

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA

ORIENTADORA

MAELI DAL-PAI

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

Maeli Dal-Pai

**BOTUCATU – SP
2019**

Bruna Tereza Thomazini Zanelle

Maeli Dal-Pai

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

Zanella, Bruna Tereza Thomazini.

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

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

Orientador: Maeli Dal-Pai

Coorientador: Tassiana Gutierrez de Paula

Capes: 20100000

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

Períodos de restrição alimentar são comuns em peixes. Nessa condição, ocorre a degradação do tecido muscular e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), danosas aos seres vivos. Nesse sentido, a adição de antioxidantes como o ácido ascórbico (AA) na alimentação, pode resultar na neutralização e prevenção dos danos ocasionados pelas ROS. O objetivo desse trabalho foi avaliar os impactos da suplementação de AA, *in vivo* e *in vitro*, no músculo esquelético de pacus durante a realimentação. Pacus juvenis foram divididos nos grupos: Control (C; alimentação contínua - 200 mg/kg de AA), Fasting (F; 15 dias de jejum) e três grupos realimentados por 30 dias após o jejum: Low (L-AA; 100 mg/kg de AA), Balanced (B-AA; 200 mg/kg de AA) e High supplementation (H-AA; 400 mg/kg de AA). Amostras musculares foram coletadas após jejum (15 dias) e realimentação (6 horas, 15 e 30 dias). Fibras musculares foram mensuradas e separadas em classes de acordo com seu diâmetro; análises bioquímicas foram realizadas para avaliar a atividade de enzimas antioxidantes. A expressão de genes envolvidos nas vias de anabolismo (*igf1*, *igfbp5*, *mtor*, *rragc* e *rps6kb1a*), catabolismo (*mafbx*, *murf1a*, *murf1b* e *fbxo25*), miogênese (*myod*, *myog* e *pax7*) e metabolismo oxidativo (*pgc1α* e *sdha*) foram avaliadas por RT-qPCR. Além disso, análises *in vitro* foram realizadas para comprovar o efeito direto desse protocolo em células musculares. Após o período de jejum, ocorreu a diminuição no diâmetro das fibras e na expressão de genes anabólicos, além de aumento na expressão de genes catabólicos no grupo F. Após um curto período de realimentação (6 horas), houve um aumento na expressão de genes anabólicos e miogênicos no grupo H-AA. Aos 15 dias, observou-se uma diminuição geral na expressão dos genes no grupo L-AA, além de uma recuperação no diâmetro das fibras e aumento na expressão dos genes miogênicos no grupo H-AA. Ao final do período de realimentação, apenas o grupo H-AA apresentou recuperação no diâmetro das maiores fibras, além de aumento na expressão de genes relacionados à miogênese e metabolismo oxidativo. A suplementação de AA promoveu diminuição na atividade da enzima antioxidante catalase ao longo do período experimental nesse mesmo grupo. Nossos dados indicam que a baixa suplementação de AA impactou negativamente na recuperação do metabolismo muscular, enquanto a maior suplementação auxiliou no rápido estabelecimento de condições benéficas ao crescimento, possivelmente, atenuando os efeitos do jejum e mantendo um microambiente favorável à produção energética. Ainda, nossos resultados *in vitro* indicam um efeito direto do AA em células musculares. Esses resultados podem representar uma estratégia nos sistemas de aquicultura, promovendo uma rápida recuperação muscular após situações de jejum em peixes.

Abstract

Fasting periods commonly occur throughout the fish's life. During this condition, there is an increase in muscle degradation and reactive oxygen species (ROS) production, which can cause cell disturbances. Antioxidants, such as ascorbic acid (AA), can neutralize and prevent ROS's damage. Thus, we aimed to evaluate the AA supplementation impacts, *in vivo* and *in vitro* in the skeletal muscle of pacu during refeeding. Pacu juvenile were grouped in Control (C; continuous feeding - 200 mg/kg of AA), Fasting (F; 15 days of fasting) and three refeeding groups after fasting: Low (L-AA; 100 mg/kg of AA), Balanced (B-AA; 200 mg/kg of AA) and High-supplementation (H-AA; 400 mg/kg of AA). Muscle samples were collected after fasting (15 days) and refeeding (6 hours, 15 and 30 days). Muscle fibers were measured and grouped in diameter classes. Biochemistry analyses were performed to evaluate antioxidant enzymes activity. Genes related to anabolism (*igf1*, *igfbp5*, *mtor*, *rragc* and *rps6kb1a*), catabolism (*mafbx*, *murf1a*, *murf1b* and *fbxo25*), myogenesis (*myod*, *myog* and *pax7*) and oxidative metabolism (*pgc1 α* and *sdha*) were analyzed by RT-qPCR. Besides, *in vitro* analyzes were performed to evaluate the direct AA effect's in muscle cells. After fasting, a decrease in fiber diameter and anabolic genes expression, besides an increase in catabolic genes was observed in F group. In the first moment after refeeding (6 hours), the anabolic and myogenic genes expression increased in the H-AA. After 15 days, the L-AA group presented a general decrease in gene expression, while the H-AA had an increase in myogenic genes expression and recovered fiber diameter. After 30 days, the H-AA presented an increase in the expression of genes related to myogenesis and oxidative metabolism combined with a recovery in fiber diameters. Besides, the AA supplementation promoted a decrease in catalase activity through time in this same group. Our data indicate that the low AA level may have impaired muscle metabolism resumption, while the higher supplementation may have contributed to a faster recovery of muscle growth, possibly providing a beneficial microenvironment for energetic production. Moreover, our *in vitro* results indicate a possible direct AA effect on muscle cells. These findings may present a strategy to minimize the loss of aquaculture profits, promoting faster muscle recovery after fasting and stressful situations.

Sumário

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

1. Introdução

1.1. Músculo estriado esquelético em peixes

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

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

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

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

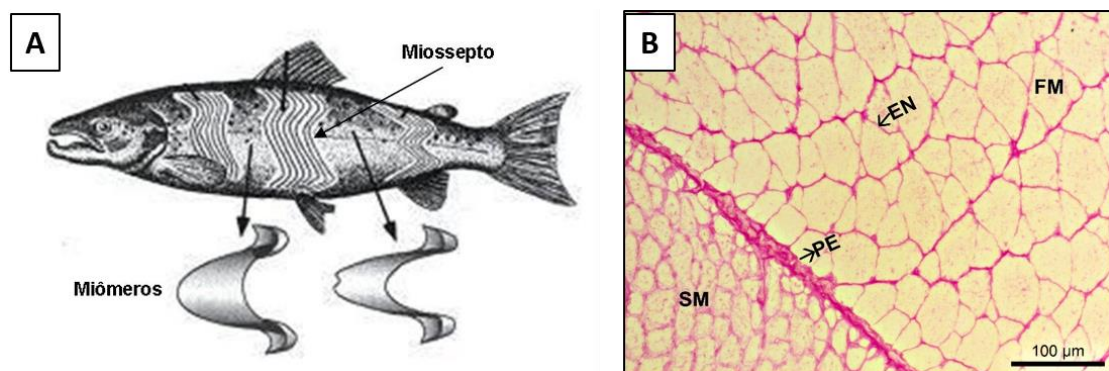


Fig. 1. Organização do tecido muscular esquelético em peixes. **(A)** Conjunto de fibras musculares se organizam em miômeros intercalados por miosseptos de tecido conjuntivo. Adaptado de JOHNSTON, 2001. **(B)** Cortes histológicos do músculo esquelético de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) indicando as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

