos peixes, os diferentes tipos de fibras musculares estão organizados nos compartimentos profundo, superficial e intermediário (Johnston et al., 2011). No compartimento profundo, referido também como vermelho ou *slow*, há a predominância de fibras do tipo I que possuem menores diâmetros, muitas mitocôndrias e predominância do metabolismo oxidativo, contração lenta e abundante suprimento sanguíneo (Sänger et al., 2001). Esse compartimento ocupa regiões próximas à nadadeira dorsal e linha lateral do peixe, compondo aproximadamente 10% da musculatura, tendo suas fibras recrutadas em movimentos contínuos e de menor velocidade, como as migrações. Por outro lado, o compartimento superficial, branco ou *fast* é o mais volumoso, constituindo cerca de 70% da musculatura. Nele, há o predomínio de fibras do tipo II que apresentam maior diâmetro, poucas mitocôndrias e metabolismo glicolítico, contração rápida e menor suprimento sanguíneo em relação à musculatura vermelha. As fibras desse músculo são recrutadas durante movimentos de curta duração e de alta velocidade, como a predação. Localizado entre esses dois compartimentos, o compartimento intermediário abriga

305 fibras com características mistas, com contração rápida e metabolismo oxidativo e glicolítico
306 (Johnston et al., 1977).

307 O processo da miogênese, em que há a formação do tecido muscular, ocorre logo no início
308 do desenvolvimento embrionário e, em algumas espécies de peixes, as células musculares
309 apresentam capacidade de contração 24 horas após a fertilização. Esse caráter confere vantagem
310 adaptativa ao grupo, permitindo o comportamento de forrageio e a fuga de predadores em um
311 ambiente de fecundação externa e de espécies comumente R estrategistas (Keenan et al., 2019).

312 Em todos os vertebrados, a miogênese ocorre a partir da segmentação do mesoderma
313 paraxial no sentido do eixo rostro-caudal do embrião, originando os somitos encontrados aos pares
314 em torno da notocorda e tubo neural (Johnston, 2006). As células do mesoderma paraxial,
315 localizadas próximas à notocorda, expressam MRFs (*Myogenic Regulatory Factors*) que
316 orquestram a miogênese como um todo. Nesse início miogênico, a expressão dos MRFs myod
317 (*Myogenic Differentiation 1*) e myf5 (*Myogenic Factor 5*) é responsável por induzir tanto a
318 expressão de miosinas para o fenótipo lento, como para o fenótipo rápido muscular havendo,
319 assim, um comprometimento inicial das células com a linhagem miogênica. Essas MPCs
320 (*Myogenic Precursor Cells*) formam uma monocamada ao redor da notocorda (**Fig 2A**) a qual,
321 através da expressão de *Hedgehogs* (HH), promove a inibição de genes associados ao fenótipo
322 rápido da fibra muscular, havendo o comprometimento com o fenótipo *slow* das MPCs. Essas
323 células comprometidas, chamadas células adaxiais, migram lateralmente para a superfície e dão
324 origem às fibras lentas do miótomo primário. As fibras lentas comporão o compartimento
325 vermelho do músculo esquelético dos teleósteos. Já as células adaxiais que não migram originam
326 as MPs (*Muscle Pioneer*) (**Fig 2B**). As MPs são as primeiras células a se diferenciarem em fibras
327 lentas funcionando como trilhos que guiam as demais células adaxiais durante a migração, além
328 de serem sugeridas como precursoras do miosepto horizontal que segmenta a musculatura axial
329 em epaxial e hipoaxial (Blagden et al., 1997; Chal et al., 2017; Devoto et al., 2012; Johnston et al.,
330 2011; Keenan et al., 2019; Rossi et al., 2014). Além dos HH requeridos para a especificação das
331 MPCs, microRNAs (miRNAs) como miR-499, miR-214 e a MEC (*Extracellular Matrix*) também
332 estão associados a esse processo a partir da ação pós-transcricional e da distribuição de
333 sinalizadores, respectivamente (Huang et al., 2012; Alex et al., 2014; Duran et al., 2015).

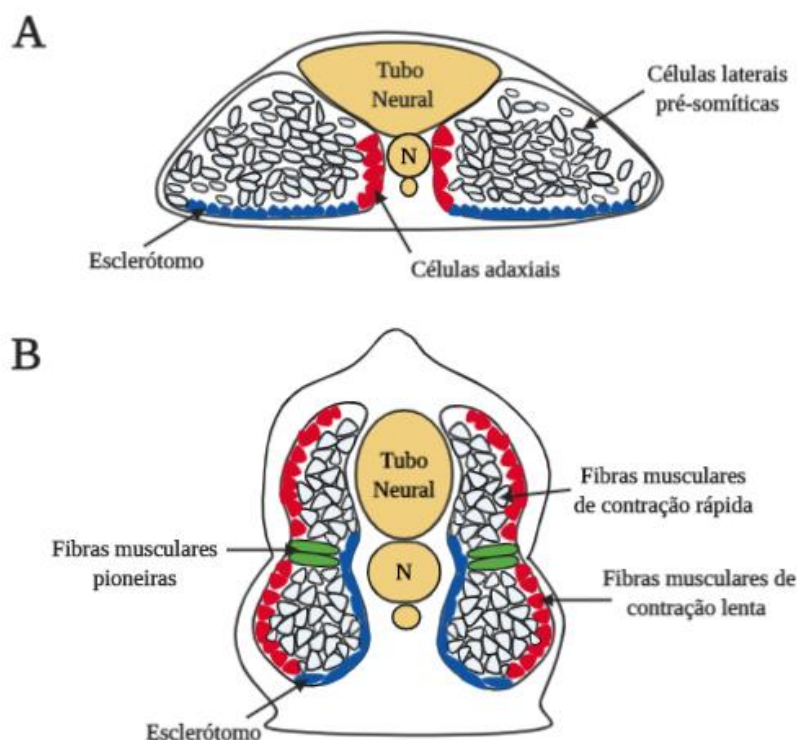


Fig 2. Miogênese embrionária de *Danio rerio* (zebrafish) em vista transversal. **(A)** Localização das células adaxiais próximas à notocorda e laterais pré-somíticas em torno da notocorda e do tubo neural. **(B)** Localização das fibras musculares de contração lenta logo abaixo da epiderme após migração lateral das células adaxiais; fibras musculares de contração rápida originadas a partir das células laterais pré-somíticas compondo a maior parte do miótomo do peixe; fibras musculares pioneiras que viabilizam a migração das células adaxiais (baseado em STICKNEY *et al.*, 2000).

As células não adaxiais do miótomo originam alguns compartimentos, dentre eles o compartimento posterior e uma camada de células externas (*External Cell Layer* - ECL). No compartimento posterior do miótomo primário, as células pré-somíticas laterais dão origem às fibras musculares rápidas que formarão o compartimento branco do músculo dos teleósteos (Keenan *et al.*, 2019). Essas células se diferenciam pelo estímulo de uma segunda onda de MRFs e de modo HH- independente. Em adição a esses estímulos moleculares, a própria migração das células adaxiais interfere e estimula a diferenciação e morfogênese das fibras musculares rápidas sendo, portanto, processos interdependentes (Henry *et al.*, 2004). Além das fibras lentas e rápidas, ainda pouco se sabe sobre a formação das fibras intermediárias do músculo, sendo possível que essa miscelânea de características contráteis e metabólicas seja oriunda de fatores provenientes tanto de fibras lentas como rápidas, durante a miogênese (Keenan *et al.*, 2019). Ainda sobre as células não adaxiais, a ECL é uma população de células altamente proliferativa que se renova e que contribui para a formação do miótomo primário. Essas características funcionais se assemelham muito às funções do dermomiótomo em amniotas que também fornece células para a formação do miótomo e expressa *pax3* (*Paired Box 3*), *pax7* (*Paired Box 7*) e *meox* (*Mesenchyme*

Homeobox) (Devoto et al., 2007; Daggett et al., 2010; Keenan et al., 2019). De modo contrário aos aminiotas, essa estrutura contribui não apenas para o crescimento juvenil dos peixes, mas também para o crescimento secundário caracterizado pelo aumento exponencial do miótomo que compõe cerca de 60% da massa corporal desses animais (Chal et al., 2017; Johnston et al., 2011).

No cenário de miogênese, tanto em teleósteos como em mamíferos, são identificadas diferentes populações celulares. Porém, ainda durante o desenvolvimento embrionário, as MPCs dos peixes se organizam em distintos compartimentos onde formarão as fibras musculares adultas. Apesar de muitos processos miogênicos serem conservados ao longo da evolução dos vertebrados, esse traço é um dos que diferem os peixes dos mamíferos nos quais não há a organização das fibras musculares em compartimentos (Devoto et al., 1996; Stickney et al., 2000).

1.3 Crescimento muscular pós-embrionário

A miogênese secundária dos teleósteos envolve as células satélites ou MPCs residentes, ativas durante o crescimento muscular pós-embrionário (Hollway et al. 2010; Stellabotte et al. 2007). Essas células participam de processos de crescimento e regeneração do músculo compondo populações de células tronco auto renováveis e células filhas já comprometidas com a diferenciação (Johnston et al., 2011). Os fatores de transcrição da família Pax são altamente conservados nos vertebrados e considerados marcadores moleculares das células satélites. Dentre eles o pax3 e pax7 que são expressos em peixes e em mamíferos, exercem a função de regulação da migração das células satélites dos somitos, são requeridos na miogênese tardia, além de serem necessários na função e manutenção das células satélites (Wang et al., 2021). Em diferentes condições ambientais e em períodos distintos do ciclo de vida o balanço entre a proliferação e diferenciação define o número dessas MPCs e, assim, o crescimento muscular cujos fenótipos hipertrófico e/ou hiperplásico são também determinados pela expressão de pax3 e pax7, além dos próprios MRFs (Froehlich et al. 2013). Após o comprometimento das MPCs com a linhagem miogênica, essas células serão incorporadas às fibras musculares pré-existent (hipertrofia) ou darão origem a novos miotubos (hiperplasia), durante o crescimento muscular (**Fig 3**) (Johnston et al., 2011). Os autores descreveram dois padrões de crescimento hiperplásico em peixes: a hiperplasia estratificada e a hiperplasia em mosaico (Biga et al., 2019). A hiperplasia estratificada é caracterizada pela formação de novas fibras em estratos de diâmetros distintos bastante característico. Essa formação muscular se estende da superfície até as porções mais profundas do miótomo ocorrendo a partir de zonas localizadas na ECL. A hiperplasia estratificada é mais intensa predominantemente após a somitogênese e reduz quando os teleósteos alcançam a maturidade, sendo ainda persistente após a maturação. Por outro lado, a hiperplasia em mosaico é caracterizada

pela formação de novas pequenas fibras, a partir de MPCs do miótomo, entremeadas às fibras musculares já existentes. Esse tipo de hiperplasia ocorre após o início da hiperplasia estratificada e varia em sua constância entre diferentes espécies de teleósteos (Keenan et al., 2019; Vo et al., 2016). Os peixes que apresentam a persistência de ambos os padrões de crescimento hiperplásico ao longo da vida, como os pacus, são denominados espécies de crescimento indeterminado. Contrariamente, os peixes com hiperplasia em mosaico mais restrita aos primeiros dias pós-eclosão são classificados como de crescimento determinado, o que ocorre no *zebrafish*, por exemplo (**Fig 3**), considerando ainda que estes processos estão propensos à ação de inúmeros fatores endógenos e ambientais (Biga et al., 2019, Keenan et al., 2019).

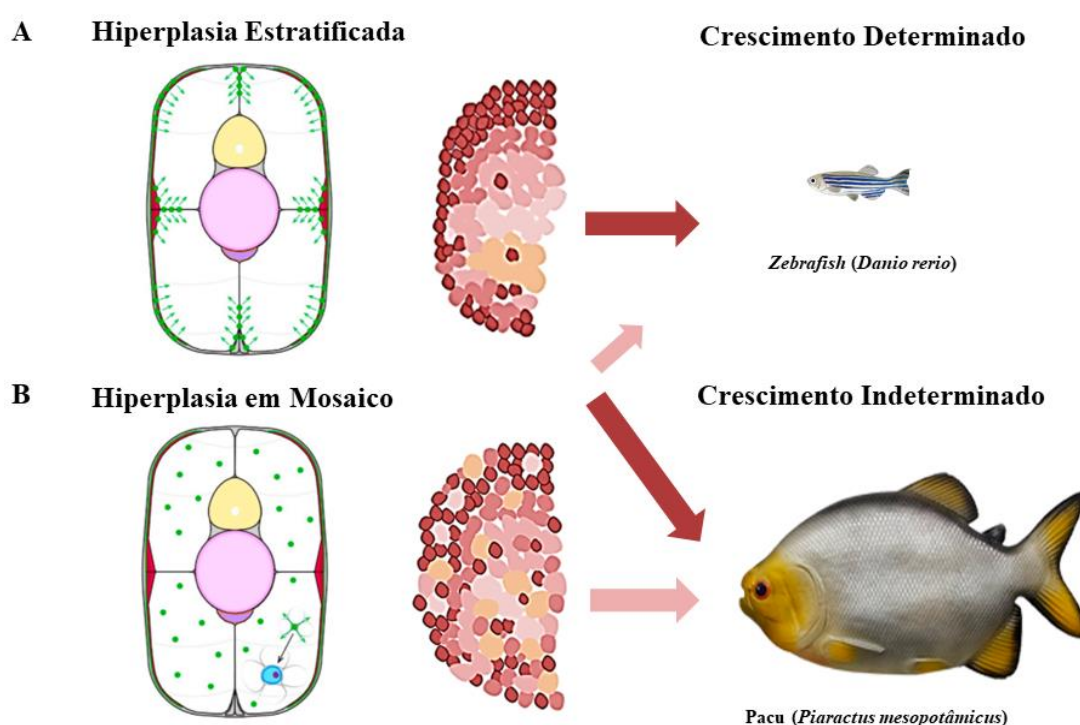


Fig 3. Padrões de crescimento em peixes. **A.** Hiperplasia estratificada que envolve a formação de novas fibras em um gradiente de diâmetros a partir da ECL (*External Cell Layer*). A predominância do crescimento muscular através dessa hiperplasia (seta vermelha) e a contribuição em um menor período de tempo da hiperplasia em mosaico (seta rosa), atribui o padrão de crescimento determinado ao *zebrafish*. **B.** Hiperplasia em mosaico que consiste na formação de novas fibras musculares na superfície de fibras já existentes a partir de MPCs (*Myogenic Precursors Cells*) do miótomo. A continuidade da hiperplasia estratificada (seta vermelha) e hiperplasia em mosaico, mais intensa (seta rosa), ao longo da vida dos peixes atribui o crescimento indeterminado a certas espécies, como no pacu. Adaptado de Keenan et al., 2019.

1.4 Crescimento muscular e fatores intrínsecos associados

O músculo esquelético é dotado de alta plasticidade fenotípica e seu crescimento é regulado tanto por fatores endógenos, como por fatores ambientais (Johnston, 2006). Alguns fatores associados ao crescimento e citados a seguir são bem estudados e descritos pela literatura, porém,

existem inúmeros reguladores do crescimento muscular que ainda não foram caracterizados. Considerando os fatores endógenos ao crescimento, a atuação do eixo GH/IGF (*Hormone Growth e Insulin-like Growth Factor*) é bastante relevante. O IGF é um fator de crescimento que compõe a via anabólica do músculo, responsável pela síntese de proteínas e hipertrofia. A hipertrofia muscular ocorre quando há o predomínio da síntese sobre a degradação proteica, sendo essa última regulada por genes como *murf1* (*Muscle RING finger protein-1*) e *mafbx* (*Muscle atrophy F-box*) (Ciciliot et al. 2013). De modo semelhante aos efeitos do IGF, o GH regula o crescimento através de transcritos amplamente encontrados em diversos tecidos de peixes de crescimento indeterminado (Biga et al., 2019). O GH exógeno é capaz de promover um aumento no crescimento de *zebrafish*, porém de modo limitado, enquanto em salmão esse crescimento é potencializado em um curto período de tempo, devido ao padrão de crescimento distintos entre as espécies. Ainda sobre o eixo GH/IGF, ambos estimulam expressivamente a proliferação de mioblastos e interagem com MRFs envolvidos nas primeiras fases da miogênese (Bentzinger et al., 2012). Em conjunto aos fatores pró-crescimento, a regulação do promotor de MYHM2528-1, uma miosina expressa durante a formação do miótomo dos peixes, é associada ao fenótipo de crescimento indeterminado de torafugu (*Takifugu rubripes*) e crescimento determinado de *zebrafish*. Ainda MYHM2528-1 se relaciona ao fator de regulação miogênica, *myod*, atuando como um regulador do promotor desse importante fator de transcrição que regula a proliferação de células musculares (Ahammad et al., 2015; Ahammad et al., 2019). Além desses reguladores moleculares, os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs de fita simples, não codificantes e com atuação pós-transcricional que exercem o importante papel na regulação do crescimento muscular, tanto em mamíferos como nos peixes. Em 2012, o primeiro microRNAoma de truta arco-íris revelou o miR-1, miR-133, miR-206 e miR-499 como associados ao crescimento muscular. A partir desse *insight*, sabe-se hoje que esses miRNAs atuam na proliferação, diferenciação e especificação do fenótipo rápido e lento das fibras musculares representando, assim, marcadores relevantes para a maximização e melhoramento da piscicultura (Duran et al., 2020; Duran et al., 2015; Fantinatti et al., 2021). Como uma metodologia empregada para a identificação de muitos desses marcadores, a meta-análise pode representar uma boa estratégia.