1.2. Miogênese em peixes

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

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

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

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

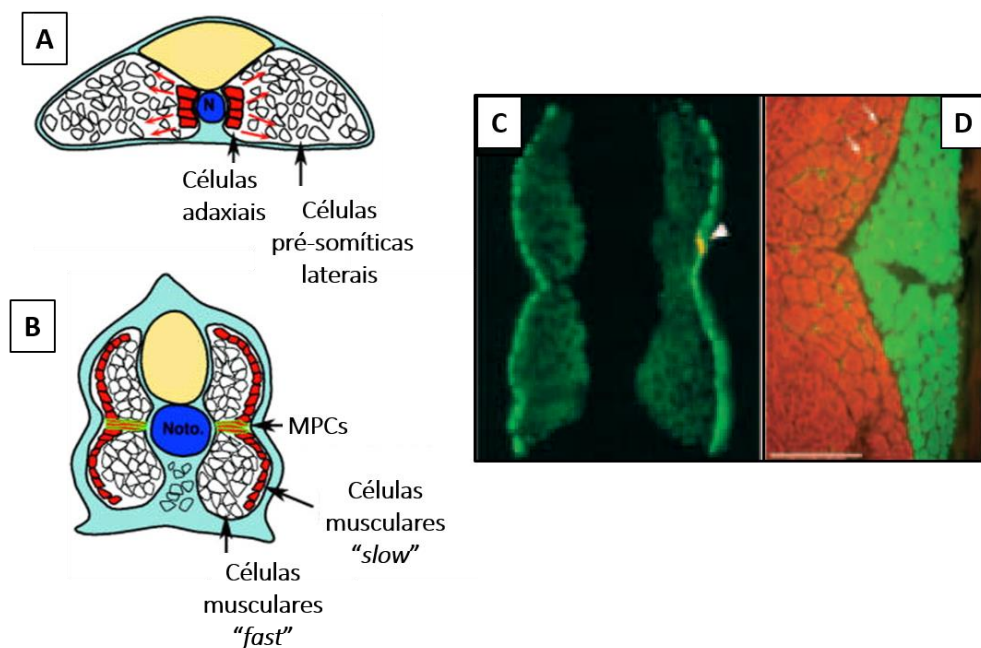


Fig. 2. Miogênese embrionária e compartimentalização da musculatura em peixes. **(A)** Esquema de corte transversal de zebrafish (*Danio rerio*). Destaque para as células adaxiais adjacentes a notocorda (N) e células pré-somíticas laterais. **(B)** Migração das células adaxiais para a região superficial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

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

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

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

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

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

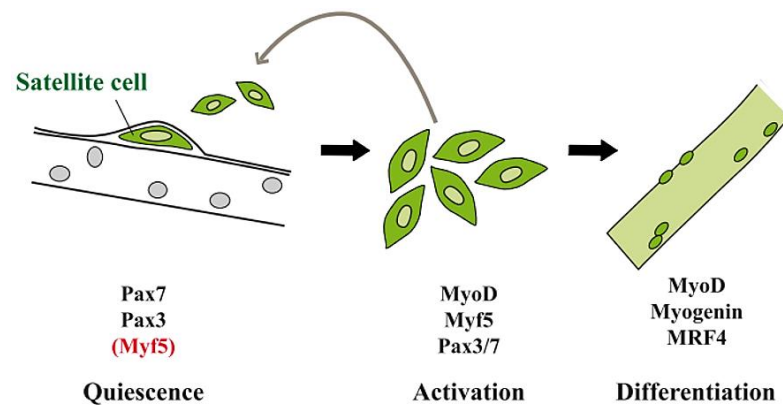


Fig. 3. Representação esquemática do processo de miogênese. Fatores de transcrição, *Pax3* e *Pax7*, mantêm as células satélites (ou MPCs) em seu estado quiescente. Após a entrada no ciclo celular, fatores de regulação miogênica (MRFs) primários, *Myod* e *Myf5*, regulam a proliferação dos mioblastos.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

1.3. Crescimento muscular pós-embriônico

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

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

1.3.1 Controle molecular do crescimento muscular

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

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

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

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

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

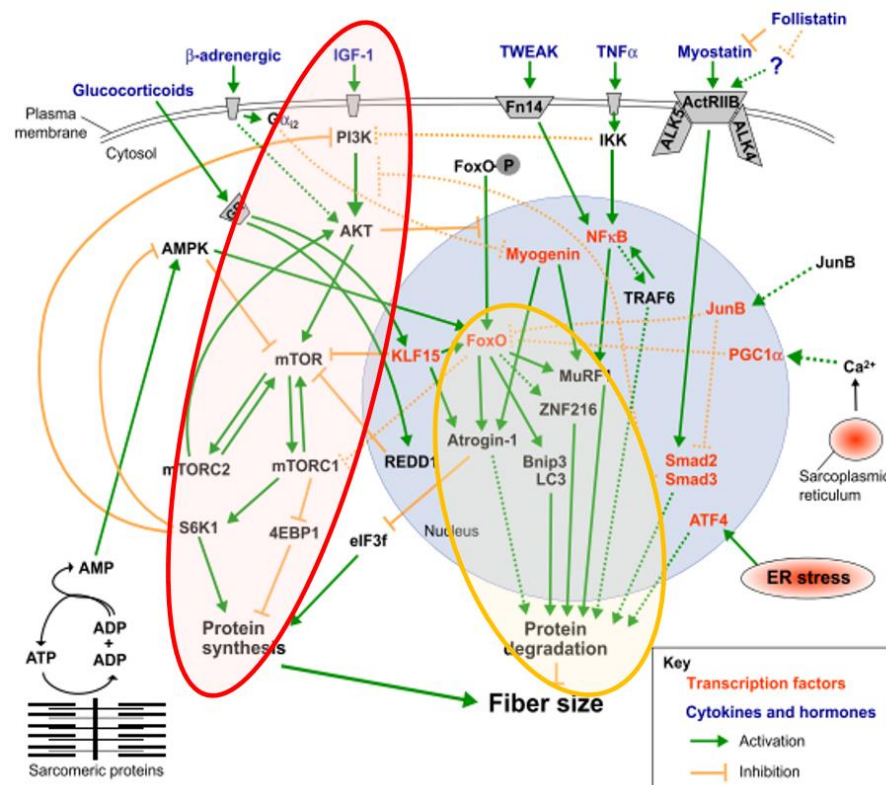


Fig. 4. Componentes das vias de sinalização que orquestram o fenótipo muscular. As vias de anabolismo (vermelho) resultam na síntese proteica, enquanto as vias de catabolismo (amarelo) levam a degradação muscular. Adaptado de BONALDO; SANDRI, 2013.

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

1.4. Restrição alimentar

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5. Ácido ascórbico

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

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

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

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

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

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

2. Hipótese

A hipótese inicial do presente estudo foi que a suplementação de AA durante a realimentação contribui para a diminuição dos efeitos causado pela situação de jejum (*in vivo*) e restrição de nutrientes (*in vitro*) no tecido muscular, promovendo melhores condições para o anabolismo, diminuição do catabolismo e recuperação do fenótipo e crescimento muscular.

3. Objetivos

3.1. Avaliar os efeitos da realimentação com alta e baixa suplementação ácido ascórbico (AA), *in vivo*, em componentes das vias do anabolismo e catabolismo muscular, atividade de enzimas antioxidante e aspectos morfológicos e morfométricos da musculatura esquelética de juvenis de pacu.

3.2. Avaliar o efeito direto, *in vitro*, do tratamento com AA em culturas de mioblastos de pacus submetidas à restrição de nutrientes, em componentes das vias do anabolismo e catabolismo muscular, atividade de enzimas antioxidantes e parâmetros morfológicos e morfométricos.

4. Metodologia

4.1. Condições experimentais

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. O protocolo adotado (n.º 1050) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu. O cultivo dos peixes foi realizado no Polo Regional da Alta Sorocabana, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), com sede em Presidente Prudente - SP. Juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com aproximadamente 30 g, foram distribuídos em caixas d'água (0,25 m³), em sistemas de recirculação distintos. O oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram monitorados diariamente e os parâmetros, pH, amônia, nitrito e nitrato, semanalmente. Os grupos experimentais foram separados em sistemas independentes de cultivos para evitar a contaminação cruzada de diferentes níveis de AA entre os grupos e cada tratamento foi realizado em três tanques de cultivo, consistindo em 3 replicatas por tratamento.

As dietas foram formuladas e desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes – AquaNutri da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, de acordo com a Tabela 1. As rações foram produzidas a partir do processo de extrusão para que mantivessem uma boa flutuabilidade, facilitando a alimentação dos animais.

Para garantir a atividade do AA e sua proteção frente a alta temperatura durante a preparação, utilizamos vitamina C polifosfatada, protegida contra o processo de aquecimento e com atividade garantida de no mínimo 35% (ROVIMIX®, STAY-C®35, DSM). As quantidades de AA fornecidas para cada grupo experimental foram definidas de acordo com estudos anteriores que utilizaram essa mesma espécie animal (ALMEIDA, 2003; BELO et al., 2012; GARCIA et al., 2007, 2011; MARTINS, 1998; MARTINS et al., 1995; MIRANDA et al., 2003; SABIONI, 2009). A partir desses estudos, a dosagem de 200 mg de AA/kg peso corpóreo foi definida como a dosagem basal necessária para o desenvolvimento normal de pacus juvenis e as altas e baixas dosagens ofertadas aos grupos experimentais foram definidas a partir da quantidade basal de AA. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia, até a saciedade aparente.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação por 15 dias no qual receberam ração com ausência de AA com intuito de eliminar as possíveis reservas fisiológicas desse composto. Posteriormente, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Fig. 5): Control (C), no qual os animais foram alimentados com ração contendo 200 mg de AA por kg do peso corpóreo durante todo o período experimental; Fasting (F), no qual os animais foram submetidos a um período de 15 dias de jejum; e três grupos, os quais foram realimentados por 30 dias após o período de jejum com diferentes níveis de AA: Low-supplementation (L-AA) no qual os animais receberam ração com 100 mg AA/kg peso corpóreo; Balanced-supplementation (B-AA), no qual os animais receberam ração com 200 mg AA/kg peso corpóreo; e High-supplementation (H-AA) no qual os animais receberam ração com suplementação de 400 mg AA/kg peso corpóreo.

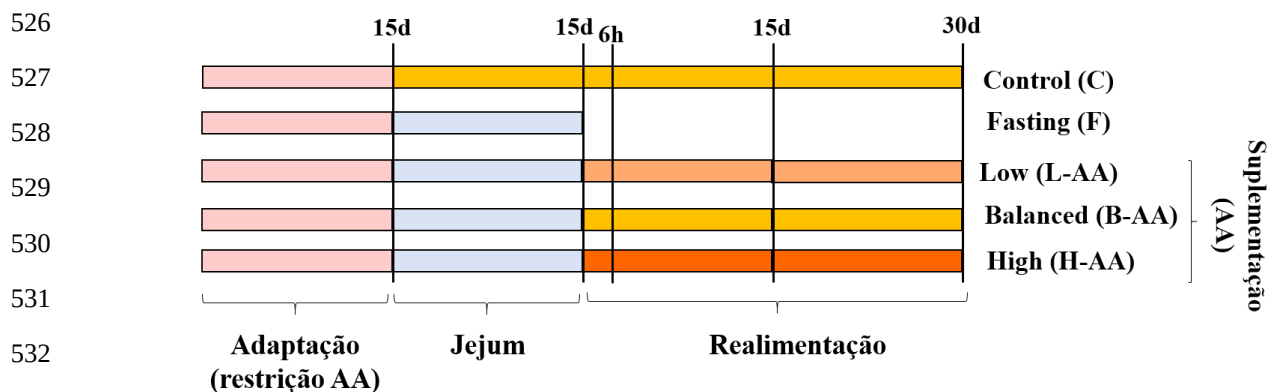


Fig. 5. Grupos experimentais. Após o período de adaptação, os animais foram divididos nos grupos Control (C – alimentação contínua; 200 mg AA /kg peso corpóreo), Fasting (F – jejum por 15 dias) e realimentação; Low-supplementation (L-AA - 100 mg AA /kg peso corpóreo), Balanced-supplementation (B-AA - 200 mg AA /kg peso corpóreo) e High-supplementation (H-AA - 400 mg AA /kg peso corpóreo). Coletas realizadas após 15 dias de jejum e 6 horas, 15 e 30 dias de realimentação.

As coletas das amostras musculares foram realizadas após 15 dias de jejum e após 6 horas, 15 e 30 dias de realimentação. Em cada coleta, os peixes (n: 8) foram eutanasiados com benzocaína em excesso (250mg/L de água). Amostras da musculatura branca foram retiradas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o processamento.

Tabela 1 – Formulação e composição calculadas das rações utilizadas para os grupos experimentais.

Ingredientes (%)	Rações			
	Ausência	L-AA	C/B-AA	H-AA
Farelo de soja	43,80	43,81	43,82	43,84
Farinha de vísceras	10,00	10,00	10,00	10,00
Milho	31,50	31,46	31,42	31,35
Farelo de trigo	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	1,00	1,00	1,00	1,00
Fosfato bicálcico	2,75	2,75	2,75	2,75
BHT (antioxidante)	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix de vitaminas¹	0,63	0,63	0,63	0,63
Ácido ascórbico ²	-	0,0286	0,0572	0,1144
NaCl	0,30	0,30	0,30	0,30

Composição calculada

Energia digestível	3060	3053	3052	3051
Proteína digestível	23,84	23,84	23,84	23,84
Proteína bruta	27,10	27,10	27,10	27,10
Fibra bruta	4,20	4,20	4,20	4,20
Extrato etéreo	4,82	4,82	4,82	4,82

¹Com ausência de AA.

²Valores calculados com base na atividade do ácido ascórbico utilizado sendo que 1g corresponde a 35% atividade da vitamina. Stay-C 35% DSM, polifosfatada protegida.

4.2. Morfologia e Morfometria

Cortes transversais (10 µm) dos fragmentos musculares congelados foram obtidos em criostato e submetidos à coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) para a análise morfológica e morfométrica das fibras musculares e à coloração por Picrosirius-Red seguindo o protocolo adaptado de MORAES et al., 2017, para a análise da área de colágeno presente nas amostras musculares. Utilizando um sistema de análise de imagens (Leica Qwin), em campos aleatórios da lâmina histológica, foi determinado o diâmetro de uma população de aproximadamente 800 fibras musculares, por animal. As fibras foram agrupadas em classes, na dependência do seu diâmetro (<10, 10 – 20, 20 – 30, 30 – 40 e > 40 µm) (adaptado de DE ALMEIDA et al., 2008). A área de colágeno foi determinada em um sistema de análise de imagens (Leica Qwin) nas mesmas imagens utilizadas para a determinação do diâmetro das fibras. A área total foi definida como a quantidade de colágeno detectado nas imagens, dividido pela média da área da fibra de cada animal, seguindo os parâmetros definidos por MORAES et al., 2017.

4.3. Cultura primária de células musculares

O protocolo para isolamento e cultura de mioblastos foi realizado conforme descrição de BOWER; JOHNSTON, 2009. Inicialmente, os peixes foram imersos em álcool 70% para esterilização das superfícies externas. Amostras da musculatura branca, próximas à região epaxial, foram coletadas em meio de extração (DMEM, 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 15% soro de cavalo e 1% antibiótico; Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, as amostras musculares foram submetidas a um processo de dissociação mecânica utilizando-se bisturis, os fragmentos resultantes foram lavados 2 vezes em meio de lavagem (DMEM, 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES e 1% antibiótico; Sigma-Aldrich, USA), sendo posteriormente centrifugados. Em seguida, foi realizada a digestão enzimática das amostras pela adição de 0,2% de collagenase tipo I (Sigma-Aldrich, USA) em meio de lavagem, durante 1 hora e 20

minutos à 25°C e sob agitação. Os fragmentos foram centrifugados e lavados 2 vezes em meio de lavagem, sendo em seguida centrifugados. Para a quebra do contato célula-célula foi realizada uma segunda etapa de digestão enzimática pela adição de 0.1% de tripsina (Sigma-Aldrich, USA) em meio de lavagem, durante 20 min à 25°C e sob agitação. A suspensão de células foi centrifugada e o sobrenadante coletado junto ao meio de extração. As amostras passaram por uma segunda digestão com tripsina, semelhante a primeira. Os sobrenadantes foram centrifugados e o pellet resultante foi ressuspensionado em meio completo (DMEM, 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 10% soro fetal bovino e 1% antibiótico; Sigma-Aldrich, USA). A suspensão de células foi filtrada em cell strainers de 100 e 40 µm (Corning, USA) e centrifugadas. As células foram ressuspensionadas novamente em meio completo, plaqueadas em câmara de Neubauer para a contagem celular e diluídas na concentração de 1x10⁶ células/mL. O plaqueamento foi realizado em placas de 12 poços previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina, e incubadas por 24h em estufa a 28°C. Os meios foram trocados diariamente e a morfologia dos mioblastos foi monitorada regularmente em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha).