1.5 Meta-análise: aplicações para o estudo do músculo esquelético e identificação de biomarcadores

Considerando o surgimento de novas tecnologias, a possibilidade de geração de dados em larga escala, dentre eles dados transcriptômicos (RNAseq ou *microarray*), é elevada e, muitas vezes, a resposta biológica implícita nesses resultados é pouco explorada (Rung et al., 2012). Por

essa razão, o acesso e a reanálise desses dados depositados em bancos públicos podem permitir novos conhecimentos a serem aplicados, uma visão abrangente de processos celulares e suas vias de sinalização, além da obtenção moléculas chaves marcadoras de processos biológicos normais ou patogênicos (Riverol et al., 2016).

Dentre as metodologias para a identificação de biomarcadores, a meta-análise é um método estatístico que compila, compara e avalia dados de estudos pré-existentes e independentes a partir de uma revisão sistemática. O potencial e a relevância da meta-nálise depende da qualidade e quantidade dos estudos previamente selecionados, além de requerer metodologia clara, discussão robusta e abrangente dos resultados obtidos (Møller, 2016). Esse método tem sido muito utilizado em estudos sobre o câncer que reúnem grande quantidade de dados para a melhor compreensão da doença e identificação de biomarcadores que permitem a terapia personalizada (Coyne et al., 2010; Freire *et al.*, 2019). Recentemente, a meta-nálise foi aplicada na investigação de possíveis drogas e seus efeitos na covid-19, além do emprego de dados *ômicos* para identificação de biomarcadores de inflamação nessa infecção (Bertoni et al., 2016; Muhammad et al., 2020; Hove et al., 2018; Zeng et al., 2020). A metanálise também é utilizada no estudo do músculo esquelético para a identificação de vias comumente alteradas durante a atrofia em pacientes e modelos murinos com câncer, (Freire et al., 2019) bem como para avaliar os efeitos do ômega 3 sobre a massa, força e performance muscular em idosos (Huang et al., 2020). Para o estudo do músculo esquelético de peixes, essa metodologia já foi utilizada em análises da capacidade metabólica associada à redução de nutrientes, para a avaliação da variação sazonal de concentração de mercúrio e para a identificação de altos níveis de mioglobina em determinadas espécies (Calduch-giner et al., 2014; Mills et al., 2018; Chen et al., 2020). No entanto, estudos de meta-análise com enfoque na avaliação de possíveis biomarcadores de crescimento e manutenção do fenótipo muscular em peixes, são inexistentes até o momento. Nesse contexto, a investigação desses alvos obtidos em peixes submetidos ao jejum e realimentação, pode ampliar o conhecimento acerca da biologia das fibras musculares esqueléticas frente a alterações no *status* nutricional das células, um componente relevante para o manejo no setor aquícola.

2. JUSTIFICATIVA

Este estudo busca aprofundar a compreensão acerca do controle do crescimento muscular esquelético em peixes, processo de extrema importância para a fisiologia desses animais e para o setor produtivo, utilizando uma ferramenta *in silico* para a prospecção de novos alvos moleculares. O estabelecimento de um conjunto de genes alvo que regulam o crescimento muscular, pode assegurar melhorias no manejo e seleção de espécies cultivadas quando investigados no modelo

de jejum e realimentação, estratégias comumente utilizadas pelo setor produtivo visando a redução de gastos e o crescimento compensatório dos peixes. Além desses aspectos, o caráter exploratório das análises deste estudo pode ampliar nossa visão a respeito da biologia celular e molecular das fibras/células musculares frente à manipulação da disponibilidade de nutrientes. Nesse contexto, a seleção e investigação de genes alvos a partir das análises *in silico* contribuirão, possivelmente, com o aprimoramento de técnicas moleculares customizadas que visam a otimização da produção em um contexto de crescente demanda populacional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Reanalisar, integrar e comparar o perfil de mRNAs do músculo esquelético de peixes, bem como encontrar possíveis genes alvos envolvidos com o crescimento e manutenção do fenótipo muscular.

3.2 Objetivos específicos

- Compreender a função biológica dos genes obtidos, bem como analisar a interação entre eles;
- Investigar a expressão de alvos selecionados no modelo de jejum e realimentação.

4. METODOLOGIA

4.1 Meta-análise Integrativa

A meta-análise integrativa foi realizada de acordo com os requerimentos contidos em *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA, <http://www.prisma-statement.org/>). As palavras-chave utilizadas para a busca dos estudos foram: “fish AND skeletal muscle”, “fish skeletal muscle AND transcriptome”, “fish skeletal muscle AND transcriptomic”, “fish skeletal muscle AND transcriptomics”, e “fish skeletal muscle AND mRNA profiling”. Esta metanálise contém estudos realizados entre 2012 e 2018. Os critérios de inclusão foram (1) estudos com dados brutos de mRNAs da musculatura branca e vermelha de peixes, (2) foram incluídas apenas amostras de peixes da classe Osteichthyes e (3) perfis transcricionais de bancos públicos provenientes da tecnologia de microarranjo. Os critérios de exclusão foram: (1) estudos com manipulação genética, (2) estudos que não utilizaram o músculo estriado esquelético de peixes, (3) estudos de *single cell*, (4) estudos que não utilizaram dados de mRNAs, (5) dados de RNAseq (6) estudos *in vitro*, (7) modelos de envelhecimento, (8) modelos de doenças crônicas, (9) estudos utilizando peixes da classe Chondrichthyes, (10) estudos sem informações necessárias

ou publicação e (11) estudos com peixes elétricos. O banco de dados *GEO Datasets (NCBI)* e *European Nucleotide Archive (ENA)* foram utilizados para a busca e *download* dos dados de mRNAs do músculo esquelético dos estudos incluídos (**Fig 4**).

É importante salientar que apesar de terem sido encontrados estudos contendo dados de RNAseq, os quais também fornecem perfis transcriptômicos, foram selecionados para a meta-análise apenas estudos contendo dados de *microarray*. Isso se deve ao fato de que RNAseq e *microarray* são tecnologias com profundidade de sequenciamento distinta e que requerem ferramentas específicas para que seus dados sejam reanalisados. Além disso, a heterogeneidade em relação às espécies e aos diferentes tratamentos que compõem os estudos de *microarray* selecionados, foi relevante para reforçar o papel conservado dos genes selecionados em condições experimentais distintas, até mesmo em relação aos modelos em que foram investigados.

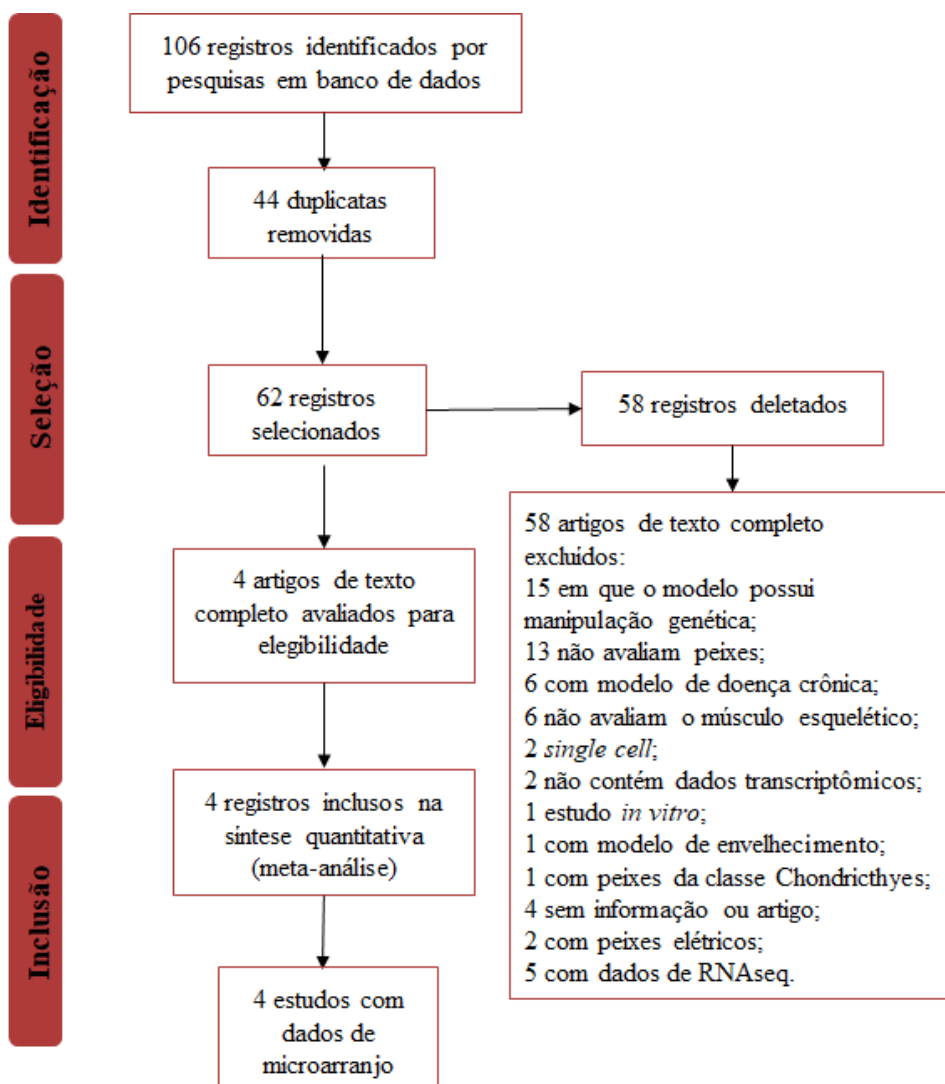


Fig 4. Fluxograma de pesquisa de literatura na meta-análise.

4.2 Reanálise dos dados de microarranjo e Genes Diferencialmente Expressos (GDEs)

Os estudos contendo dados de microarranjo e seus respectivos números de série foram obtidos a partir do banco *GEO Datasets*. Considerando que os experimentos de microarranjos podem ser desenhados em duas diferentes plataformas, *one-color* e *two-colors array*, foram utilizadas análises específicas para os dados de cada uma dessas plataformas. Para a reanálise desses dados no sistema *one-color*, foi utilizada a ferramenta *GEO2R tool* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) que emprega o mesmo *script* (R 3.2.3, Biobase 2.30.0, GEOquery 2.40.0, limma 3.26.8) para todos os conjuntos de dados. Para selecionar os GDEs (Genes Diferencialmente Expressos) neste sistema, foram considerados os valores p ajustado (padj) < 0.05 e $|Fold\ Change\ (FC)| > 1.5$. Para a reanálise dos dados no sistema *Two-color* (Lapa et al., 2019), os GDEs foram obtidos através da diferença do $\log_2$ ER (*expression ratio*: Cy5/Cy3 ou Cy3/Cy5) médio de zero entre os *chips* e considerando o valor de $p < 0.05$ e $|Fold\ Change\ (FC)| > 1.5$. Cy5 e Cy3 são cianinas que emitem fluorescência quando há hibridização entre o cDNA da amostra com a sonda contida no *chip* de microarranjo.

4.3 Ontologias e Rede de Interações Moleculares

A partir dos GDEs de cada conjunto de dados, foi realizado o enriquecimento de vias através da ferramenta *Fish EnrichR* (<https://amp.pharm.mssm.edu/FishEnrichr/>). É importante salientar que para essa análise, as listas dos genes *up* e *down* regulados foram inseridas juntas no programa devido à similaridade de processos biológicos que esses genes participam. *Biological Process*, *Molecular Function*, *WikiPathway* e *KEGG* foram as bibliotecas a partir das quais os termos enriquecidos foram selecionados, considerando o valor de $p < 0.05$ (teste de Fisher). A partir do enriquecimento de vias de cada *dataset*, foi realizada uma análise inicial e individual para a identificação das vias mais comuns entre os datasets. Essas vias em comum em pelo menos dois conjuntos de dados, tiveram seus genes selecionados para a construção de uma rede de interação molecular através da ferramenta *STRING version 11* (<https://string-db.org/>). Foram considerados bancos de dados, mineração de texto, experimentos, co-expressão e co-ocorrência como fontes de interação ativa. A pontuação mínima de interação exigida foi a de maior confiança (0.900) e o valor p de enriquecimento PPI indica a significância estatística fornecida por *STRING* ($< 1.0 \times 10^{-16}$). Para melhor visualização, os nodos sem conexões foram ocultados e os nomes das proteínas mantidos. Baseado nesta rede e com o respaldo da literatura, os alvos foram selecionados para investigação através de RT-qPCR em amostras musculares de pacu.

4.4 Animais

- *Piaractus mesopotamicus* (pacus)

Para a investigação dos alvos selecionados sob jejum e realimentação, modelos relevantes para a aquicultura, foram utilizados juvenis de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) com $12.6 \text{ g} \pm 2.24$ e $28.5 \text{ g} \pm 8.8$ provenientes da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil e cultivados na Agência de Tecnologia do Agronegócio (APTA), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. Os peixes com diferentes pesos foram selecionados para que as investigações contemplassem diferentes períodos de crescimento. Os pacus foram criados em sistemas de recirculação distintos em tanques com $0,25 \text{ m}^3$ com 35 animais em cada tanque (densidade de 140 peixes / m^3) à 28°C sob o fotoperíodo de 12 horas de claro:12 horas de escuro. O oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram monitorados diariamente e os parâmetros, pH, amônia, nitrito e nitrato, semanalmente. Os peixes foram alimentados *ad libitum*, de duas a três vezes ao dia, com as dietas padrão previamente descritas em Zanella et al., 2021, havendo um período de adaptação de 15 dias antes do início dos experimentos. Após esse período, os peixes com peso aproximado de 12g foram divididos nos seguintes grupos: Controle (C - com alimentação contínua), Jejum (J4d - jejum durante 4 dias) e Realimentação (R3d – realimentação por 3 dias após jejum). Os animais com peso aproximado de 30g foram submetidos à um maior período de jejum e realimentação considerando a sua fase de crescimento, sendo divididos nos grupos: Controle (C - com alimentação contínua), Jejum (J15d - jejum durante 15 dias) e Realimentação (R6h – realimentação por 6 horas após jejum e R15d – realimentação por 15 dias após jejum). A extensão dos períodos de jejum e realimentação foi selecionada com base no tamanho dos peixes, de modo que essas alterações nutricionais fossem capazes de modificar o fenótipo muscular sem desencadear a morte dos peixes antes da avaliação experimental. O condicionamento e procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os regulamentos nacionais do Comitê de Ética do Instituto de Biociências de Botucatu (CEUA 705 and 1050).

- *Coleta do tecido muscular*

Para a eutanásia dos pacus (*P.mesopotamicus*) foi utilizada benzocaína em uma concentração superior a 250 mg/L. As amostras da musculatura epaxial, localizada acima da linha lateral, foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Após, essas amostras foram armazenadas em freezer a -80°C , até o início das análises.