Para avaliar os efeitos diretos do protocolo de restrição de nutrientes e a influência do AA na recuperação dos danos nas células musculares frente à essa situação, as culturas primárias de células musculares foram divididas nos seguintes grupos: Restrição (Dpvd - Deprived), no qual as células foram mantidas por 96 horas em meio de restrição (Earle's balanced salt solution, suplementado com 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, 2 g/l glucose, 1x MEM vitaminas, 1x antibiótico, adaptado de BOWER; JOHNSTON, 2010); Restrição e AA (Dpvd+AA), no qual as células foram mantidas por 72 horas em meio de restrição e tratadas por 24 horas com L-ascorbic acid 2-phosphate (200 µM), uma forma estável de AA e recomendada para uso em culturas celulares (IKEDA et al., 2015; SHIMA et al., 2011), diluído em meio completo. Para assegurar que os possíveis efeitos observados foram devido à suplementação de AA e não da presença dos nutrientes no meio completo, avaliamos os mesmos parâmetros em células mantidas por 72 horas em meio de restrição e 24 horas em meio completo (Dpvd +Cplt) (Fig. 6). Mantivemos também um grupo experimental no qual as células foram mantidas em meio completo ao longo do período experimental como um controle do desenvolvimento das células isoladas, no entanto, esse grupo não foi considerado nas análises estatísticas. Os experimentos foram realizados após o oitavo dia de cultura, período em que as células se diferenciaram em miotubos, e após atingir confluência de 90-100%. Os experimentos foram realizados em triplicatas, definidas por três processos independentes de isolamento das células musculares.

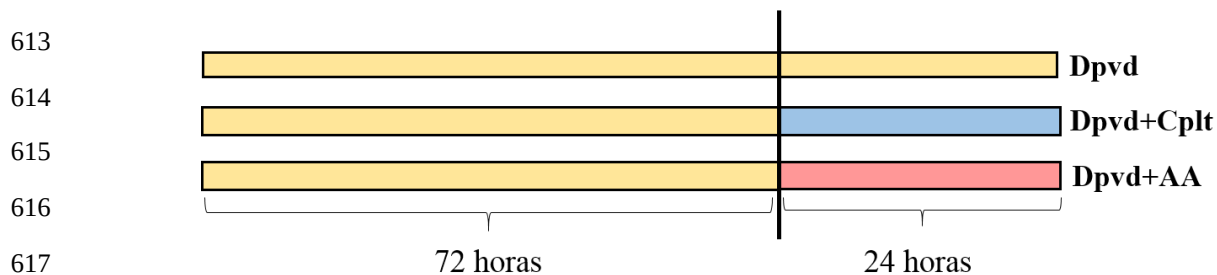


Fig. 6. Grupos experimentais avaliados nos experimentos *in vitro*: Restrição (Dpvd), Restrição + Ácido ascórbico (Dpvd+AA) e Restrição + meio completo (Dpvd+Cplt). Tratamentos representados seguindo as cores: meio completo (em azul), meio de restrição (em amarelo) e suplementação de AA (em vermelho).

4.3.1 Análise do diâmetro dos miotubos

Para avaliar o diâmetro das células musculares, imagens foram obtidas em triplicatas de cada tratamento, em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha) acoplado a câmera digital AxioCam ICc5 (Carl Zeiss Microscopy, Alemanha), no aumento de 10x. Aproximadamente 100 células musculares foram mensuradas e seu diâmetro foi definido pela média de três mensurações por célula (OHNO et al., 2018; WILLIAMSON; BUTLER; ALWAY, 2009). As análises foram realizadas utilizando o programa ImageJ® (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.3.2 Análise de migração celular

As camadas de células foram mecanicamente riscadas (“wound”) com uma ponteira de 200 µl estéril, no centro de cada poço da placa de cultura, em forma de cruz. Os debris celulares foram lavados com PBS e imagens das áreas de cortes foram obtidas após 0, 5, 10, 15, 20 e 25 horas em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha). A taxa de migração foi calculada a partir da mensuração do espaço existente entre as células (*wound closure*) e a velocidade de migração foi calculada a partir da divisão entre o espaço mensurado pelo tempo de tratamento a partir das imagens obtidas em cada intervalo de análise utilizando o programa ImageJ® (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.4. Análise da expressão gênica

4.4.1 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA

O RNA total das amostras, *in vivo* e *in vitro*, foi extraído seguindo o protocolo do reagente TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, EUA), conforme instruções do protocolo.

Para a quantificação do RNA extraído foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, EUA), que permite uma estimativa da qualidade da extração pela razão da densidade óptica a 260 nm (quantidade de RNA) e 280 nm (quantidade de proteínas). A pureza do RNA foi garantida pela obtenção de uma razão 260/280 nm superior a 1.8. Além disso, foi considerada a razão 260/230 nm maior que 2.0 que assegura contra possíveis contaminações com tampões comuns como Tris e EDTA. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4.2. Síntese do cDNA e RT-qPCR

O RNA total foi submetido ao tratamento com o kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, EUA), para eliminar qualquer possível resíduo de DNA contaminante das amostras. Para as análises de expressão dos genes, foi realizada a transcrição reversa do RNA extraído em cDNA, pelo kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Os níveis de expressão foram detectados por RT-qPCR, através da plataforma QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) através da amplificação do cDNA dos genes selecionados utilizando-se o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA) e primers desenhados a partir do transcriptoma do pacu obtido em trabalhos anteriores no nosso grupo de pesquisa (MARECO et al., 2015). Foi avaliada a expressão de genes relacionados a processos de anabolismo (*igf1*, *igfbp5*, *mtor*, *rragc*, *rps6kb1a*), catabolismo (*mafbx*, *murf1a*, *murf1b*, *fbxo25*), miogênese (*myod*, *myog*, *pax7*) e metabolismo oxidativo (*pgc1-α*, *sdha*) (Tabela 2). Três alvos foram avaliados como possíveis genes endógenos para calibração (*ppia*, *rpl13* e *rpl19*), sendo o *rpl13* o menos variável entre eles e selecionado para as posteriores análises. A quantificação relativa da expressão dos genes foi realizada pelo método do CT comparativo, $2^{\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2 – Nome, sigla e sequência dos primers dos genes avaliados

Sigla	Nome do gene	Sequência do primer
<i>igf1</i>	<i>insulin-like growth factor 1</i>	L: ATTTCAGCAAGCCAACAGGT R: CGCACAATACATCTCAAGTCG
<i>igfbp5</i>	<i>igf binding protein 5</i>	L: ACAAATGGCCTGTGAGAAGG R: GCACTGAGCATGAATCAGGA
<i>mtor</i>	<i>serine/threonine-protein kinase TOR</i>	L: TTGGGAGAGACGTACTGC R: CACAGGACTGGTGTAGGAA
<i>rragc</i>	<i>ras-related GTP-binding</i>	L: GCAACTGAGGGATGAGCTTC R: CACCAGCGAGCTAATGATGA
<i>rps6kb1a</i>	<i>ribosomal protein S6 kinase 1a</i>	L: ATGCTCTCTGTGCCTTGGT R: CCGACGAAGAACTTGAGGAG
<i>mafbx</i>	<i>muscle atrophy F-box protein/ F-box protein 32</i>	L: TCTTTGGTGCTCCCCTTGTG R: TAAAACCGAGGACGGCTGG
<i>murf1a</i>	<i>muscle-specific ring finger protein 1/ tripartite motif-containing 63a</i>	L: ATGTTGCTGTTGTCCATACTCTG R: ATCACATCACCCAGGAGCA
<i>murf1b</i>	<i>muscle-specific ring finger protein 1/ tripartite motif-containing 63b</i>	L: GGCTCGGGTCTCTCCTCGG R: CCAGGCGTTACGGAGACC
<i>fbxo25</i>	<i>f-box protein 25</i>	L: CGTAGGTGAAGTAGCCGCCA R: GGAGAAGTCCAGCCTGTTGA
<i>myod</i>	<i>myoblast determination protein 1 homolog</i>	L: GGGTCGTCGTTAGAAGTCGTC R: TTTTGGTTCGGAAGAGATGG
<i>myog</i>	<i>myogenin</i>	L: CAGACCAGAGGTTTTATGAA R: TAGATGTTGGGGATGGCTTG
<i>pax7</i>	<i>paired box 7a</i>	L: CATTCGACAGATCTCGGCG R: GACTCCGCTGGAGCTAGACAC
<i>pgc1-α</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>	L: GAGGGTGAGCGTTCAAAGAG R: ATGAGGCTGAGCAGAGAGGA
<i>sdha</i>	<i>succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit a</i>	L: ACCTGATGCTGAATGCTGTG R: AGTGTGCTTCCTCCAGTGC
<i>rpl13</i>	<i>60S ribosomal protein L13</i>	L: ATCAACAGGAAAGTAGCCC R: AGGATGAGTTTGGAGCGGTA
<i>rpl19</i>	<i>60S ribosomal protein L19</i>	L: GCAAACCTGGTGAAGGATGGT R: CTTGGACTCCCTGTAACGCC
<i>ppia</i>	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a</i>	L: ATTGTGGTTTCGTGAAGTCGC R: CCGCTGGGCAGAGTGATTAT

4.5 Heatmap

Para sumarizar nossos dados de expressão gênica *in vivo*, a partir do software Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>), construímos um heatmap com a representação dos dados de expressão dos genes avaliados em todos os grupos ao longo do período experimental. Para isso, foram plotadas as médias dos dados de expressão de cada gene alvo normalizado pelo valor de expressão de gene endógeno (ΔCt) em cada grupo experimental refletindo seu nível de expressão, sendo os genes com menor expressão representados em azul e os de maior expressão em vermelho.

4.6 Análise de enzimas antioxidantes

Para análise da atividade das enzimas antioxidantes, as proteínas totais das amostras, *in vivo* e *in vitro*, foram extraídas utilizando tampão de extração pH 7,4 (Tris 50mM, NaCl 0,2 M, Triton X-100 0,1%, $CaCl_2$ 10mM) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich), seguido por um processo de centrifugação e coleta do sobrenadante. Em seguida, o conteúdo proteico total foi quantificado segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina sérica bovina como padrão. Após a quantificação, a concentração das proteínas das amostras foi ajustada para as análises posteriores.

A análise da atividade das enzimas antioxidantes foi realizada em parceria com o Laboratório de Nutrição e Saúde de Peixes – AquaNutri da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. A atividade da enzima antioxidante catalase (Cat; EC 1.11.1.6) foi determinada pela redução do dicromato de potássio em ácido acético (proporção 3:1) para acetato de cromo, na presença de H_2O_2 de acordo com SINHA, 1972. Em cada reação foram adicionados 100 μ l de amostra na concentração de 6 ug/ μ l, 500 μ l de H_2O_2 e 2000 μ l de dicromato de potássio diluído em ácido acético. A leitura da atividade da enzima foi realizada em espectrofotômetro a 610 nm, uma vez que não há interferência do dicromato na leitura nessa faixa de análise.

A atividade da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (Gpx; EC 1.11.1.9) foi mensurada como descrito por FLOHÉ; GÜNZLER, 1984. Em cada reação foram adicionados 300 μ l de tampão fosfato (pH 7,4), 200 μ l de glutathiona reduzida (2 mM), 100 μ l de H_2O_2 e 300 μ l de amostra na concentração de 3 ug/ μ l. Posteriormente, a reação foi aquecida a 37°C por 15 minutos e 500 μ l de ácido tricloro acético (5%) foram adicionados para estabilizar a reação. Em seguida, após centrifugação, para cada 100 μ l do sobrenadante coletado, foram adicionados 200 μ l de tampão fosfato (pH 7,4) e 700 μ l de DTNB (0,4 mg/ml). A leitura da atividade da enzima foi realizada em espectrofotômetro a 320 nm.

A atividade da enzima superóxido dismutase (Sod, EC 1.15.1.1) foi mensurada seguindo o protocolo estabelecido em BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971. Em cada reação foram adicionados 50µl de amostra na concentração de 6 ug/ul, 2000µl de tampão fosfato (pH 7,8), 250µl de NBT (33 mmol/L), 200µl de EDTA (0,66 mmol/L), 250µl de metionina (10 mmol/L) e 250µl de riboflavina (0,0033 mmol/L). A leitura da atividade foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. A atividade das enzimas antioxidantes foi expressa em U.mg pt⁻¹.

4.7 Análise estatísticas

As comparações foram realizadas entre todos os grupos experimentais somente dentro de cada período de análise. Após a realização do teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), para a análise de peso corporal, comprimento, diâmetro das fibras e área de colágeno nos grupos C e F, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para a análise desses mesmos parâmetros nos grupos C, L-AA, B-AA e H-AA foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Para a análise da atividade das enzimas antioxidantes e da expressão gênica nos grupos C e F foi utilizado o Teste-t e para os grupos C, L-AA, B-AA e H-AA o teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. As comparações foram realizadas entre os grupos, em cada período experimental.

As comparações entre os diâmetros dos miotubos nos grupos experimentais *in vitro* foram realizadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Para análise da expressão gênica, atividade de enzimas antioxidantes e da técnica de *wound healing* foi utilizado o teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Para todos os testes, o intervalo de confiança adotado foi de 95% (ZAR, 2009).

5. Resultados

5.1 Parâmetros biométricos

Os animais submetidos ao período de jejum (grupo F) apresentaram diminuição do peso e comprimento em relação ao grupo Control (C). Após a realimentação, esses parâmetros foram similares entre os grupos, independentemente do nível de AA adicionado à ração (Fig. 7).

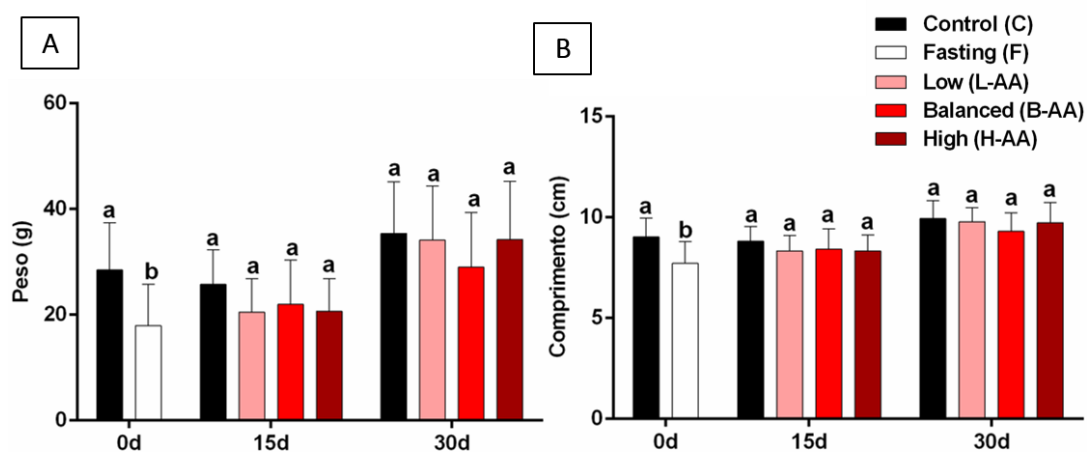


Fig. 7. Peso (A) e comprimento (B) dos grupos Control e Fasting após jejum (0d) e Control, Low, Balanced e High-supplementation após realimentação (15d e 30d). Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP (desvio padrão). Teste de Mann-Whitney para os grupos Control e Fasting e Kurskall-Wallis para os grupos realimentados ($p < 0,05$).

5.2. Análises morfológicas

5.2.1. Morfometria do diâmetro das fibras musculares

Ao longo do período experimental, as fibras musculares dos animais de todos os grupos apresentaram parâmetros morfológicos normais, como formato poligonal ou arredondado, núcleos periféricos e distribuição de fibras com diferentes diâmetros, característico de músculo de peixes em crescimento (Fig. 8).