4.5 Extração de RNA total, quantificação e análise de pureza

Para as investigações dos genes selecionados nas análises *in silico*, o RNA total das amostras do músculo dos pacus foi extraído de acordo com o protocolo do TRIzol® (Invitrogen

Life Technologies, EUA) seguindo as instruções do protocolo. Para a quantificação e análise de pureza do RNA extraído, foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (*GE Healthcare*, EUA) que fornece esses parâmetros através das razões 260/280 e 260/230, em que os valores superiores a 1.8 e 2.0 foram considerados, respectivamente. A densidade óptica a 260 nm se refere à quantidade de RNA e 280 nm corresponde à quantidade de proteínas. Já na razão 260/230 nm, a densidade óptica a 230 se refere a possíveis contaminações com reagentes utilizados como Tris e EDTA. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.6 Síntese do cDNA e RT-qPCR

O RNA total foi tratado com o kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) para eliminar resíduos de DNA contaminante nas amostras. Para as análises de expressão gênica foi realizada a transcrição reversa do RNA extraído em cDNA, através do kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de expressão gênica foram analisados por RT-qPCR, utilizando a plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, EUA) para a amplificação do cDNA dos genes selecionados. Nessa análise foi utilizado o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, EUA). Os primers para as amostras de pacus (*P.mesopotamicus*) foram desenhados com base em seu transcriptoma obtido em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Mareco et al, 2015). A expressão gênica de *rps27a*, *eef1a2*, *ccnd1*, *cdkn1a* e *pcna* (**Tabela 1**) foi avaliada tanto em pacus (*P.mesopotamicus* de 12g) submetidos ao jejum de 4 dias e realimentação de 3 dias, como em pacus (*P.mesopotamicus* de 30g) submetidos ao jejum de 15 dias, realimentação de 6 horas e de 15 dias. O gene *ppia* foi selecionado como endógeno para calibração das amostras de pacus (*P.mesopotamicus*). A quantificação relativa da expressão dos genes foi realizada pelo método do CT comparativo, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela1. Siglas, nomes e sequências de *primers* que foram utilizados para a reação de RT-qPCR.

Sigla	Nome do gene	Sequência do primer
<i>rps27a</i>	<i>Ribosomal Protein S27a</i>	F:CTACACCACCCCAAGAAGA R:ATGAAAACACCAGCACCACA
<i>eef1a2</i>	<i>Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 2</i>	F:GAACAAATGCCACGGTTTCT R:AGAGCCCAACTACAGCCAGA
<i>ccnd1</i>	<i>Cyclin D1</i>	F:CACGATGCTAACCTGCTCAA R:TTTTGGGCACGATTCTTTC

<i>cdkn1a</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	F: GTGGCGTTTCTCTGCTTAGG R: GATTCCGACTGAATGGCACT
<i>pcna</i>	Proliferating Cell Nuclear Antigen	F: TGTCCCAGACCAGCAATGTG R: GCTGAGCGTGACTGTTTTGG
<i>mtor</i>	Serine/Threonine-Protein Kinase TOR	F: TTGGGAGAGACGTACTGC R: CACAGGACTGGTGTAGGAA
<i>ppia</i>	Peptidylprolyl Isomerase A	F: ATTGTGGTTCGTGAAGTCGC R: CCGCTGGGCAGAGTGATTAT

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises de expressão gênica, foram realizadas comparações entre os grupos experimentais C, J15d, R6h e R15d, e, separadamente, entre os grupos C, J4d e R3d. Após a realização do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) para todos os genes avaliados, foram aplicados os testes ANOVA one way com pós teste de Tukey para os dados com distribuição Gaussiana. Por outro lado, para os dados que não possuem distribuição normal foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Para todos os testes, o intervalo de confiança adotado foi de 95%.

6. RESULTADOS

6.1 Análises *in silico*

A partir da metanálise, foram selecionados quatro conjuntos de dados que utilizaram microarranjo para a obtenção da expressão gênica. Cada *dataset* possui seu respectivo número de série identificado no banco de dados como: GSE58929, GSE84288, GSE36339 e GSE47141. Peixes das espécies *Danio rerio* submetidos à exercício, *Salmo salar* submetidos ao consumo de glicosinolatos, *Sparus aurata* que consumiram lipopolissacarídeos e *Oncorhynchus mykiss* submetidos ao exercício e dieta rica em carboidratos, são os modelos contidos nesses estudos, respectivamente. Considerando todos os *datasets*, foram obtidos 2080 genes *up*-regulados e 796 *down*-regulados. Individualmente, para o *dataset* GSE58929 foram obtidos 1516 genes *up*-regulados e 215 *down*-regulados. 195 *up*-regulados e 158 *down*-regulados para o GSE84288, 43 *up*-regulados e 38 *down*-regulados para o GSE36339 e, por fim, 327 *up*-regulados e 385 *down*-regulados para o GSE47141 (**Tabela 2**). Para a análise de enriquecimento foram utilizadas as listas contendo tanto os genes *up* como os *down* regulados de cada *dataset* (**Fig 5 à 8**). Os processos biológicos mais enriquecidos em cada conjunto de dados foram associados, principalmente, aos ribossomos e ao ciclo celular e representados por alguns termos como *Cytoplasmic Translation*

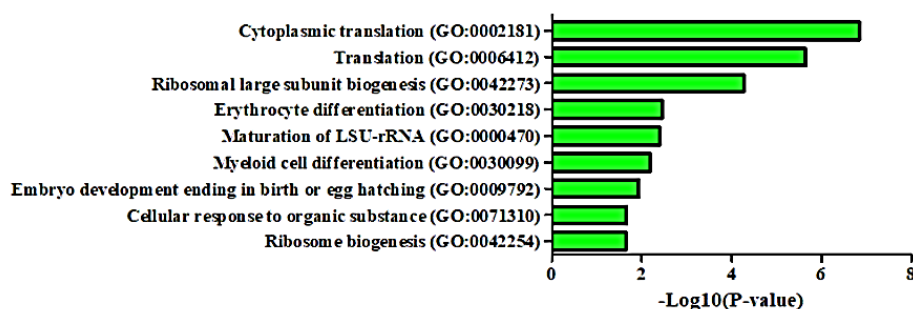
PG-BGA

(GO:0002181), *Cytoplasmic Ribosomal Proteins_WP324*, *Ribosome*, *Positive regulation of cell cycle* (GO:0045787) e *Cell cycle_WP1393*. Com base nesses resultados associados à síntese proteica e proliferação e considerando os objetivos deste estudo, os processos biológicos, como os citados acima, presentes em pelo menos dois conjuntos de dados tiveram seus genes selecionados (**Fig 9**) e plotados em uma rede de interação molecular. Por essa razão, na composição da rede não estão presentes os genes obtidos a partir do *dataset* GSE84288, pois eles enriqueceram processos biológicos que não se adequaram aos objetivos do estudo (**Fig 8**)

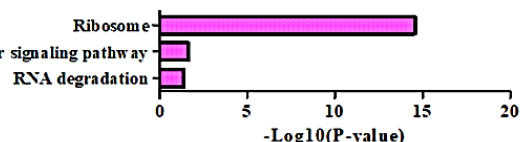
Tabela 2. Identificação, caracterização e número de genes de cada estudo contidos na reanálise de dados.

Número de série	Espécie	Tratamento/Desafio	Genes <i>up</i> regulados	Genes <i>down</i> regulados
GSE58929	<i>Danio rerio</i>	Exercício	1516	215
GSE84288	<i>Salmo salar</i>	Consumo de glicosinolatos	195	158
GSE36339	<i>Sparus aurata</i>	Consumo de lipopolissacarídeos	43	38
GSE47141	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Exercício e consumo de glicosinolatos	327	385
Total de genes			2081	796

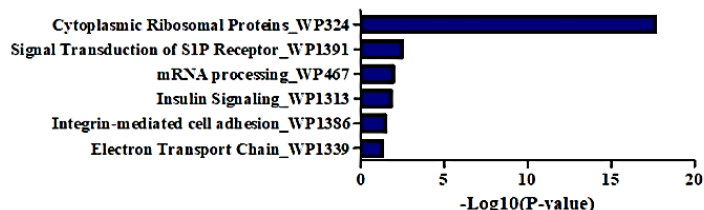
Biological Process - GSE36339



KEGG - GSE36339



Wikipathway - GSE36339





PG-BGA

Fig 5. Enriquecimento de vias do *dataset* GSE36339 considerando três bibliotecas distintas: *Biological Process* (verde), *KEGG* (rosa) e *Wikipathway* (azul). Os valores de enriquecimento de cada termo estão representados como $-\text{Log}_{10}(\text{P-value})$, considerando $p < 0.05$.

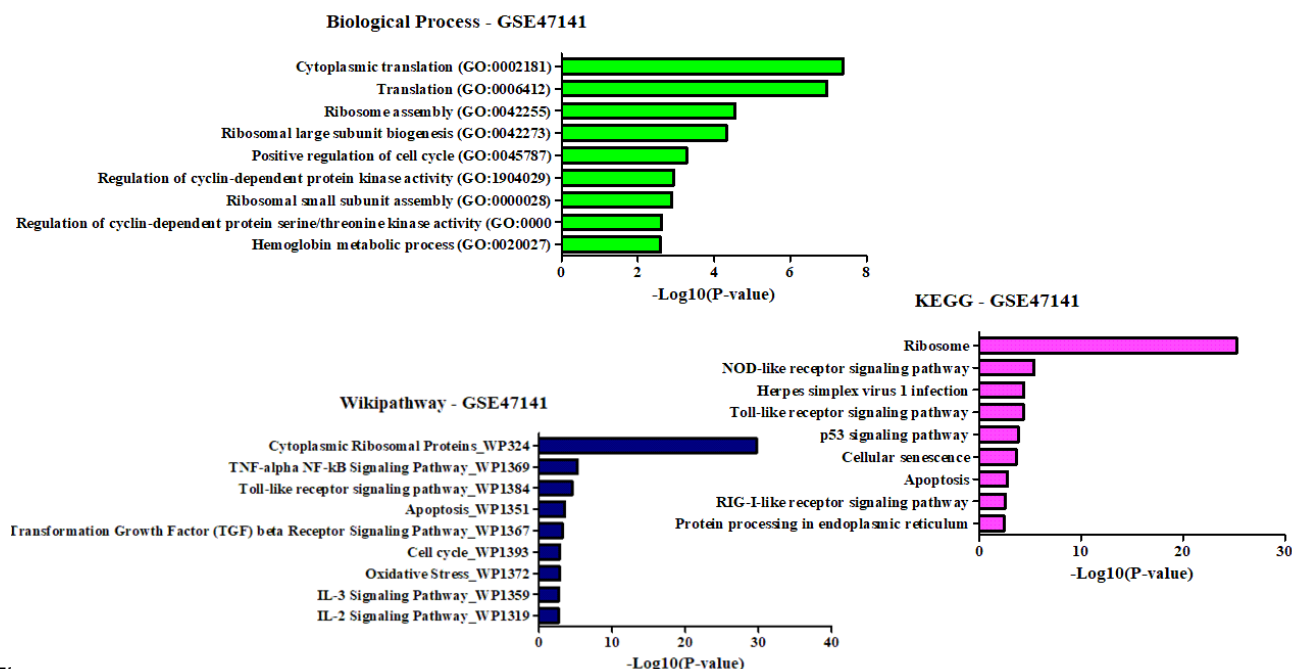


Fig 6. Enriquecimento de vias do *dataset* GSE47141 considerando três bibliotecas distintas: *Biological Process* (verde), *KEGG* (rosa) e *Wikipathway* (azul). Os valores de enriquecimento de cada termo estão representados como $-\text{Log}_{10}(\text{P-value})$, considerando $p < 0.05$.

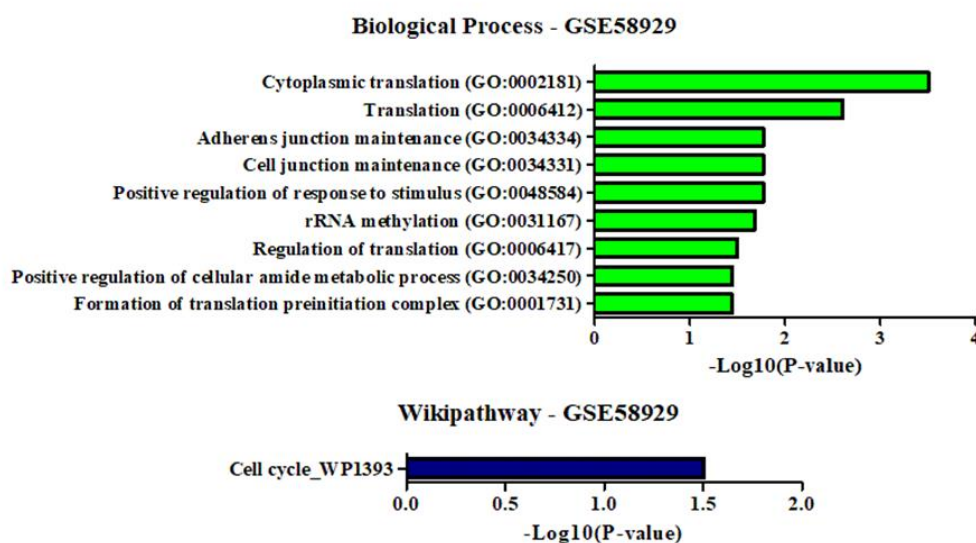


Fig 7. Enriquecimento de vias do *dataset* GSE58929 considerando duas bibliotecas distintas: *Biological Process* (verde) e *Wikipathway* (azul). Os valores de enriquecimento de cada termo

estão representados como $-\log_{10}(P\text{-value})$, considerando $p < 0.05$. A biblioteca do KEGG não apresentou termos enriquecidos com o valor de significância considerado.

Biological Process - GSE84288

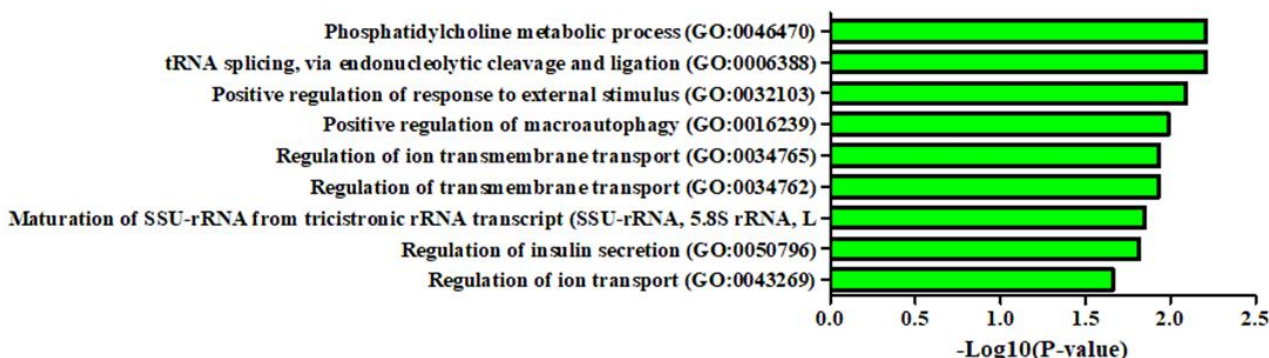


Fig 8. Enriquecimento de vias do *dataset* GSE84288 considerando a biblioteca *Biological Process* (verde). Os valores de enriquecimento de cada termo estão representados como $-\log_{10}(P\text{-value})$, considerando $p < 0.05$. A biblioteca do KEGG e Wikipathway não apresentaram termos enriquecidos com o valor de significância considerado.

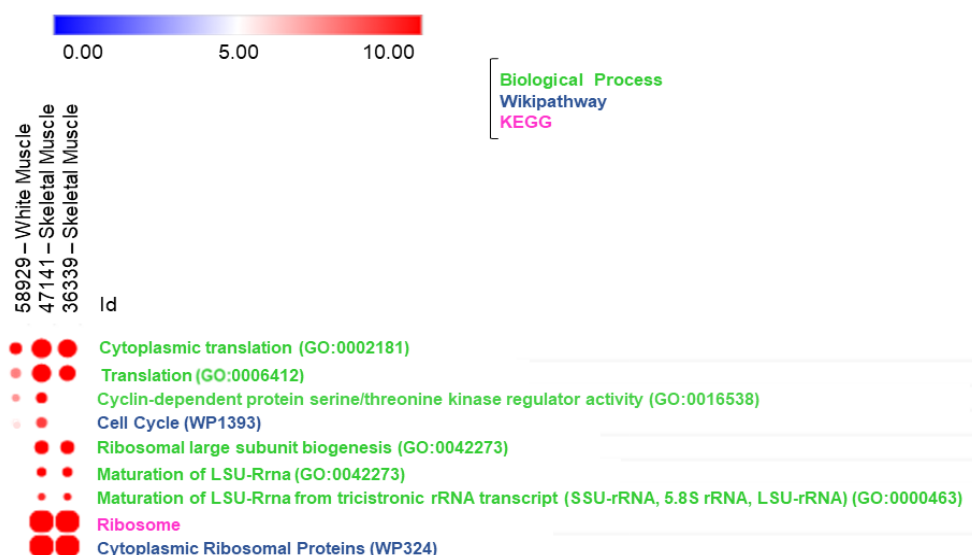


Fig 9. Processos biológicos associados à síntese proteica e proliferação obtidos a partir do enriquecimento de vias de cada *dataset* e considerando as bibliotecas *Biological Process*, *Wikipathway* e KEGG. O gráfico representa esses processos selecionados que foram presentes em pelo menos dois *datasets*. O conjunto de dados GSE84288 não está presente neste gráfico devido ao enriquecimento de vias que, diferentemente dos outros *datasets*, não apresentou o predomínio de processos biológicos associados à síntese proteica e proliferação.