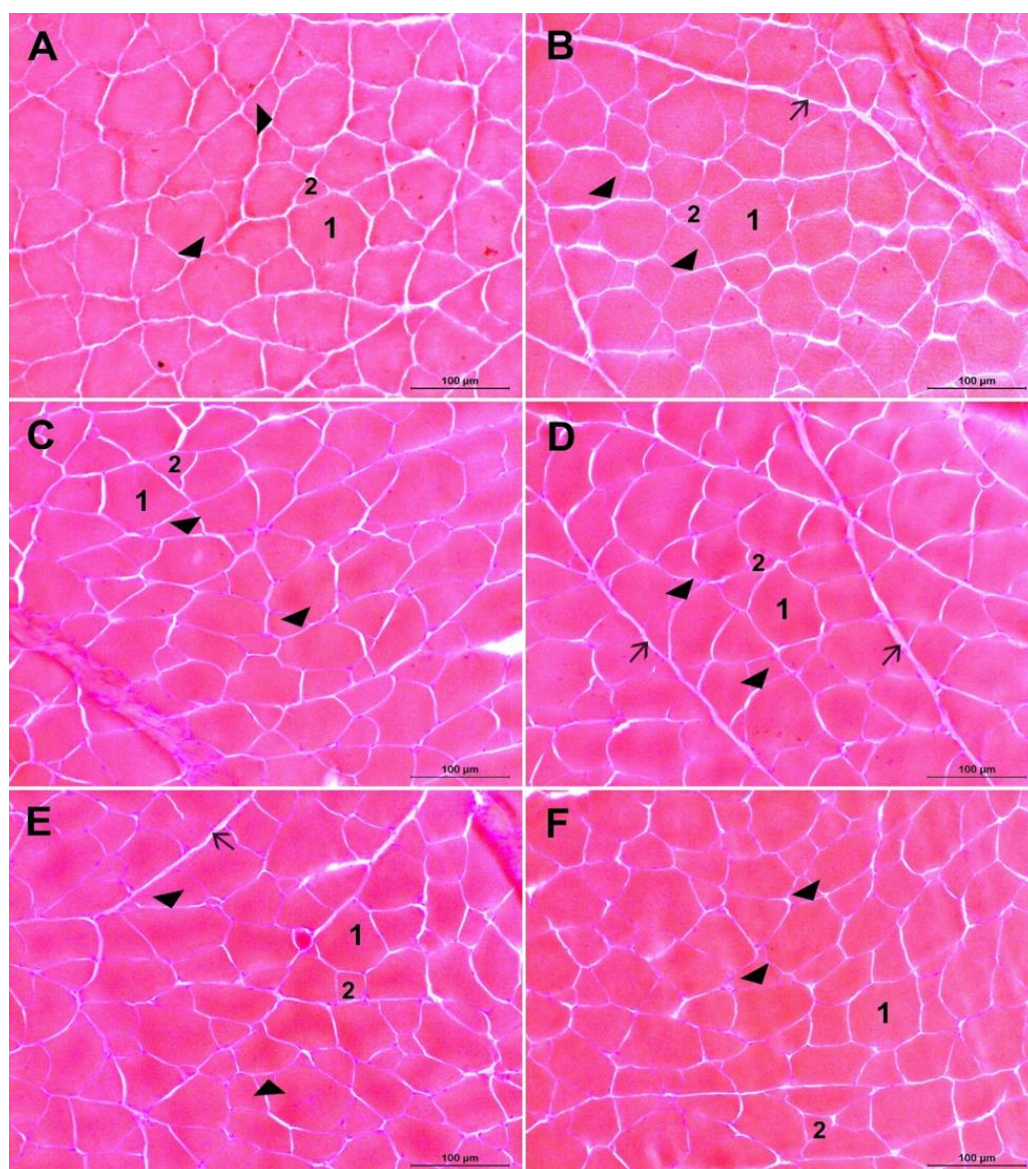


Fig. 8. Corte transversal da musculatura branca de pacus nos grupos (A) Control e (B) Fasting após 15 dias de jejum e nos grupos (C) Control (D) Low (E) Balanced e (F) High-supplementation após 30 dias de realimentação. Distribuição de fibras musculares em mosaico, com fibras grandes (1), intercaladas por fibras pequenas (2). Presença de perímísio (seta) e endomísio (arrowhead). Coloração por Hematoxilina e Eosina. Aumento de 20x. Escala: 100µm.

Em relação ao diâmetro das fibras, após o jejum, os animais apresentaram aumento na frequência de fibras de menores diâmetros (10–20 µm) e diminuição na frequência de fibras de maiores diâmetros (> 40 µm) em relação ao grupo C (Fig.9).

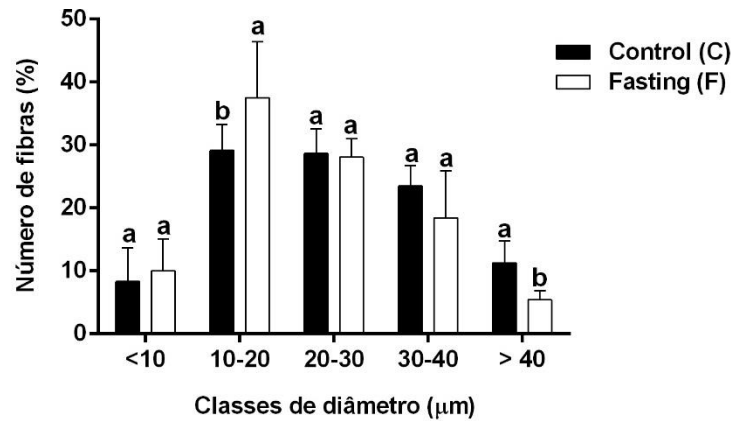


Fig. 9. Morfometria das fibras musculares dos grupos Control e Fasting após jejum. Distribuição da frequência de fibras musculares em classes de diâmetro. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Após 15 dias de realimentação, os animais dos grupos L-AA e B-AA, apresentaram maior frequência de fibras nas classes de menores diâmetros (10-20 μ m) e menor frequência na classe de maior diâmetro (>40 μ m) em relação ao grupo C, enquanto o grupo H-AA, foi estatisticamente similar ao grupo C e aos grupos realimentados durante esse período de análise (Fig.10).

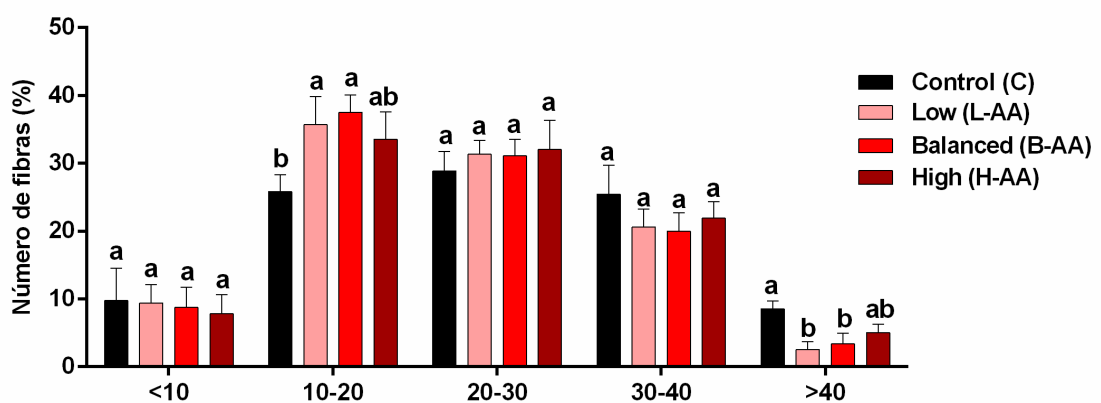


Fig. 10. Morfometria das fibras musculares dos grupos Control, Low, Balanced e High-supplementation após 15 dias de realimentação. Distribuição da frequência de fibras musculares em classes de diâmetro. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de Kurskall-Wallis ($p < 0,05$).

Após 30 dias de realimentação, os animais dos grupos L-AA e B-AA apresentaram menor frequência de fibras na classe de maior diâmetro ($> 40 \mu\text{m}$) comparado ao grupo C, enquanto os animais do grupo H-AA se igualaram ao grupo C em relação à essa classe de diâmetro (Fig. 11).

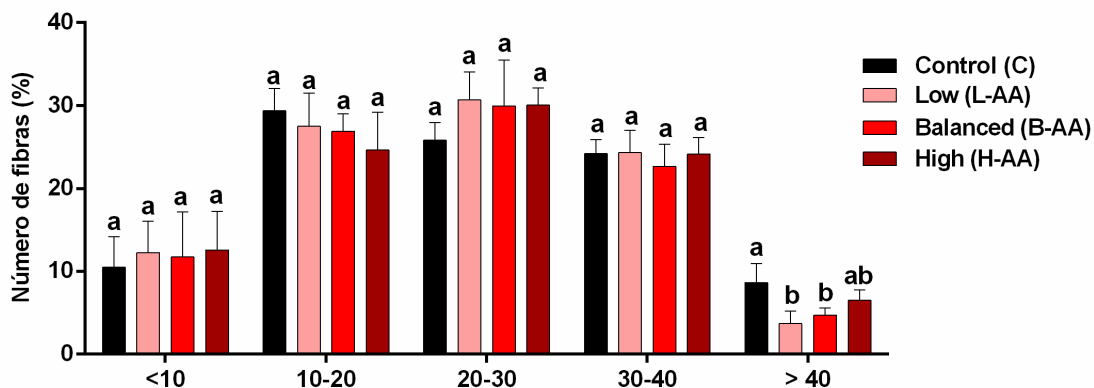


Fig. 11. Morfometria das fibras musculares dos grupos Control, Low, Balanced e High-supplementation após 30 dias de realimentação. Distribuição da frequência de fibras musculares em classes de diâmetro. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de Kurskall-Wallis ($p < 0,05$).