Na rede de interação demonstrada na **Fig 10**, observamos diferentes *clusters* de genes associados ao ciclo celular (na região superior da rede) e às proteínas ribossomais (na região

inferior), demonstrando uma importante interação entre esses dois elementos. Além disso, esses genes foram responsáveis por enriquecer processos biológicos em comum em diferentes espécies submetidas a diferentes tratamentos ou desafios, o que demonstra sua relevância para o músculo esquelético. Tendo em vista que o jejum também é uma condição desafiadora que afeta o tecido muscular, a investigação de alguns genes da rede utilizando esse modelo bem estabelecido em nosso grupo de pesquisa, trouxe resultados interessantes.

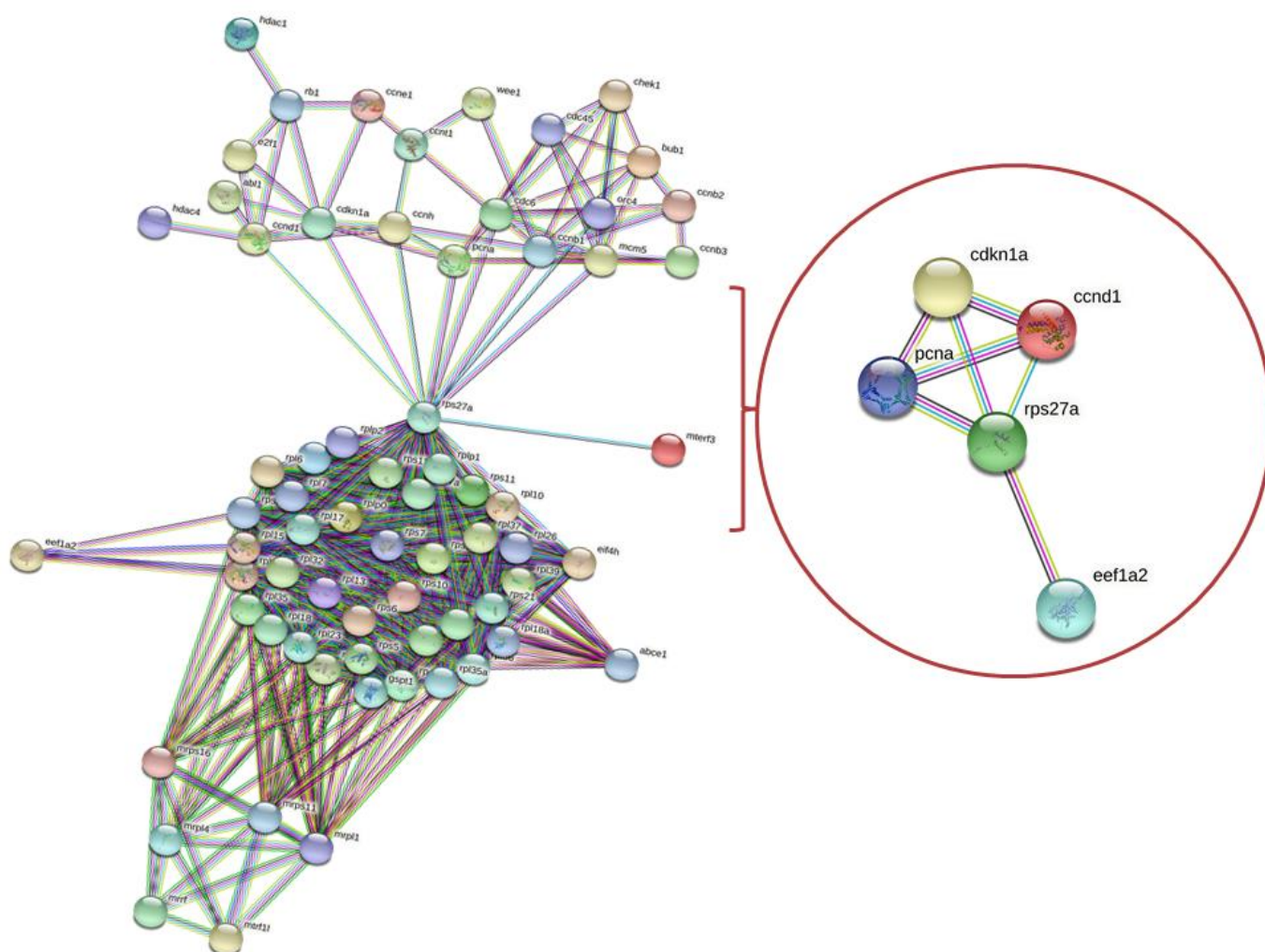


Fig 10. Rede de interação molecular construída a partir dos genes que enriqueceram processos biológicos associados à síntese proteica e proliferação. Na região superior da rede, observam-se genes associados ao ciclo celular. Na porção inferior, estão os genes relacionados aos ribossomos. O círculo em vermelho destaca os genes selecionados para a investigação: *rps27a*, *ccnd1*, *cdkn1a* e *pcna*. Os scores de interação considerados foram 0.9 e 0.7. Os genes do dataset GSE84288 não estão presentes nesta rede.

6.2 Análise de expressão gênica

- Pacus submetidos ao jejum de 4 dias (J4d) e realimentação de 3 dias (R3d)

A avaliação dos períodos mais curtos de jejum e realimentação mostrou o aumento na expressão de *mtor* e *eef1a2* no grupo J4d em relação aos grupos C e R3d, enquanto a expressão da *rps27a* foi reduzida no grupo R3d em comparação ao grupo J4d (**Fig 11**).

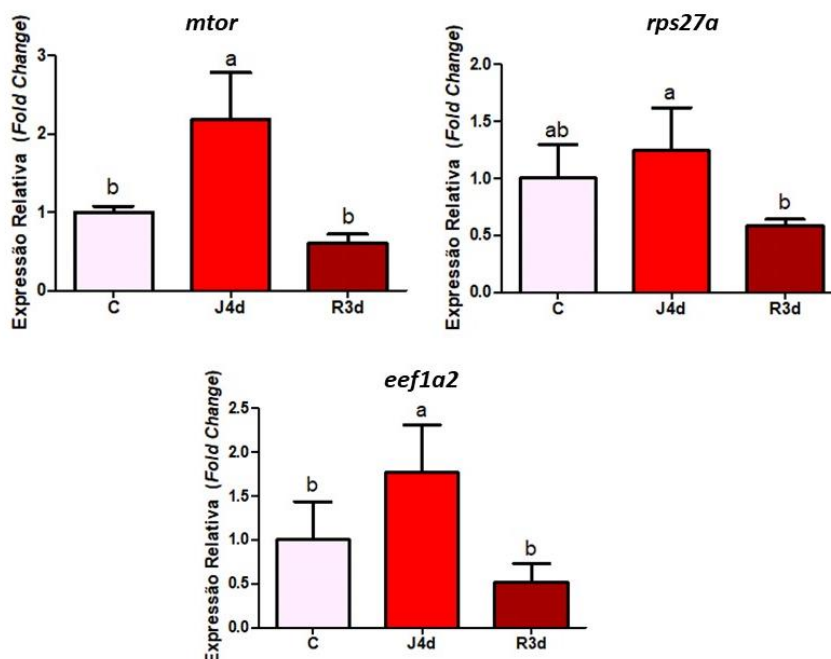


Fig 11. Expressão Relativa (*Fold Change*) do gene anabólico *mtor*, do gene ribossomal *rps27a* e do fator *eef1a2* nos grupos Controle (C), Jejum de 4 dias (J4d) e Realimentação de 3 dias (R3d). Dados representados em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *one way* seguido de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos

Considerando os genes associados ao ciclo celular, foi observada uma redução na expressão da *ccnd1* no grupo R3d, tanto em comparação ao grupo C como ao J4d. A expressão dos genes *cdkn1a* (p21) e *pcna* foi *down-regulada* no grupo R3d em relação ao J4d (**Fig 12**).

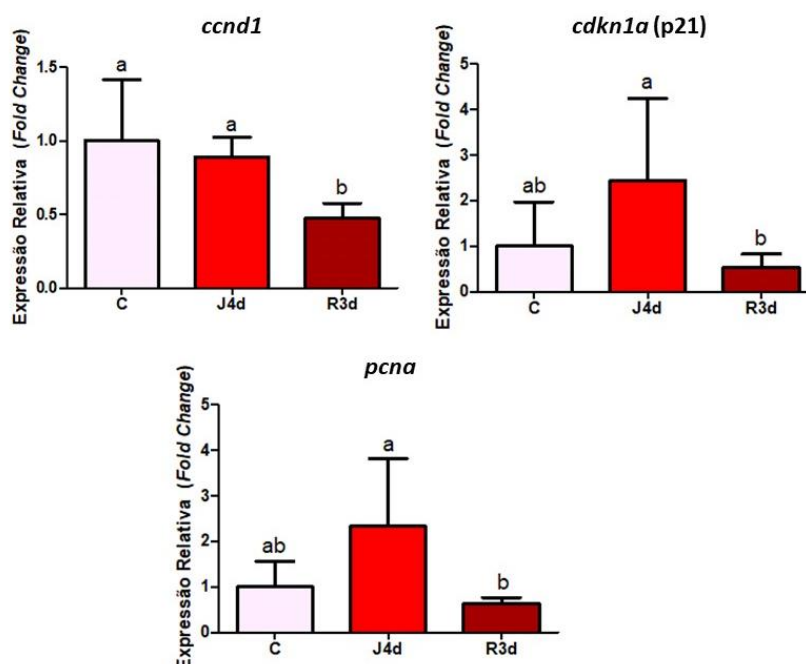


Fig 12. Expressão Relativa de mRNA dos genes de ciclo celular *ccnd1*, da *cdkn1a* e do *pcna* entre os grupos Controle (C), Jejum de 4 dias (J4d) e Realimentação de 3 dias (R3d). Dados representados em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *one way* seguido de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos.

- Pacus submetidos ao jejum de 15 dias (J15d), realimentação de 6 horas (R6h) e 15 dias (R15d)

Tendo em vista os genes relacionados à maquinaria traducional, ao final do período de jejum de 15 dias (J15d), a expressão da mtor manteve-se inalterada em relação ao grupo C. Diferentemente, a expressão da mtor foi reduzida no grupo com a realimentação prolongada, R15d comparado ao grupo R6h. Em relação ao gene ribossomal *rps27a*, houve uma diminuição em sua expressão no grupo R15d comparado ao grupo J15d. Por outro lado, a expressão do fator de alongação eucariótico *eef1a2* não apresentou alteração em sua expressão entre os diferentes grupos (Fig 13).

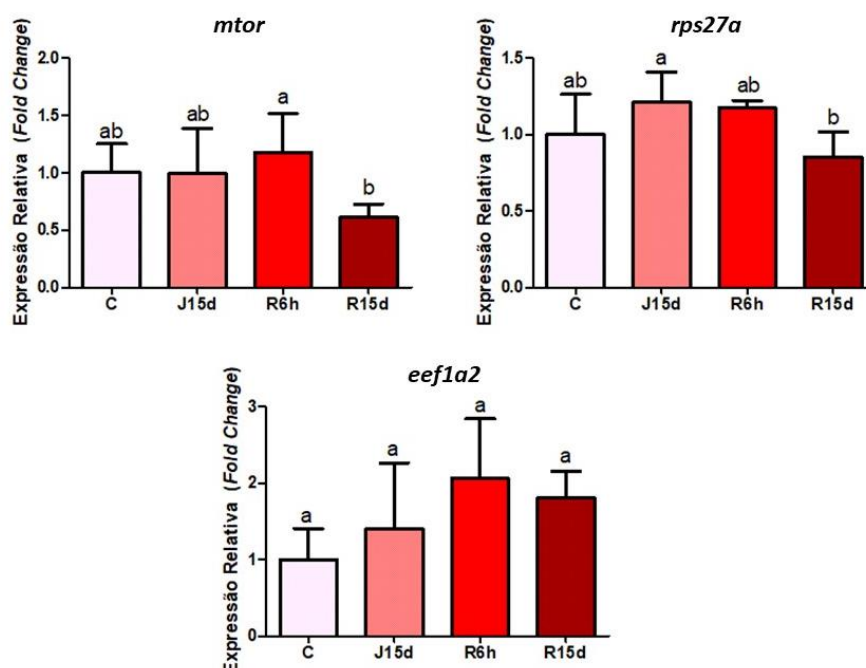


Fig 13. Expressão Relativa (*Fold Change*) do gene anabólico *mtor*, do gene ribossomal *rps27a* e do fator *eef1a2* entre os grupos Controle (C), Jejum de 15 dias (J15d), Realimentação de 6 horas (R6h) e Realimentação de 15 dias (R15d). Dados representados em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *one way* seguido de Tukey ($p < 0,05$) para *mtor* e *rps27a*. Teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p < 0,05$) para o *eef1a2*. Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos.

Em relação aos reguladores do ciclo celular e da replicação, a expressão dos transcritos da *ccnd1* apresentou um aumento no grupo J15d, bem como no grupo R6h, em relação aos grupos C e R15d. Por outro lado, considerando a *cdkn1a* (p21), houve a *down*-regulação em sua expressão tanto no grupo R6h como no grupo R15h, ambos em comparação aos grupos C e J15d. Já em relação ao *pcna*, foi observada uma redução em sua expressão no grupo R15d em relação aos grupos J15d e R6h (**Fig 14**).

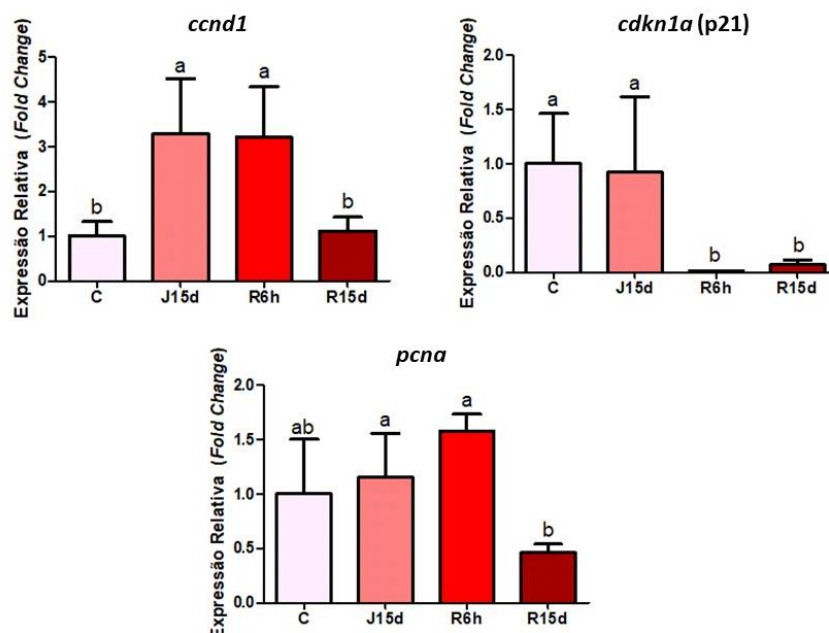


Fig 14. Expressão Relativa de mRNA dos genes de ciclo celular *ccnd1*, da *cdkn1a* e do *pcna* entre os grupos Controle (C), Jejum de 15 dias (J15d), Realimentação de 6 horas (R6h) e Realimentação de 15 dias (R15d). Dados representados em média $\pm$ DP. Teste ANOVA *one way* seguido de Tukey ($p < 0,05$). Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos.

7. DISCUSSÃO

Nossos resultados *in silico* demonstraram e reforçam a importante interação entre genes ribossomais, dentre eles *rps27a* e alguns reguladores do ciclo celular e da replicação, como a *ccnd1*, *cdkn1a* (p21) e o *pcna*. Além desses, em nossa rede ainda destacamos o *eef1a2* como um importante gene associado ao transporte de aminoacil-tRNA para os ribossomos, e ainda pouco explorado no músculo esquelético. Esses genes selecionados, juntamente à *mtor*, foram investigados em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos ao jejum de 4 e 15 dias, bem como à realimentação de 6 horas, 3 dias e 15 dias. Os respectivos períodos foram escolhidos com intuito de avaliar os efeitos da privação e disponibilidade de alimento em um período curto e mais longo, seguidos de períodos de realimentação.