5.2.2 Quantificação de colágeno

Ao longo do período experimental, não encontramos diferenças significativas na área de colágeno nas regiões do endomísio e perimísio no tecido muscular do pacu, entre os grupos analisados (Figs.12 e 13).

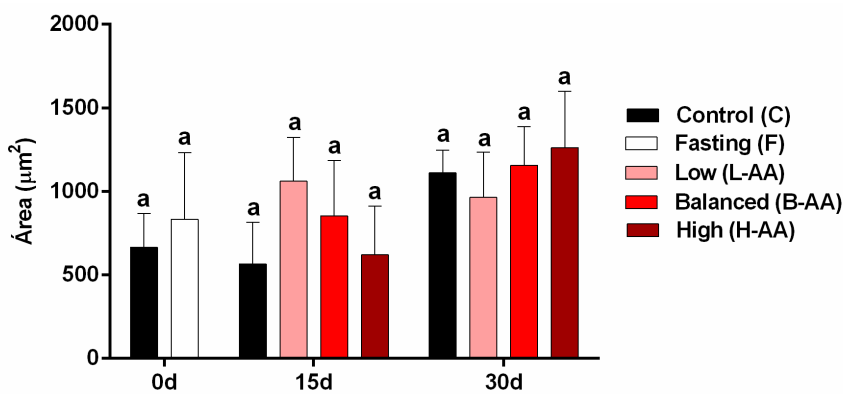


Fig. 12. Área total de fibras colágenas na musculatura branca nos grupos Control e Fasting após jejum (0d) e Control, Low, Balanced e High-supplementation após realimentação (15d e 30d). Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos.

Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de Mann-Whitney para os grupos Control e Fasting e Kurskall-Wallis para os grupos realimentados ($p < 0,05$).

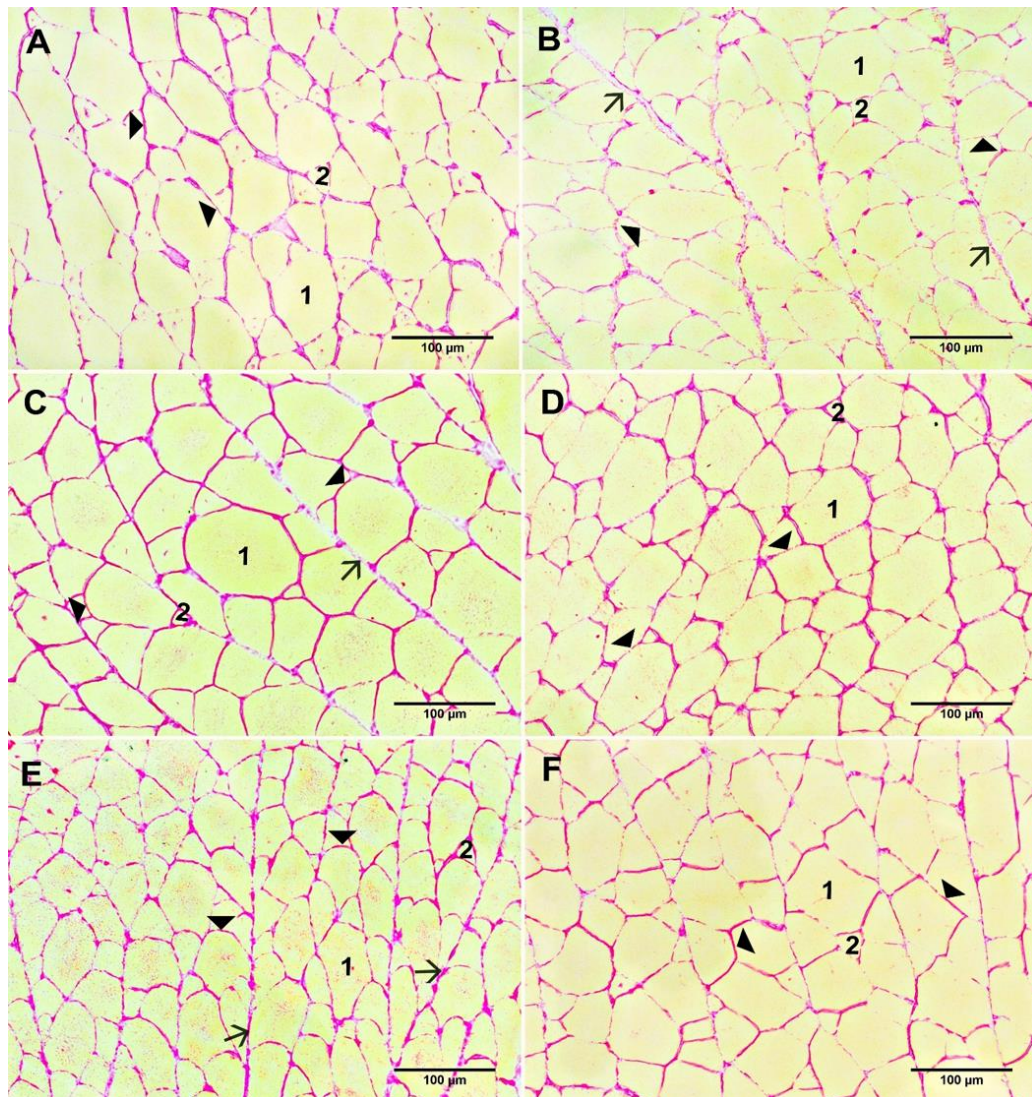


Fig. 13. Corte transversal da musculatura branca de pacus nos grupos (A) Control e (B) Fasting após 15 dias de jejum e nos grupos (C) Control, (D) Low, (E) Balanced e (F) High-supplementation após 30 dias de realimentação. Distribuição de fibras musculares em mosaico, com fibras grandes (1), envoltas por fibras pequenas (2). Presença de perímio (seta) e endomísio (arrowhead). Coloração por Picrosirius-Red. Aumento de 20x. Escala: 100 μ m.

5.3. Análise da expressão gênica

Ao final do período de jejum, a expressão dos genes relacionados às vias de anabolismo (*igf1*, *igbp5*, *mtor*, *rragc* e *rps6kb1a*) diminuiu no grupo F em relação ao grupo C.

Após a realimentação, aos 15 dias, a expressão de *igf1* diminuiu nos grupos realimentados comparado ao grupo C, parâmetro que se manteve baixo no grupo B-AA em relação os grupos L-AA e H-AA aos 30 dias. Após 6 horas de realimentação houve aumento na expressão de *igbp5* no grupo H-AA comparado ao grupo C, seguido por diminuição aos 15 dias nos grupos realimentados comparado ao grupo C e posterior aumento no grupo H-AA, aos 30 dias, em relação ao grupo B-AA. A expressão de *mtor* diminuiu aos 15 dias no grupo L-AA comparado ao grupo C e no grupo B-AA, aos 30 dias, em relação aos outros grupos. Observamos também um aumento na expressão de *rragc* no grupo H-AA após 6 horas de realimentação em relação aos demais grupos, parâmetro que se manteve elevado nesse mesmo grupo, aos 15 dias, em relação ao grupo L-AA. Após 6 horas de realimentação, houve aumento na expressão de *rps6kb1a* no grupo H-AA em relação aos demais grupos, seguido por uma diminuição no grupo L-AA aos 15 dias comparado aos outros grupos e posterior aumento, nesse mesmo grupo, após 30 dias de realimentação em relação aos grupos C e B-AA (Fig.14 e 18).