A relação ribossomo e ciclo-celular obtida em nosso estudo, embora ainda não totalmente compreendida, foi descrita por Nosrati et al., 2015. Esses autores definiram a expressão gênica das RPs (*Ribosomal Proteins*) como sendo induzida do meio para o final da fase G1 do ciclo celular, um mecanismo que garante RPs e ribossomos para a proliferação e crescimento celular. Essa associação se torna ainda mais clara quando consideramos que proteínas ribossomais se comunicam com o ciclo celular sob condições desfavoráveis à proliferação, como a baixa disponibilidade de nutrientes. Esse fator, entre outros, desencadeia o estresse ribossomal/nucleolar

785 caracterizado pela desestabilização do nucléolo e interrupção da síntese de novos ribossomos, o
786 que promove alterações na fisiologia celular, como a parada da divisão (Xu et al., 2016). É nesse
787 sentido, inclusive, que avaliamos o efeito do jejum e realimentação sobre a expressão de
788 reguladores e componentes da maquinaria traducional, da transcrição e da replicação com
789 implicações no crescimento muscular dos peixes.

790 A biogênese ribossomal é responsável pela síntese dos ribossomos, incluindo suas RPs e
791 rRNAs (RNAs ribossomais), cujo processo requer um fino controle e grande aporte energético, se
792 iniciando a partir da formação do Complexo PIC de transcrição do rDNA (**Fig 15**) (revisado por
793 Tollervey & Fatica 2002). Atuando nesse processo, o alvo mecanístico de rapamicina quinase
794 (mTOR), é essencial à biogênese de ribossomos atuando tanto através da modulação da ativação
795 da proteína ribossômica S6 quinase de 70 kDa (S6K-1/p70S6K), associada à tradução de RPs,
796 como através da modulação da síntese de rRNA (RNA ribossomal) (**Fig 15**). A inibição de mTOR
797 promove a repressão da transcrição de genes que codificam RPs, considerando que os fatores de
798 transcrição associados ao promotor do gene dessas proteínas, atuam de maneira mTOR-
799 dependente durante condições pró-crescimento. Em adição a essas funções, a mTOR exerce um
800 papel central na conexão entre o *status* nutricional/energético das células e a biogênese ribossomal
801 por estar associada ao promotor do rDNA (**Fig 15**) (revisado por Figueiredo & McCarthy, 2019;
802 Kusnadi et al., 2015; Von Walden, 2019). Essa importante conexão entre a disponibilidade de
803 alimento e a síntese de ribossomos realizada por essa proteína, já foi descrita em inúmeros estudos
804 com o músculo esquelético de roedores, mas ainda não caracterizada nos peixes sendo,
805 possivelmente, um processo conservado entre os vertebrados (Tsang et al., 2011; Von Walden et
806 al., 2016). Nesse sentido, embora não tenhamos avaliado a expressão de rRNAs maduros como
807 5.8S, 18S e 28S ou de outros componentes do Complexo PIC, a *up*-regulação do transcrito de *mtor*
808 no grupo J4d pode indicar que durante esse período inicial de jejum, ocorre a manutenção da
809 capacidade traducional celular que é definida como o número de ribossomos presentes no tecido
810 (Bigard, 2018). Essa manutenção pode ser vista como um dos mecanismos que sustenta a
811 população ribossomal e a síntese proteica durante o estresse desencadeado pelo jejum, tendo em
812 vista as funções dessa proteína na tradução de RPs e produção de rRNA, componentes sintetizados
813 de modo estequiométrico (Cardenas et al. 1999; Jorgensen et al. 2004; Marion et al. 2004;
814 Schawalder et al. 2004; Rudra et al., 2005). Apesar de nenhum estudo em peixes ter associado a
815 expressão de *mtor* à biogênese ribossomal, o aumento na expressão desse gene também foi
816 observado por alguns autores no músculo esquelético sob condições catabólicas. Em *pacus*
817 (*P.mesopotamicus*) submetidos ao jejum de 10 dias, De Paula et al., 2016 constataram um aumento
818 na expressão do complexo mTORC1 (*mtor* e *raptor*), conhecido também como um modulador da

eficiência traducional a qual se refere à quantidade de proteína traduzida por unidade de mRNA. De modo semelhante Duran et al., 2021 que avaliaram a mesma espécie sob o jejum de 4 dias, observaram um aumento na expressão de *igf2*, bem como de *ricor*, um componente do complexo mTORC2. Resultados similares foram encontrados na musculatura de urso preto (*Ursus thibetanus japonicus*) durante o período de hibernação, em que houve a ativação de mTOR (Miyazaki et al., 2019). Além da possível associação com a manutenção da capacidade traducional, esses autores discutem que durante a restrição alimentar, a ativação da *mtor* é vista como uma medida protetora do tecido, responsável por ativar a síntese proteica a partir de aminoácidos provenientes do catabolismo muscular. Desta forma, é possível que esse processo ocorra até que haja o reestabelecimento alimentar, como observado comparando os grupos J4d e R3d; R6d e R15d, nos quais houve a redução da expressão da *mtor* frente a disponibilidade de nutrientes.

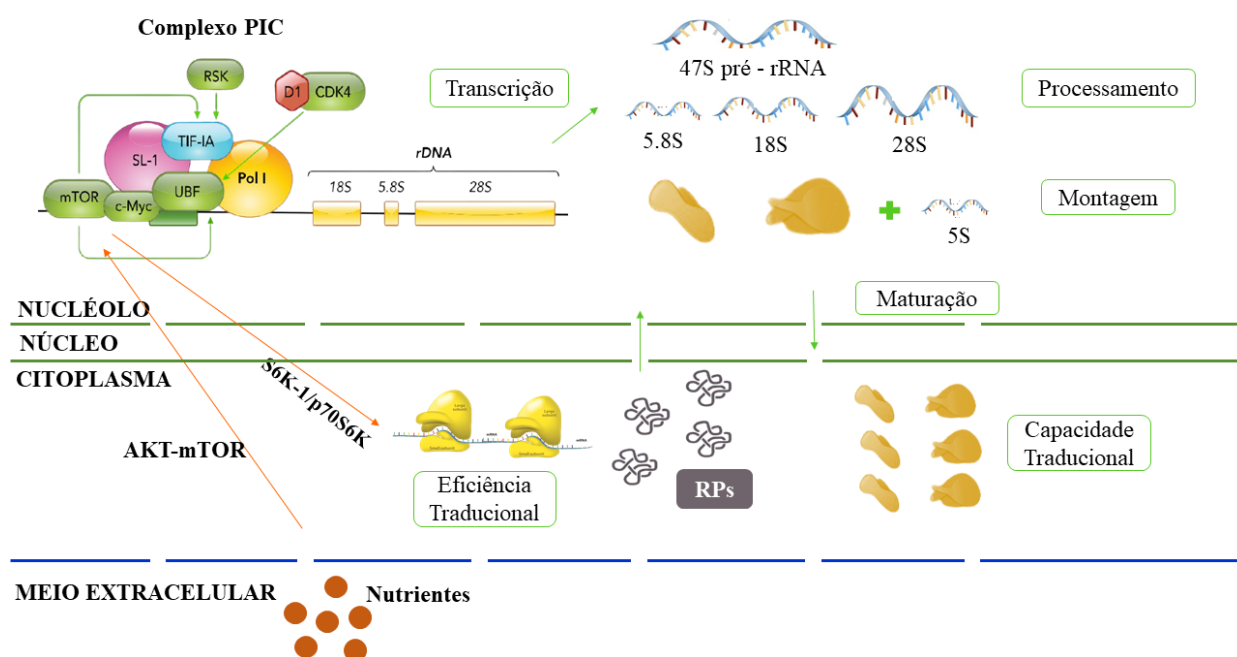


Fig 15. Etapas da Biogênese Ribossomal. Destaque para o Complexo PIC montado no promotor do rDNA que permite a transcrição do rDNA em rRNA e RPs. Dentre os componentes desse complexo, a mTOR exerce a comunicação entre o *status* nutricional das células e a síntese *de novo* de ribossomos. Nesse processo, a capacidade traducional se refere à quantidade de ribossomos nos tecidos e a eficiência traducional é definida como a quantidade de proteínas traduzidas por unidade de mRNA. Baseado em Figueiredo & McCarthy, 2019.

Curiosamente, a expressão transcricional da proteína ribossomal *rps27a* apresentou um comportamento semelhante à de *mtor*, tanto comparando os grupos J4d à R3d, como J15d à R15d. Ambas as subunidades ribossomais, grande (60S) e pequena (40S), são compostas por inúmeras RPs, entre as quais a *rps27a* que juntamente aos rRNAs, formam os ribossomos. Esses dois

843 elementos são codificados pelo rDNA cujas sequências são organizadas em tandem nas regiões
844 organizadoras do nucléolo (NOR – *Nucleolar Organizing Regions*). Nas fibras musculares
845 esqueléticas, as quais apresentam alta atividade sintética, são encontradas numerosas NORs que
846 demonstram a importância dos ribossomos para esse tecido (Goldberg, 1968). Nesse contexto,
847 além de compor o arcabouço ribossomal, a *rps27a* também atua na comunicação de estresse
848 nucleolar ao ciclo celular (Wang et al. 2016). Ainda não existem estudos que avaliam o efeito do
849 jejum e realimentação na expressão de *rps27a* especificamente, mas alguns autores descrevem que
850 alterações na disponibilidade de carbono, aminoácidos e cAMP modificam a transcrição das RPs
851 de modo geral, em leveduras (Herruer et al., 1987; Moehle & Hinnebusch, 1991; Neuman-
852 Silberberg et al., 1995). Nosso estudo porém, que avaliou o tecido muscular de peixe, não
853 constatou alterações comparando os grupos C, J4d e J15d. Esse dado se assemelha aos achados de
854 Bhat et al., 2004 no quais os autores constataram que em fibroblastos submetidos à *starvation*, os
855 níveis transcricionais e proteicos de RPL11 também foram inalterados em relação ao controle.
856 Apesar dessa não alteração da RP, os autores a descrevem como sendo abundante nas células
857 avaliadas e que, sob a condição de restrição nutricional, a RPL11 exerce a função de comunicação
858 do estresse nucleolar/ribossomal ao ciclo celular, desencadeando sua parada e redução na síntese
859 ribossomal (Bhat et al. 2004). De modo semelhante, durante a análise por RT-qPCR da *rps27a*
860 (ciclo de amplificação em torno de X) em nosso estudo, seus fragmentos de cDNA foram
861 rapidamente amplificados nos grupos avaliados, indicando que esse gene ribossomal também
862 possui abundância no tecido muscular considerando, inclusive, suas múltiplas NORs. Por outro
863 lado, comparando os grupos J4d à R3d e J15d à R15d, foi possível observar uma redução na
864 expressão dessa RP nos grupos realimentados. Esse dado pode ser relacionado ao
865 reestabelecimento da disponibilidade de nutrientes para as fibras musculares e à redução da
866 condição de estresse celular. Além disso, a alteração transcricional de *rps27a* demonstra que os
867 genes ribossomais, conhecidos como genes constitutivos, sofrem alterações em determinadas
868 condições experimentais (Thorrez et al., 2008). Nesse contexto em que a falta de nutrientes
869 promove estresse e prejudica a biogênese ribossomal, segundo Morrissey et al., 1976, durante a
870 privação de histidina em *E.coli* nenhum ribossomo é sintetizado. Similarmente, (Hirsch & Hiatt,
871 1966), descreveram a diminuição da síntese RPs e rRNA no fígado de ratos submetidos ao jejum.
872 No músculo esquelético desse mesmo modelo submetido à desnutrição proteica, (Young & Alexis,
873 1968) constataram a diminuição do RNA total no tecido, o que indica a diminuição na capacidade
874 traducional das células, haja vista que mais de 75% do RNA total corresponde à rRNA (revisado
875 por Figueiredo & McCarthy, 2019). Por outro lado, em relação à realimentação em peixes, segundo
876 Lied et al., 1983, o conteúdo de rRNA no músculo esquelético de bacalhaus (*Gadus morhua*)

realimentados 4 horas, 8 horas e 12 horas após o jejum de 8 dias, é recuperado em 88%, 97% e 103%, respectivamente, em relação ao conteúdo normal dessa molécula. Dados semelhantes são encontrados em células de *Tetrahymena* submetidas ao jejum e que apresentaram aumento na síntese de inúmeras RPs avaliadas, durante a realimentação (Erion et al., 1981). Desta maneira, a disponibilidade de nutrientes reduziu a expressão da *rps27a* a qual está associada à sinalização do estresse nucleolar (Sun et al., 2011; Nosrati et al., 2015) diante do jejum e, conseqüentemente, à sinalização acerca das condições pró-biogênese ribossomal e proliferação celular, cujos reguladores também foram avaliados por este estudo.

Considerando ainda a maquinaria de síntese proteica, o *eef1a* é um importante gene cuja função canônica é associada ao transporte de aminoacil-tRNA para o sítio A dos ribossomos atuando, assim, na elongação da cadeia peptídica durante a síntese proteica (Li et al. 2010). Em *zebrafish*, devido à duplicação do genoma, o gene *eef1a* possui *eef1a1l1*, *eef1a1a*, *eef1a1b* e *eef1a2* como parálogos, os quais são expressos de maneira específica ao longo do desenvolvimento. *Eef1a2* é a isoforma expressa exclusivamente nos neurônios e músculos, na maioria dos vertebrados, em que ao nascimento apresenta baixos níveis e no período pós-embrionário possui alta expressão, tanto em mamíferos como em *zebrafish* (Idigo et al., 2020). No músculo esquelético, esse gene é associado à exacerbada diminuição da massa muscular quando ocorre a perda de sua função em mamíferos além de, recentemente, ter sido descrito como um importante fator que atua na manutenção da estrutura da fibra muscular (Péladeau et al. 2020). Nessa mesma linha, Cao et al., 2017 e Idigo et al., 2020 descreveram que a ausência de alguns parálogos de *eef1a* em *zebrafish* prejudica o fenótipo de tecidos, como o músculo esquelético, nessa espécie. Porém, ainda são escassos os estudos que avaliam diretamente a relação de *eef1a2* à fisiologia muscular. Nesse ponto, inclusive, tampouco existem estudos que relacionam *eef1a2* ao tecido muscular submetido ao jejum e à realimentação. Dessa maneira, nosso estudo avaliou pela primeira vez a expressão desse gene sob tais condições experimentais, constatando o aumento na expressão de *eef1a2* no grupo J4d comparado aos grupos C e R3d. Com base na função canônica deste gene, é possível que o aumento em sua expressão durante o jejum esteja associado à maximização de sua atividade na elongação das cadeias polipeptídicas. Esse aumento, por sua vez, pode significar uma medida que otimiza a síntese proteica basal no músculo, a partir de aminoácidos provenientes do catabolismo muscular, constatado pela expressão de *fbxo32* analisado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Duran et al., 2021). A redução na expressão desse gene durante a realimentação de 3 dias, a um nível semelhante ao do grupo controle, pode indicar que quando a disponibilidade de nutrientes é retomada ocorre a reversão desse mecanismo possivelmente relevante à sobrevivência das células durante o estresse, reforçando a hipótese levantada a partir da expressão

dos genes *mtor* e *rps27a* de uma priorização da manutenção do tecido frente ao desafio promovido pelo período de jejum. Diferentemente, as comparações entre os grupos J15d, R6h e R15d não demonstraram alterações significativas. Porém, é possível notar um comportamento similar entre a expressão de *eef1a2* nesses grupos submetidos a períodos mais longos de jejum e realimentação, comparados aos períodos mais curtos dos mesmos tratamentos. Nesse contexto, é possível que essa não alteração demonstre o papel de *eef1a2* na adaptação inicial ao jejum e realimentação, considerando a normalização da sua expressão em períodos mais longos dos mesmos tratamentos, bem como a ativação de vias específicas que atuam no balanço entre catabolismo e anabolismo muscular ao longo dessas condições (McCarthy & Esser, 2011). Além desse aspecto metabólico, cabe destacar o papel essencial desse gene na manutenção da morfologia e, portanto, na função das fibras musculares, como demonstrado por Péladeau et al., 2020 em que alterações drásticas na expressão de *eef1a2* comprometem profundamente o fenótipo do tecido muscular.

Nesse cenário em que a redução e o reestabelecimento de nutrientes podem afetar a maquinaria traducional com implicação no ciclo celular, a avaliação de genes reguladores da proliferação e transcrição também foi realizada. O processo de divisão celular é conduzido pelos complexos CDKs-ciclinas em que as ciclinas são as unidades regulatórias das CDKs e são sintetizadas e degradadas ao longo do ciclo celular (Kobayashi et al. 2020). Sobre as ciclinas do grupo D (D1, D2, D3), elas compõem alguns desses complexos associados à CDK4/6 que são requeridos ao longo da fase G1, na transição de G1 para S e no início da mitose. Mais especificamente sobre a ciclina D1 (*ccnd1*), essa proteína é considerada um sensor de fatores de crescimento que promove a conexão entre a sinalização do meio extracelular e o ciclo celular, apresentando variações em sua expressão e localização subcelular ao longo da divisão das células (Yang et al., 2006). Nessa linha, estudos *in vitro* com células em proliferação assíncrona, têm avaliado a variabilidade nos níveis proteicos de ciclina D1 ao longo do ciclo celular, sendo descritos altos níveis durante G1 e G2. O aumento de CCND1 durante a fase G2 é obrigatoriamente associado às condições pró-crescimento, tendo em vista que essa fase é decisiva para o comprometimento com a divisão celular. Por outro lado, a diminuição de CCND1 em de G1 para S é associada à instabilidade de sua proteína e degradação pelo sistema proteossoma, sendo necessários, obrigatoriamente, baixos níveis de ciclina D1 para que ocorra a síntese do DNA (**Fig 16**) (Yang et al., 2006).

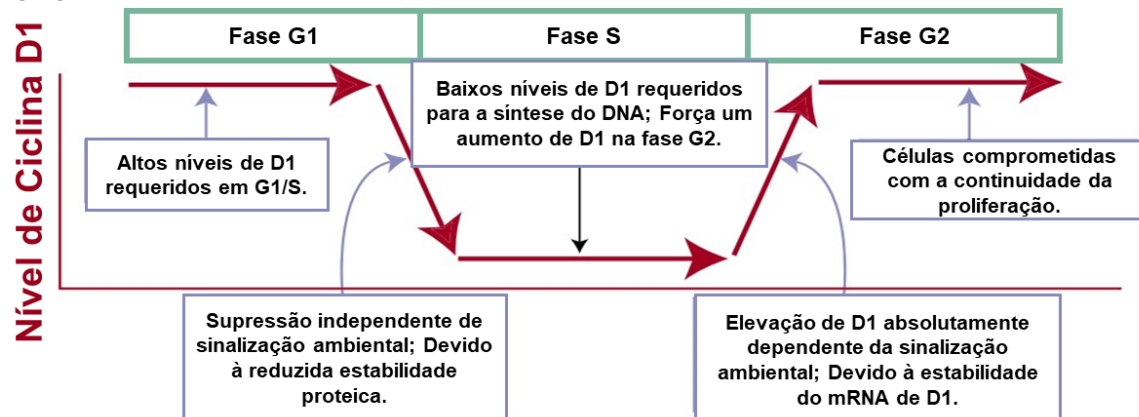


Fig 16. Variação dos níveis de ciclina D1 ao longo do ciclo celular. Destaque para a redução da expressão dessa ciclina na transição G1/S que permite a síntese do DNA e para o aumento da ciclina D1 em S/G2 necessariamente dependente da sinalização ambiental. Adaptado de Yang et al., 2006.

Nossos resultados demonstraram uma importante redução na expressão de *ccnd1* considerando o grupo R3d em comparação ao grupo J4d. Por outro lado, altos níveis de *ccnd1* foram identificados nos grupos J15d e R6h em relação aos grupos C e R15d. Considerando esses dados, Nader et al., 2005 descreveram que durante a ausência de proliferação um aumento nos níveis proteicos de *ccnd1* também é encontrado em miotubos hipertróficos de ratos, sendo essa elevação associada a sua ativação via mtor. Além dessa conexão com a manutenção proteica muscular, o aumento na expressão de *ccnd1* no grupo (J15d) submetido ao jejum e posteriormente à realimentação (R6h), pode representar uma importante medida poupadora de energia e substratos no músculo esquelético dos peixes. Isso se deve aos altos níveis de ciclina D1 os quais impedem a síntese de DNA e atrasam progressão do ciclo celular durante a fase G1, assim como ocorre em células humanas senis (Kobayashi & Mitsui, 1999). Esse bloqueio do ciclo celular através da *ccnd1*, pode comprometer processos proliferativos que são requeridos durante o crescimento muscular dos peixes. Por outro lado, a redução progressiva dos altos níveis dessa ciclina encontrados a partir da realimentação, tanto no período curto (R3d) quanto longo (R15d), podem estar associados ao reestabelecimento nutricional e à continuidade do ciclo celular, permitindo que o crescimento muscular seja retomado. Tendo em vista ainda os altos níveis de *ccnd1* encontrados durante o jejum, segundo Celis et al., 1988 a inibição da síntese do DNA na presença de altos níveis de CCND1 ocorre através da sua interação com o PCNA, também avaliado por este estudo. Considerando esse gene, foi obtida uma redução nos níveis do transcrito de *pcna* no grupo R3d comparado ao grupo J4d, assim como no grupo R15d em relação ao grupo J15d. O PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) é responsável por envolver a dupla fita do DNA e organizar sua síntese na forquilha de replicação (Stukenberg et al., 1991), atuando como um fator de

processividade para as DNA polimerases (Cheng-Keat Tan et al. 1986). Entretanto, considerando que durante o jejum não ocorre proliferação celular como demonstrado por, Zanella et al., 2021, Lavajoo et al., 2020 e García de la serrana et al., 2014 no músculo esquelético de peixes, é importante considerar a função não canônica do *pcna* no reparo do DNA em períodos de estresse, haja vista a redução em sua expressão durante a realimentação. Segundo Rodríguez-Vargas et al. 2012, durante o estresse nutricional, as células ativam o programa autofágico em que este processo pode desencadear a adaptação à condição estressora ou morte celular. Nesse contexto, associado à autofagia induzida por jejum, o dano ao DNA é um processo inicial que ocorre devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) as quais também podem danificar lipídeos de membrana, proteínas e ainda afetar a função muscular (Cejas et al. 2004; Powers et al. 2011). Considerando o músculo esquelético, além de um aparato intrínseco que garante a proteção contra as ROS (Powers et al., 2011) algumas estratégias, como a suplementação com ácido ascórbico, podem melhorar o crescimento e recuperação do tecido de peixes durante o jejum (Zanella et al., 2021). Entretanto, até o momento não há estudos que descrevam o mecanismo de ação do *pcna* contra o estresse oxidativo induzido por jejum, embora indícios desse papel funcional foram descritos por Mao et al., 2017 que constataram a alta expressão de PCNA em miotubos de ratos, submetidos ao estresse oxidativo. Nessa linha e considerando a já descrita função do PCNA no reparo do DNA (Essers et al., 2005), os altos níveis de *pcna* nos grupos C e que foram mantidos nos grupos J4d e J15d, sugerem a importante função protetora desse gene durante a perda de massa muscular acompanhada pelo estresse oxidativo, assim como observado em células intestinais de ratos submetidas ao jejum (Sokolović et al., 2007). Essa modulação transcricional é revertida quando a disponibilidade de nutrientes é reestabelecida nos grupos realimentados, contribuindo com a recuperação do tecido muscular dos peixes após o período de estresse.

Ainda sobre o ciclo celular, uma importante redução nos níveis de p21 foi encontrada no grupo R3d em relação ao grupo J4d, assim como nos grupos R6h e R15d comparados aos grupos C e J15d. A p21, codificada pelo gene *cdkn1a* (*Cyclin 1A-dependent kinase inhibitor*), é um importante inibidor da proliferação que atua através do bloqueio da transição de G1/S e G2/M do ciclo por meio da interação com CDKs (Karimian et al, 2016). Além dessa importante função, a p21 atua na sobrevivência celular de modo dependente e independente de p53, em que estudos *in vitro* têm demonstrado o aumento da proteína de p21 durante o jejum como um mecanismo protetor que retarda a morte de células de câncer colorretal (Braun et al., 2011). Ainda sobre esse estudo de Braun et al., 2011, a restrição alimentar *in vitro* afetou *cdkn1a* em nível proteico, mas não em nível do transcrito desse gene (Braun et al. 2011). Por outro lado, o aumento de *cdkn1a* em nível

transcricional e proteico foi observado por Guadamillas et al., 2016. Esses autores descreveram que o mRNA de p21 foi altamente expresso tanto no fígado, como no músculo esquelético de ratos submetidos ao jejum de 24h e 48h. Além disso, este estudo de 2016 define que a p21 atua como um regulador positivo de PPAR α , um importante fator de transcrição que orquestra inúmeros aspectos da adaptação ao jejum, incluindo a oxidação de ácidos graxos e cetogênese ((Pawlak et al., 2015; Wahli & Michalik, 2012). Apesar de não termos encontrado diferenças entre os grupos controle e jejum em relação à p21, os dados da literatura corroboram em parte os resultados encontrados por este estudo, os quais demonstram a importante redução dos níveis de p21 durante a realimentação. Nesse contexto, é descrito na literatura que ratos deficientes em p21 apresentam aumento da morbidade, através do exacerbado gasto energético, rápido esgotamento dos estoques lipídicos, bem como catabolismo muscular prematuro durante o jejum (Guadamillas et al., 2016). Considerando tais funções de p21, a manutenção dos altos níveis desse gene nos grupos J4d e J15d, semelhantes aos níveis do grupo controle, pode estar associada a uma medida adaptativa à restrição alimentar, tendo em vista que durante a realimentação, em que os nutrientes estão novamente disponíveis para as fibras musculares, a expressão transcricional de p21 alcança níveis muito baixos. Em conjunto a esses dados é relevante para este estudo associar as vias metabólicas sensíveis aos nutrientes com a regulação de p21. Nessa linha, a via PI3K-AKT-mTOR contribui significativamente para a regulação desse inibidor de CDK. O IGF1 é um importante fator *upstream* que além de atuar no crescimento muscular, também atua na sobrevivência celular. Segundo Lawlor & Rotwein, 2000 que avaliaram mioblastos de ratos em diferenciação, o mecanismo de ação de IGF-1 na sobrevivência da célula ocorre através da ativação de p21 de modo AKT-dependente, em que AKT é uma importante proteína ativada através de PI3K. Os mesmos autores constataram que a incubação de mioblastos com IGF-1 resulta em aumento do conteúdo proteico e na abundância do mRNA de p21. Sobre PI3K e mTOR, a inibição desses dois componentes em células de câncer hepático reduziu quase completamente os níveis transcricionais de p21 dependentes de *starvation*. Considerando que no grupo J4d foi observada a *up*-regulação de *mtor* seguida de sua *down*-regulação no grupo R3d, assim como no grupo R15d, é possível que os níveis de expressão desse fator também influencie os níveis de p21 nessa mesma comparação.

8. CONCLUSÕES

A meta-análise realizada por este estudo identificou a importante interação entre ribossomos e ciclo celular, bem como os genes responsáveis por integrar esses componentes celulares. A partir dos alvos selecionados para a investigação em pacus (*P.mesopotamicus*), foi observada a importância desses genes na manutenção de processos chave associados à

sobrevivência e à fisiologia das fibras musculares, em que estratégias são adotadas baseadas no *status* nutricional das células. Tais estratégias incluem modulações transcricionais distintas nos períodos curtos e mais prolongados de jejum e realimentação, as quais incluem a manutenção da capacidade traducional sustentada pela biogênese dos ribossomos, a otimização da polimerização das cadeias polipeptídicas durante a tradução e o reparo do tecido diante do estresse oxidativo. Além disso, alterações ribossomais possuem implicações no ciclo celular cuja expressão de seus reguladores é modulada frente à redução e ao reestabelecimento das condições pró-proliferação. Em conjunto, nossos resultados podem fornecer suporte aos estudos recentes que avaliam a importância dos ribossomos e do ciclo celular no tecido muscular e, ainda, nos peixes, um grupo experimental em que o crescimento muscular desperta o interesse de pesquisadores em diversas áreas, inclusive do setor produtivo. Além disso, nosso estudo acrescenta à área da biologia muscular fornecendo novos possíveis marcadores relacionados à adaptação das fibras musculares à condição de escassez nutricional e ao reestabelecimento dos nutrientes, visando os processos proliferativos os quais são essenciais ao crescimento muscular.

9. REFERÊNCIAS

- A. M. Møller, P. S. Myles. 2016. "What Makes a Good Systematic Review and Meta- Analysis ?" *British Journal Of Anaesthesia* 117 (4): 428–30. <https://doi.org/10.1093/bja/aew264>.
- Ahammad, A K Shakur, Shuichi Asakawa, Shugo Watabe, and Shigeharu Kinoshita. 2015. "Regulation of Gene Expression Mediating Indeterminate Muscle Growth in Teleosts." *Mechanisms of Development* 137: 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.02.006>.
- Ahammad, A K Shakur, Saltuk Bugrahan, and Hamid Ceylan. 2019. "Multiple Transcription Factors Mediating the Expressional Regulation of Myosin Heavy Chain Gene Involved in the Indeterminate Muscle Growth of Fish." *Gene* 687 (August 2018): 308–18. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.040>.
- Alex S Flynt, Nan Li, Elizabeth J Thatcher, Lilianna Solnica-Krezel & James G Patton. 2014. "Zebrafish MiR-214 Modulates Hedgehog Signaling to Specify Muscle Cell Fate." *Nature Genetics* 23 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/ng1953.Zebrafish>.
- Altair Albuquerque. 2018. "Anuário Brasileiro Da Piscicultura Peixe BR 2018." *Peixe BR - Associação Brasileira Da Piscicultura*, 138.
- Bentzinger, C. Florian, Yu Xin Wang, and Michael A. Rudnicki. 2012. "Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (2) 1-16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008342>.
- Bertoni, Natália, Lied M.S. Pereira, Fábio E. Severino, Regina Moura, Winston B. Yoshida, and

- 1072 Patricia P. Reis. 2016. "Integrative Meta-Analysis Identifies MicroRNA-Regulated Networks in
1073 Infantile Hemangioma." *BMC Medical Genetics* 17 (1): 1–11. [https://doi.org/10.1186/s12881-](https://doi.org/10.1186/s12881-015-0262-2)
1074 015-0262-2.
- 1075 Bhat, Krishna P., Koji Itahana, Aiwen Jin, and Yanping Zhang. 2004. "Essential Role of
1076 Ribosomal Protein L11 in Mediating Growth Inhibition-Induced P53 Activation." *EMBO Journal*
1077 23 (12): 2402–12. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600247>.
- 1078 Biga, P R, and F W Goetz. 2006. "Zebrafish and Giant Danio as Models for Muscle Growth :
1079 Determinate vs . Indeterminate Growth as Determined by Morphometric Analysis," *The American*
1080 *Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1327–37.
1081 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00905.2005>.
- 1082 Bigard, Xavier. 2018. "Adaptation of Skeletal Muscle Mass and Metabolism to Physical Exercise.
1083 Nutrition and Skeletal Muscle." *Nutrition and Skeletal Muscle*. 47-61.
1084 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810422-4.00004-X>.
- 1085 Blagden, Chris S, Peter D Currie, Philip W Ingham, and Simon M Hughes. 1997. "Notochord
1086 Induction of Zebrafish Slow Muscle Mediated by Sonic Hedgehog." *Genes & Development* 11:
1087 2163–75.
- 1088 Braun, Frédérique, Joséphine Bertin-Ciftci, Anne Sophie Gallouet, Julie Millour, and Philippe
1089 Juin. 2011. "Serum-Nutrient Starvation Induces Cell Death Mediated by Bax and Puma That Is
1090 Counteracted by P21 and Unmasked by Bcl-x L Inhibition." *PLoS ONE* 6 (8): 1-11.
1091 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023577>.
- 1092 Caldusch-giner, Josep A, Yann Echassieriau, Diego Crespo, Daniel Baron, Josep V Planas, Patrick
1093 Prunet, and Jaume Pérez-sánchez. 2014. "Transcriptional Assessment by Microarray Analysis and
1094 Large-Scale Meta-Analysis of the Metabolic Capacity of Cardiac and Skeletal Muscle Tissues to
1095 Cope With Reduced Nutrient Availability in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata L.*)." *Marine*
1096 *Biotechnology* 423–35. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9562-3>.
- 1097 Cao, Siqi, Laura L. Smith, Sergio R. Padilla-Lopez, Brandon S. Guida, Elizabeth Blume, Jiahai
1098 Shi, Sarah U. Morton, et al. 2017. "Homozygous EEF1A2 Mutation Causes Dilated
1099 Cardiomyopathy, Failure to Thrive, Global Developmental Delay, Epilepsy and Early Death."
1100 *Human Molecular Genetics* 26 (18): 3545–52. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDX239>.
- 1101 Cardenas, Maria E., N. Shane Cutler, Michael C. Lorenz, Charles J. Di Como, and Joseph Heitman.
1102 1999. "The TOR Signaling Cascade Regulates Gene Expression in Response to Nutrients." *Genes*
1103 *and Development* 13 (24): 3271–79. <https://doi.org/10.1101/gad.13.24.3271>.
- 1104 Cejas, Paloma, Enrique Casado, Cristobal Belda-Iniesta, Javier De Castro, Enrique Espinosa,
1105 Andrés Redondo, María Sereno, et al. 2004. "Implications of Oxidative Stress and Cell Membrane

- 1106 Lipid Peroxidation in Human Cancer (Spain)." *Cancer Causes and Control* 15 (7): 707–19.
1107 <https://doi.org/10.1023/B:CACO.0000036189.61607.52>.
- 1108 Celis, J. E., P. Madsen, H. V. Nielsen, B. Gesser, H. H. Rasmussen, and D. Cruger. 1988.
1109 "Cyclin/PCNA Is a Cell Cycle Modulated Nuclear Protein with a Role in DNA Replication."
1110 *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* 21 (3–4): 417–21.
- 1111 Chal, Je, and Olivier Pourquie. 2017. "Making Muscle : Skeletal Myogenesis in Vivo and in
1112 Vitro." *The Company of Biologists* 2104–22. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>.
- 1113 Chen, Rui-yi, Bui Thi, Ngoc Hieu, Gilbert Audira, Bao Lou, and Ming-der Lin. 2020. "Meta-
1114 Transcriptomic Analysis of RNAseq Data Reveals Pacu and Loach Fish with Unusually High
1115 Levels of Myoglobin Expression in Skeletal Muscles." *Animals* 10 (1130): 2-12.
1116 <https://doi:10.3390/ani10071130>
- 1117 Cheng-Keat Tan, C. Castillo, A. G. So, and K. M. Downey. 1986. "An Auxiliary Protein for DNA
1118 Polymerase- δ from Fetal Calf Thymus." *Journal of Biological Chemistry* 261 (26): 12310–16.
1119 [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67240-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67240-0).
- 1120 Chi Kwan Tsang, Hui Liu, and X.F. Steven Zheng. 2011. "MTOR Binds to the Promoters of RNA
1121 Polymerase I- and IIItranscribed Genes." *Molecular and Cellular Biology* 9 (5): 953–57.
- 1122 Ciciliot, Stefano, Alberto C Rossi, Kenneth A Dyar, Bert Blaauw, and Stefano Schiaffino. 2013.
1123 "Muscle Type and Fiber Type Specificity in Muscle Wasting." *International Journal of*
1124 *Biochemistry and Cell Biology* 45 (10): 2191–99. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.016>.
- 1125 Coyne, James C, Adelita V Ranchor, and Steven C Palmer. 2010. "Meta-Analysis of Stress-
1126 Related Factors in Cancer." *Nature Publishing Group*, 1–2. [https://doi.org/10.1038/ncponc1134-](https://doi.org/10.1038/ncponc1134-c1)
1127 [c1](https://doi.org/10.1038/ncponc1134-c1).
- 1128 Daggett, David F, Carmen R Domingo, Peter D Currie, and Sharon L Amacher. 2010. "Control of
1129 Morphogenetic Cell Movements in the Early Zebrafish Myotome" *Developmental Biology* 309
1130 (2007): 169–79. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.06.008>.
- 1131 Devoto, S H, W Stoiber, C L Hammond, P Steinbacher, and J R Haslett. 2012. "Generality of
1132 Vertebrate Developmental Patterns: Evidence for a Dermomyotome in Fish" *Evolution &*
1133 *Development* 8 (1): 101–10. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.05079.x>.Generality.
- 1134 Dias-Koberstein, Teresa Cristina Ribeiro, Dalton José Carneiro, and Elisabeth Criscuolo Urbinati.
1135 2005. "Tempo de Trânsito Gastrintestinal e Esvaziamento Gástrico Do Pacu (*Piaractus*
1136 *mesopotamicus*) Em Diferentes Temperaturas de Cultivo." *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 27
1137 (3): 414-417. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v27i3.1219>.
- 1138 Duran, Bruno Oliveira Da Silva, Geysson Javier Fernandez, Edson Assunção Mareco, Leonardo
1139 Nazario Moraes, Rondinelle Artur Simões Salomão, Tassiana Gutierrez De Paula, Vander Bruno

- 1140 Santos, Robson Francisco Carvalho, and Maeli Dal-Pai-Silva. 2015. "Differential MicroRNA
1141 Expression in Fast- and Slow-Twitch Skeletal Muscle of *Piaractus mesopotamicus* during
1142 Growth." **PLoS ONE** 10 (11): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141967>.
- 1143 Duran, Bruno Oliveira Silva, Guilherme Alcarás Góes, Bruna Tereza, Thomazini Zanella, Paula
1144 Paccielli Freire, Jessica Silvino Valente, et al. 2019. "Ascorbic Acid Stimulates the in Vitro
1145 Myoblast Proliferation and Migration of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)," **Scientific Reports** 1–
1146 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38536-4>.
- 1147 Duran, Bruno Oliveira Silva, Dal-Pai-Silva, Maeli and Garcia de la Serrana Daniel. 2020.
1148 "Rainbow Trout Slow Myoblast Cell Culture as a Model to Study Slow Skeletal Muscle, and the
1149 Characterization of Mir-133 and Mir-499 Families as a Case Study." **Journal of Experimental**
1150 **Biology** 223 (2): 1-12. <https://doi.org/10.1242/jeb.216390>
- 1151 Duran, Bruno Oliveira Silva, de la Serrana Daniel Garcia, Zanella Bruna Tereza Thomazini, Perez
1152 Erika Stefani, Mareco Edson Assunção, Santos Vander Bruno, Carvalho Robson Francisco, and
1153 Dal-Pai-Silva Maeli. 2021. "An Insight on the Impact of Teleost Whole Genome Duplication on
1154 the Regulation of the Molecular Networks Controlling Skeletal Muscle Growth." **PLoS ONE** 16
1155 (7 July): 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255006>.
- 1156 Erion, Jack L, Herbert Weissbach, and Nathan Brot. 1981. "Ribosomal Protein Biosynthesis
1157 during Starvation Tetrahymena Pyriformis and Refeeding in Recent Studies Have Demonstrated
1158 That the Synthesis of Ribosomes in the Ciliated Protozoan Tetrahymena Is a Highly Regu- Lated
1159 Process . **Regulatory Controls Are Par-** " 210 (2): 625–32.
- 1160 Esser, John J. McCarthy and Karyn A. 2011. "Anabolic and Catabolic Pathways Regulating
1161 Skeletal Muscle Mass," **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care** 859: 1–9.
1162 <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833781b5.Anabolic>.
- 1163 Essers, Jeroen, Arjan F. Theil, Céline Baldeyron, Wiggert A. van Cappellen, Adriaan B.
1164 Houtsmuller, Roland Kanaar, and Wim Vermeulen. 2005. "Nuclear Dynamics of PCNA in DNA
1165 Replication and Repair." **Molecular and Cellular Biology** 25 (21): 9350–59.
1166 <https://doi.org/10.1128/mcb.25.21.9350-9359.2005>.
- 1167 Fantinatti, Bruno E.A., Erika S. Perez, Bruna T.T. Zanella, Jéssica S. Valente, Tassiana G. de
1168 Paula, Edson A. Mareco, Robson F. Carvalho, Silvano Piazza, Michela A. Denti, and Maeli Dal-
1169 Pai-Silva. 2021. "Integrative MicroRNAome Analysis of Skeletal Muscle of *Colossoma*
1170 *macropomum* (Tambaqui), *Piaractus mesopotamicus* (Pacu), and the Hybrid Tambacu, Based on
1171 next-Generation Sequencing Data." **BMC Genomics** 22 (1): 1–17. [https://doi.org/10.1186/s12864-](https://doi.org/10.1186/s12864-021-07513-5)
1172 021-07513-5.
- 1173 FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in Action*. Fao.

<https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

Figueiredo, Vandr  Casagrande, and John J. McCarthy. 2019. "Regulation of Ribosome Biogenesis in Skeletal Muscle Hypertrophy." *Physiology* 34 (1): 30–42. <https://doi.org/10.1152/physiol.00034.2018>.

Freire, Paula Paccielli, Geysson Javier Fernandez, and Sarah Santiloni Cury. 2019. "The Pathway to Cancer Cachexia : MicroRNA-Regulated Networks in Muscle Wasting Based on Integrative Meta-Analysis." *Internacional Journal of Molecular Science*, 1–20. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms20081962>.

Froehlich, Jacob Michael, Nicholas J. Galt, Matthew J. Charging, Ben M. Meyer, and Peggy R. Biga. 2013. "In Vitro Indeterminate Teleost Myogenesis Appears to Be Dependent on Pax3." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 49 (5): 371–85. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9616-2>.

Fukami-Kobayashi, Junya, and Youji Mitsui. 1999. "Cyclin D1 Inhibits Cell Proliferation through Binding to PCNA and Cdk2." *Experimental Cell Research* 246 (2): 338–47. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4306>.

García de la serrana, Daniel, Marta Codina, Encarnaci n Capilla, Vanesa Jiménez-Amilburu, Isabel Navarro, Shao Jun Du, Ian A. Johnston, and Joaquim Gutiérrez. 2014. "Characterisation and Expression of Myogenesis Regulatory Factors during in Vitro Myoblast Development and in Vivo Fasting in the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*)." *Comparative Biochemistry and Physiology- A Molecular and Integrative Physiology* 167: 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.10.020>.

Gutierrez, Tassiana, De Paula, Fernanda Losi, Alves De Almeida, Fernanda Regina, Ivan José Vechetti-j nior, Carlos Roberto, et al. 2014. "Comparative Biochemistry and Physiology , Part B Rearing Temperature Induces Changes in Muscle Growth and Gene Expression in Juvenile Pacu (*Piaractus Mesopotamicus*)." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 169: 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.12.004>.

Henry, Clarissa A, and Sharon L Amacher. 2004. "Zebrafish Slow Muscle Cell Migration Induces a Wave of Fast Muscle Morphogenesis" *Developmental Cell* 7: 917–23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.017>

Hirsch, C. A., and H. H. Hiatt. 1966. "Turnover of Liver Ribosomes in Fed and in Fasted Rats." *Journal of Biological Chemistry* 241 (24): 5936–40. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)96360-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)96360-x).

Hollway, Georgina E, Robert J Bryson-richardson, Silke Berger, Nicholas J Cole, Thomas E Hall, and Peter D Currie. 2010. "Article Whole-Somite Rotation Generates Muscle Progenitor Cell

- 1208 Compartments in the Developing Zebrafish Embryo,” *Developmental Cell* 7: 207–19.
1209 <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.001>.
- 1210 Hove, A. ten, V. E. de Meijer, J. B.F. Hulscher, and R. H.J. de Kleine. 2018. “Meta-Analysis of
1211 Risk of Developing Malignancy in Congenital Choledochal Malformation.” *British Journal of*
1212 *Surgery* 105 (5): 482–90. <https://doi.org/10.1002/bjs.10798>.
- 1213 Huang, C. W., Y. H. Li, S. Y. Hu, J. R. Chi, G. H. Lin, C. C. Lin, H. Y. Gong, et al. 2012.
1214 “Differential Expression Patterns of Growth-Related MicroRNAs in the Skeletal Muscle of Nile
1215 Tilapia (*Oreochromis niloticus*).” *Journal of Animal Science* 90 (12): 4266–79.
1216 <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5142>.
- 1217 Idigo, Nwamaka J., Dinesh C. Soares, and Catherine M. Abbott. 2020. “Translation Elongation
1218 Factor 1A2 Is Encoded by One of Four Closely Related Eef1a Genes and Is Dispensable for
1219 Survival in Zebrafish.” *Bioscience Reports* 40 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20194191>.
- 1220 Johnston, I. A., W. Davison, and G. Goldspink. 1977. “Energy metabolism of swimming muscles.”
1221 *Journal of Comparative Physiology* 114: 203–16. <http://doi:10.1007/bf00688970>
- 1222 Johnston, Ian A. 2006. “Environment and Plasticity of Myogenesis in Teleost Fish.” *Journal of*
1223 *Experimental Biology* 209 (12): 2249–64. <https://doi.org/10.1242/jeb.02153>.
- 1224 Johnston, Ian A., Neil I. Bower, and Daniel J. Macqueen. 2011. “Growth and the Regulation of
1225 Myotomal Muscle Mass in Teleost Fish.” *Journal of Experimental Biology* 214 (10): 1617–28.
1226 <https://doi.org/10.1242/jeb.038620>.
- 1227 Jomori, Kiyoko, and Dalton Jose. 2003. “Growth and Survival of Pacu *Piaractus mesopotamicus*
1228 (Holmberg, 1887) Juveniles Reared in Ponds or at Different Initial Larviculture Periods Indoors.”
1229 *Aquaculture* 221: 277–87. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00069-3).
- 1230 Jorgensen, Paul, Ivan Rupeš, Jeffrey R. Sharom, Lisa Schneper, James R. Broach, and Mike Tyers.
1231 2004. “A Dynamic Transcriptional Network Communicates Growth Potential to Ribosome
1232 Synthesis and Critical Cell Size.” *Genes and Development* 18 (20): 2491–2505.
1233 <https://doi.org/10.1101/gad.1228804>.
- 1234 Joseph S. Nelson, Terry C. Grande, Mark V.H. Wilson. 2016. *Fishes of The World*. Fifth Edit.
- 1235 Karimian, Ansar, Yasin Ahmadi, and Bahman Yousefi. 2016. “Multiple Functions of P21 in Cell
1236 Cycle, Apoptosis and Transcriptional Regulation after DNA Damage.” *DNA Repair* 42: 63–71.
1237 <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>.
- 1238 Keenan, Samuel R., and Peter D. Currie. 2019 “The Developmental Phases of Zebrafish
1239 Myogenesis.” *Journal of Developmental Biology* 7 (2): 2–21.
1240 <https://doi.org/10.3390/JDB7020012>.
- 1241 Kobayashi, Yutaka, Tomoyuki Tanaka, Mieradilli Mulati, Hiroki Ochi, Shingo Sato, Philipp

- 1242 Kaldis, Toshitaka Yoshii, Atsushi Okawa, and Hiroyuki Inose. 2020. "Cyclin-Dependent Kinase
- 1243 1 Is Essential for Muscle Regeneration and Overload Muscle Fiber Hypertrophy." *Frontiers in*
- 1244 *Cell and Developmental Biology* 8 (October): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564581>.
- 1245 Kusnadi, Eric P, Katherine M Hannan, Rodney J Hicks, Ross D Hannan, Richard B Pearson, and
- 1246 Jian Kang. 2015. "Regulation of RDNA Transcription in Response to Growth Factors , Nutrients
- 1247 and Energy." *Gene* 556 (1): 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.11.010>.
- 1248 L.C, Junqueira José, Carneiro. 2012. *Histologia Básica*.
- 1249 Lavajoo, F., M. Perelló-Amorós, E. J. Vélez, A. Sánchez-Moya, S. Balbuena-Pecino, N. Riera-
- 1250 Heredia, J. Fernández-Borràs, et al. 2020. "Regulatory Mechanisms Involved in Muscle and Bone
- 1251 Remodeling during Refeeding in Gilthead Sea Bream." *Scientific Reports* 10 (1): 1–14.
- 1252 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57013-6>.
- 1253 Lawlor, Margaret A., and Peter Rotwein. 2000. "Insulin-Like Growth Factor-Mediated Muscle
- 1254 Cell Survival: Central Roles for Akt and Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P21." *Molecular and*
- 1255 *Cellular Biology* 20 (23): 8983–95. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.23.8983-8995.2000>.
- 1256 Li, Zhaoyang, Chen Feng Qi, Dong Mi Shin, Adriana Zingone, Helen J. Newbery, Alexander L.
- 1257 Kovalchuk, Catherine M. Abbott, and Herbert C. Morse. 2010. "Eef1a2 Promotes Cell Growth,
- 1258 Inhibits Apoptosis and Activates JAK/STAT and AKT Signaling in Mouse Plasmacytomas."
- 1259 *PLoS ONE* 5 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010755>.
- 1260 Lied, Einar, Grethe Rosenlund, Bernt Lundt, and Alexandra Vonder Deckent. 1983. "Effect Of
- 1261 Starvation And Refeeding On In Vitro Protein Synthesis In White Trunk Muscle Of Atlantic Cod
- 1262 (*Gadus morhua*)" *Comparative Biochemistry and Physiology* 76 (4): 777–81.
- 1263 [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90392-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90392-9)
- 1264 Listrat, Anne, Bénédicte Lebre, Isabelle Louveau, Thierry Astruc, Muriel Bonnet, Louis
- 1265 Lefaucheur, Brigitte Picard, and Jérôme Bugeon. 2016. "How Muscle Structure and Composition
- 1266 Influence Meat and Flesh Quality." *The Scientific World Journal* 1-14
- 1267 <https://doi.org/10.1155/2016/3182746>.
- 1268 Livak, Kenneth J, and Thomas D Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data
- 1269 Using Real- Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method" *Methods* 408: 402–8.
- 1270 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- 1271 Lopez-Guadamillas, Elena, Pablo J. Fernandez-Marcos, Cristina Pantoja, Maribel Muñoz-Martin,
- 1272 Dolores Martínez, Gonzalo Gómez-López, Ramón Campos-Olivas, Angela M. Valverde, and
- 1273 Manuel Serrano. 2016. "P21Cip1 Plays a Critical Role in the Physiological Adaptation to Fasting
- 1274 through Activation of PPARα." *Scientific Reports* 6 (September): 1–10.
- 1275 <https://doi.org/10.1038/srep34542>.

- 1276 Mao Tingting, Zheng Yahua, Fang Hongbo, Xie Luji, Zhang Weidan, Jiang Liping. 2017. "Effect
1277 of Bcl-2 and PCNA expression in rat myoblast injury induced by hydrogen peroxide" **Chinese**
1278 **Journal of Pathophysiology**: 935-943. <http://doi.org/10.3969/j.issn.1000-4718.2017.05.028>
- 1279 Mareco, Edson A., de la Serrana, Daniel G., Johnston, Ian A., Dal Pai-Silva, Maeli. 2015. "
1280 Characterization of the transcriptome of fast and slow myotomal muscle fibers of pacu (*Piaractus*
1281 *mesopotamicus*)". **BMC Genomics** 16 (82): 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1423-6>
- 1282 Marion, Rosa M., Aviv Regev, Eran Segal, Yoseph Barash, Daphne Koller, Nir Friedman, and
1283 Erin K. O'Shea. 2004. "Sfp1 Is a Stress- and Nutrient-Sensitive Regulator of Ribosomal Protein
1284 Gene Expression." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
1285 **America** 101 (40): 14315–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405353101>.
- 1286 Martien H.Herruer, Willem H.Mager, Lambertus P.Woudt, Rend T.M.Nieuwint, Gertrude
1287 M.Wassenaar, Philip Groeneveld and Rudi J.Planta. 1987. "Transcriptional Control of Yeast
1288 Ribosomal Protein Synthesis during Carbon-Source Upshift." **Nucleic Acids Research** 15 (24):
1289 10133–44.
- 1290 Mills, Nathan, Darcy Cashatt, Michael J Weber, and Clay L Pierce. 2018. "A Case Study and a
1291 Meta-Analysis of Seasonal Variation in Fish Mercury Concentrations." **Ecotoxicology** (6): 641-
1292 649. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1942-4>.
- 1293 Miyazaki, Mitsunori, Michito Shimosuru, and Toshio Tsubota. 2019. "Skeletal Muscles of
1294 Hibernating Black Bears Show Minimal Atrophy and Phenotype Shifting despite Prolonged
1295 Physical Inactivity and Starvation." **PLoS ONE** 14 (4): 1–13.
1296 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215489>.
- 1297 Moehle, C M, and A G Hinnebusch. 1991. "Association of RAP1 Binding Sites with Stringent
1298 Control of Ribosomal Protein Gene Transcription in *Saccharomyces Cerevisiae*." **Molecular and**
1299 **Cellular Biology** 11 (5): 2723–35. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.5.2723-2735.1991>.
- 1300 Morrissey, J. J., L. E. Cupp, H. Weissbach, and N. Brot. 1976. "Synthesis of Ribosomal Proteins
1301 L7L12 in Relaxed and Stringent Strains of *Escherichia coli*." **Journal of Biological Chemistry**
1302 251 (18): 5516–21. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33090-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33090-9).
- 1303 Muhammad Aziz, Fatima Rawish, and Assaly Ragheb. 2020. "Elevated Interleukin - 6 and Severe
1304 COVID - 19 : A Meta - Analysis," **Medical Virology** 1–3. <https://doi.org/10.1002/jmv.25948>.
- 1305 Nader, Gustavo A., Thomas J. McLoughlin, and Karyn A. Esser. 2005. "MTOR Function in
1306 Skeletal Muscle Hypertrophy: Increased Ribosomal RNA via Cell Cycle Regulators." **American**
1307 **Journal of Physiology - Cell Physiology** 289 (6 58-6): 1457–65.
1308 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00165.2005>.
- 1309 Neuman-Silberberg, F S, S Bhattacharya, and J R Broach. 1995. "Nutrient Availability and the

RAS/Cyclic AMP Pathway Both Induce Expression of Ribosomal Protein Genes in *Saccharomyces cerevisiae* but by Different Mechanisms." *Molecular and Cellular Biology* 15 (6): 3187–96. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.6.3187>.

Nitz, Lilian F., Lucas Pellegrin, Lucas C. Maltez, Daniel Pinto, Luís A. Sampaio, José M. Monserrat, and Luciano Garcia. 2020. "Temperature and Hypoxia on Oxidative Stress Responses in Pacu *Piaractus Mesopotamicus*." *Journal of Thermal Biology* 92 (July). <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102682>.

Nosrati, Nagisa, Neetu Rohit Kapoor, and Vijay Kumar. 2015. "DNA Damage Stress Induces the Expression of Ribosomal Protein S27a Gene in a P53-Dependent Manner." *Gene* 559 (1): 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.01.014>.

Pawlak, Michal, Philippe Lefebvre, and Bart Staels. 2015. "Molecular Mechanism of PPAR α Action and Its Impact on Lipid Metabolism, Inflammation and Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 62 (3): 720–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039>.

Péladeau, Christine, Nadine Adam, Lucas M. Bronicki, Adèle Coriati, Mohamed Thabet, Hasanen Al-Rewashdy, Jason Vanstone, et al. 2020. "Identification of Therapeutics That Target EEF1A2 and Upregulate Utrophin A Translation in Dystrophic Muscles." *Nature Communications* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15971-w>.

Perez-riverol, Yasset, Andrey Zorin, Gaurhari Dass, Manh-tu Vu, Pan Xu, Mihai Glont, Juan Antonio Vizcaíno, et al. 2016. "Quantifying the Impact of Public Omics Data." *Nature Communications*, no. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11461-w>.

Powers, Scott K., Li Li Ji, Andreas N. Kavazis, and Malcolm J. Jackson. 2011. "Reactive Oxygen Species: Impact on Skeletal Muscle." *Comprehensive Physiology* 1 (2): 941–69. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100054>.

Ramírez-Oseguera, Ricardo Tonathiu, Aura Matilde Jiménez-Garduño, Rocío Álvarez, Katharina Heine, Enrique Pinzón-Estrada, Ismael Torres-Saldaña, and Alicia Ortega. 2013. "Gestational Undernourishment Modifies the Composition of Skeletal Muscle Transverse Tubule Membranes and the Mechanical Properties of Muscles in Newborn Rats." *Cellular Physiology and Biochemistry* 32 (4): 1024–39. <https://doi.org/10.1159/000354503>.

Reis, R E, J S Albert, F Di Dario, M M Mincarone, P Petry, and L A Rocha. 2016. "Fish Biodiversity and Conservation in South America," *Journal Of Fish Biology* 1–36. <https://doi.org/10.1111/jfb.13016>.

Rius-Francino, Mònica, Laura Acerete, Vanesa Jiménez-Amilburu, Encarnación Capilla, Isabel Navarro, and Joaquim Gutiérrez. 2011. "Differential Effects on Proliferation of GH and IGFs in

- 1344 Sea Bream (*Sparus Aurata*) Cultured Myocytes.” **General and Comparative Endocrinology** 172
- 1345 (1): 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.03.024>.
- 1346 Rodríguez-Vargas, José Manuel, María José Ruiz-Magãa, Carmen Ruiz-Ruiz, Jara Majuelos-
- 1347 Melguizo, Andreína Peralta-Leal, María Isabel Rodríguez, José Antonio Muñoz-Gámez, et al.
- 1348 2012. “ROS-Induced DNA Damage and PARP-1 Are Required for Optimal Induction of
- 1349 Starvation-Induced Autophagy.” **Cell Research** 22 (7): 1181–98.
- 1350 <https://doi.org/10.1038/cr.2012.70>.
- 1351 Rossi, Giuliana, and Graziella Messina. 2014. “Comparative Myogenesis in Teleosts and
- 1352 Mammals,” **Cellular and Molecular Life Science** 3081–99. [https://doi.org/10.1007/s00018-014-](https://doi.org/10.1007/s00018-014-1604-5)
- 1353 1604-5.
- 1354 Rudra, Dipayan, Yu Zhao, and Jonathan R. Warner. 2005. “Central Role of Ifh1p-Fhl1p
- 1355 Interaction in the Synthesis of Yeast Ribosomal Proteins.” **EMBO Journal** 24 (3): 533–42.
- 1356 <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600553>.
- 1357 Rung, Johan, and Alvis Brazma. 2012. “Reuse of Public Genome-Wide Gene Expression Data.”
- 1358 **Nature Reviews Genetics**, no. December. <https://doi.org/10.1038/nrg3394>.
- 1359 Saint-Paul, Ulrich. 2017. “Native Fish Species Boosting Brazilian’s Aquaculture Development.”
- 1360 **Acta of Fisheries and Aquatic Resources** 5 (1): 1–9. [https://doi.org/10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-](https://doi.org/10.2312/ActaFish.2017.5.1.1-9)
- 1361 9.
- 1362 Sängér, A. M., and W. Stoiber. 2001. “Muscle Fiber Diversity and Plasticity.” **Fish Physiology** 18
- 1363 (C): 187–250. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(01\)18008-8](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)18008-8).
- 1364 Santos, Vander Bruno dos, Marcelo Wendeborn Miranda de Oliveira, Rondinelle Artur Simões
- 1365 Salomão, Rosemeire de Souza Santos, Tassiana Gutierrez de Paula, Maeli Dal Pai Silva, and Edson
- 1366 Assunção Mareco. 2017. “Influence of Temperature and Exercise on Growth Performance,
- 1367 Muscle, and Adipose Tissue in Pacus (*Piaractus Mesopotamicus*).” **Journal of Thermal Biology**
- 1368 69 (May): 221–27. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.08.004>.
- 1369 Schawalder, Stephan B., Mehdi Kabani, Isabelle Howald, Urmila Choudhury, Michel Werner, and
- 1370 David Shore. 2004. “Growth-Regulated Recruitment of the Essential Yeast Ribosomal Protein
- 1371 Gene Activator Ifh1.” **Nature** 432 (7020): 1058–61. <https://doi.org/10.1038/nature03200>.
- 1372 Silva, André Luiz N., Robson Andrade Rodrigues, Mayara Schueroff Siqueira, Karine Nathiele
- 1373 Nogueira Farias, Karin Virgínia Kuibida, Lilian Franco-Belussi, and Carlos E. Fernandes. 2021.
- 1374 “Transaminase Profile and Hepatic Histopathological Traits in *Piaractus mesopotamicus* Exposed
- 1375 to Insecticide Diflubenzuron.” **Environmental Science and Pollution Research** 28 (17): 22002–
- 1376 10. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12013-2>.
- 1377 Sokolović, Milka, Diederik Wehkamp, Aleksandar Sokolović, Jacqueline Vermeulen, Lisa A.

- 1378 Gilhuijs-Pederson, Rachel I.M. van Haaften, Yuri Nikolsky, et al. 2007. "Fasting Induces a
1379 Biphasic Adaptive Metabolic Response in Murine Small Intestine." *BMC Genomics* 8: 1–18.
1380 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-361>.
- 1381 Steinmetz, Patrick R.H., Johanna E.M. Kraus, Claire Larroux, Jörg U. Hammel, Annette Amon-
1382 Hassenzahl, Evelyn Houliston, Gert Wörheide, Michael Nickel, Bernard M. Degnan, and Ulrich
1383 Technau. 2012. "Independent Evolution of Striated Muscles in Cnidarians and Bilaterians."
1384 *Nature* 487 (7406): 231–34. <https://doi.org/10.1038/nature11180>.
- 1385 Stellabotte, Frank, Betsy Dobbs-McAuliffe, Daniel A. Fernández, Xuesong Feng, and Stephen H.
1386 Devoto. 2007. "Dynamic Somite Cell Rearrangements Lead to Distinct Waves of Myotome
1387 Growth." *Development* 134 (7): 1253–57. <https://doi.org/10.1242/dev.000067>.
- 1388 Stickney, Heather L, Michael J F Barresi, and Stephen H Devoto. 2000. "Somite Development in
1389 Zebrafish" 303 (July): 287–303. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A)
1390 [DVDY1065>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A)
- 1391 Stukenberg, P. T., P. S. Studwell-Vaughan, and M. O'Donnell. 1991. "Mechanism of the Sliding
1392 β -Clamp of DNA Polymerase III Holoenzyme." *Journal of Biological Chemistry* 266 (17):
1393 11328–34. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)99166-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)99166-0).
- 1394 Thorrez, Lieven, Katrijn Van Deun, Léon Charles Tranchevent, Leentje Van Lommel, Kristof
1395 Engelen, Kathleen Marchal, Yves Moreau, Iven Van Mechelen, and Frans Schuit. 2008. "Using
1396 Ribosomal Protein Genes as Reference: A Tale of Caution." *PLoS ONE* 3 (3).
1397 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001854>.
- 1398 Tollervey, David. 2002. "Making Ribosome." *Biochemical Society Transactions* 30 (1): A19–
1399 A19. <https://doi.org/10.1042/bst030a019>.
- 1400 Vo, Tu A., Trina F. Galloway, Tora Bardal, Christine K. Halseth, Gunvor Øie, and Elin Kjørsvik.
1401 2016. "Skeletal Muscle Growth Dynamics and the Influence of First-Feeding Diet in Atlantic Cod
1402 Larvae (*Gadus morhua* L.)." *Biology Open* 5 (11): 1575–84. <https://doi.org/10.1242/bio.018556>.
- 1403 Wahli, Walter, and Liliane Michalik. 2012. "PPARs at the Crossroads of Lipid Signaling and
1404 Inflammation." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23 (7): 351–63.
1405 <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>.
- 1406 Walden, Ferdinand Von. 2019. "Ribosome Biogenesis in Skeletal Muscle: Coordination of
1407 Transcription and Translation." *Journal of Applied Physiology* 127 (2): 591–98.
1408 <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00963.2018>.
- 1409 Walden, Ferdinand von, Chang Liu, Nicole Aurigemma, and Gustavo A. Nader. 2016. "MTOR
1410 Signaling Regulates Myotube Hypertrophy by Modulating Protein Synthesis, RDNA
1411 Transcription, and Chromatin Remodeling." *American Journal of Physiology - Cell Physiology*



PG-BGA

311 (4): C663–72. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00144.2016>.

Wang, Houcai, Bingqian Xie, Yuanyuan Kong, Yi Tao, Guang Yang, Minjie Gao, Hongwei Xu, et al. 2016. "Overexpression of RPS27a Contributes to Enhanced Chemoresistance of CML Cells to Imatinib by the Transactivated STAT3." *Oncotarget* 7 (14): 18638–50. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7888>.

Wang, Mengya, Weihao Song, Chaofan Jin, Kejia Huang, Qianwen Yu, Jie Qi, Quanqi Zhang, and Yan He. 2021. "Pax3 and Pax7 Exhibit Distinct and Overlapping Functions in Marking Muscle Satellite Cells and Muscle Repair in a Marine Teleost, *Sebastes Schlegelii*." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073769>.

Xu, Xilong, Xiufang Xiong, and Yi Sun. 2016. "The Role of Ribosomal Proteins in the Regulation of Cell Proliferation, Tumorigenesis, and Genomic Integrity." *Science China Life Sciences* 59 (7): 656–72. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0018-0>.

Yang, Ke, Masahiro Hitomi, and Dennis W. Stacey. 2006. "Variations in Cyclin D1 Levels through the Cell Cycle Determine the Proliferative Fate of a Cell." *Cell Division* 1: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-32>.

Young, V. R., and S. D. Alexis. 1968. "In Vitro Activity of Ribosomes and RNA Content of Skeletal Muscle in Young Rats Fed Adequate or Low Protein." *The Journal of Nutrition* 96 (2): 255–62. <https://doi.org/10.1093/jn/96.2.255>.

Zeng, Furong, Yuzhao Huang, Ying Guo, Mingzhu Yin, and Xiang Chen. 2020. "Association of Inflammatory Markers with the Severity of COVID-19 : A Meta-Analysis." *International Journal of Infectious Diseases* 96: 467–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.055>.