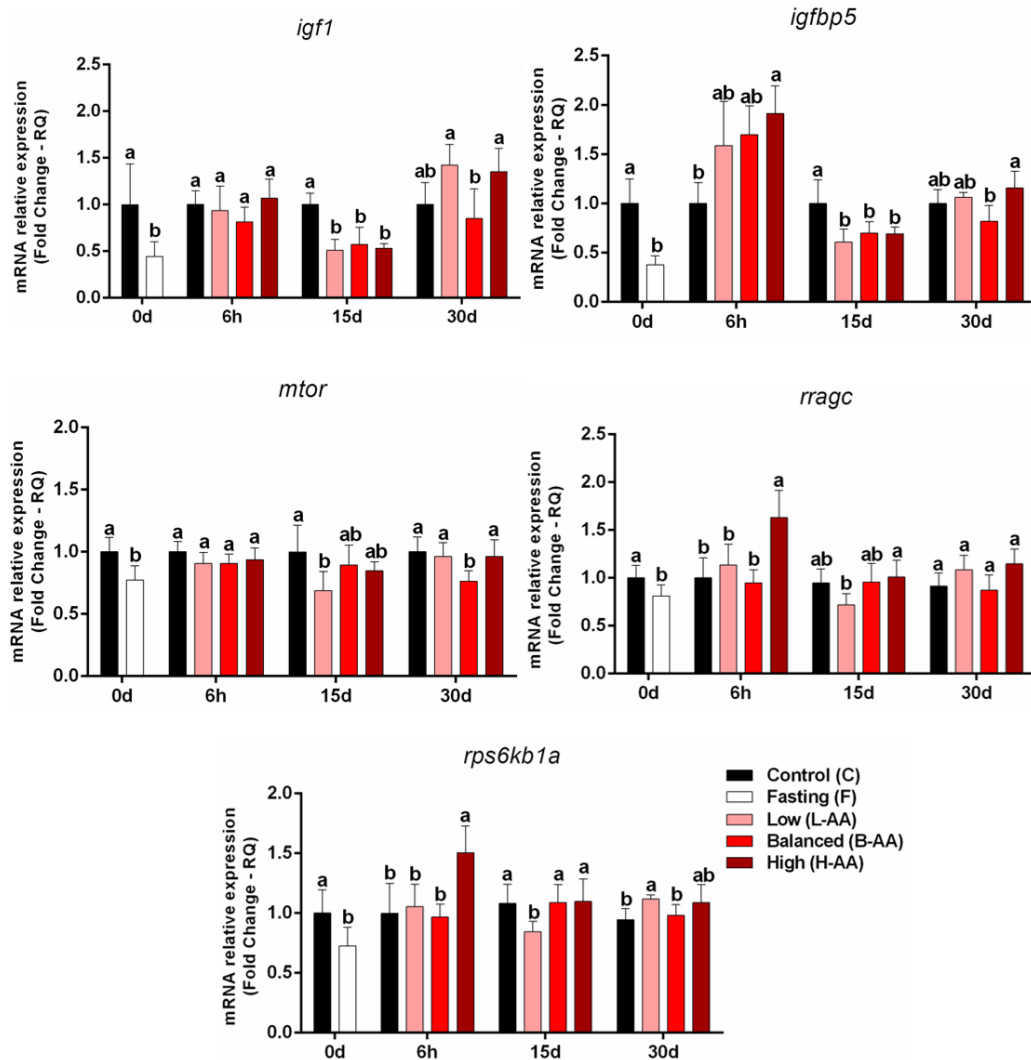


Fig. 14. Expressão de genes relacionados as vias de anabolismo nos grupos Control e Fasting após jejum (0d) e Control, Low, Balanced e High-supplementation após realimentação (6h, 15d e 30d). Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste t para comparações entre os grupos Control e Fasting e ANOVA one-way para os grupos realimentados ($p < 0,05$).

Em relação aos genes catabólicos, houve um aumento na expressão de *mafbx*, *murf1a* e *fbxo25* no grupo F ao final do jejum. A expressão de *mafbx* se manteve elevada nos grupos realimentados após 6 horas, seguida por uma diminuição no grupo L-AA, aos 15 dias, comparado aos outros grupos realimentados e posterior aumento no grupo H-AA em relação aos grupos C e B-AA, aos 30 dias. A expressão de *fbxo25* também se manteve elevada após 6 horas de realimentação no grupo B-AA comparado aos grupos C e H-AA. Em relação ao gene *murf1a*, observamos diminuição tanto após 6 horas quanto aos 15 dias de realimentação nos grupos realimentados, parâmetro mantido baixo nos grupos L-AA e H-AA aos 30 dias. A

expressão de *murf1b* não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais ao longo do período de análise (Fig.15 e 18).

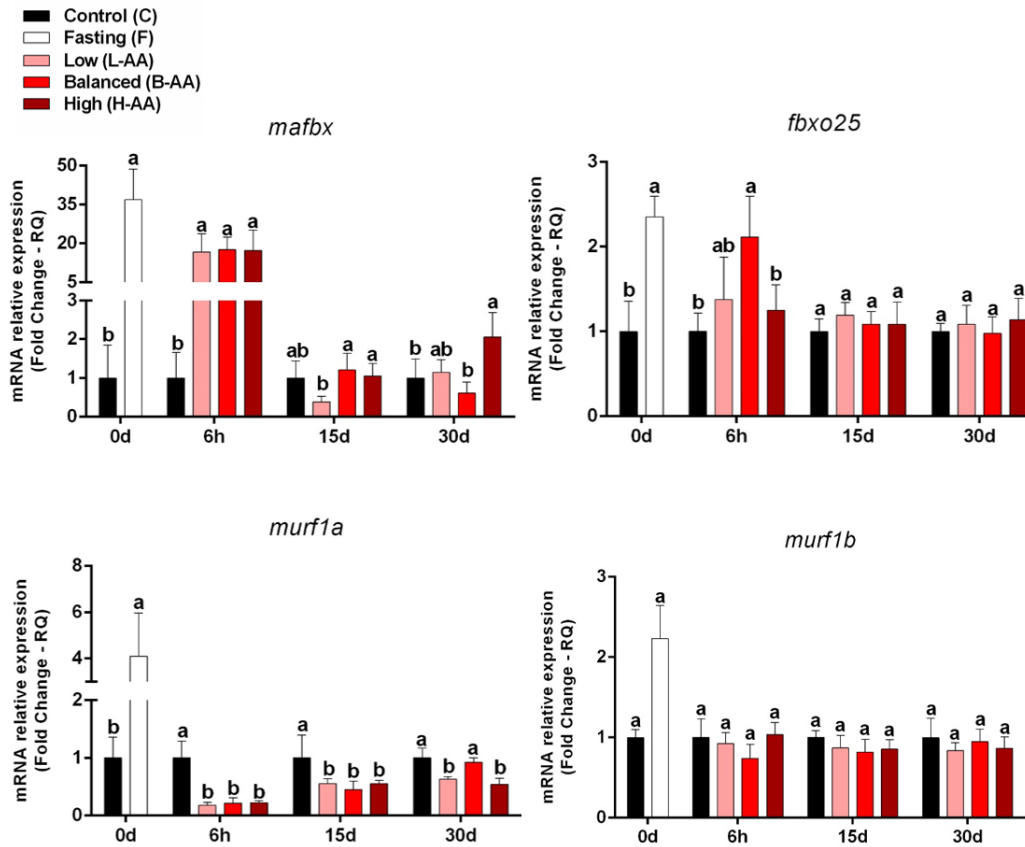


Fig. 15. Expressão de genes relacionados as vias de catabolismo nos grupos Control e Fasting após jejum (0d) e Control, Low, Balanced e High-supplementation após realimentação (6h, 15d e 30d). Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste t para comparações entre os grupos Control e Fasting e ANOVA one-way para os grupos realimentados ($p < 0,05$).

Considerando os processos miogênicos, após o jejum houve diminuição somente na expressão de *myod* no grupo F. A expressão desse gene aumentou no grupo H-AA ao longo do período experimental, diferindo do grupo C após 6 horas de realimentação, diferiu dos grupos L-AA e B-AA aos 15 dias e do grupo C após 30 dias de realimentação. Observamos também uma diminuição na expressão de *myog* nos grupos B-AA e H-AA aos 15 dias de realimentação comparado aos grupos C e L-AA e nos grupos L-AA e H-AA aos 30 dias em relação aos grupos C e B-AA. Em relação ao gene *pax7* houve aumento em sua expressão após 6 horas de realimentação no grupo H-AA em relação aos demais grupos, o que se manteve elevado aos 15 dias em comparação ao grupo L-AA. Aos 30 dias de realimentação,

houve diminuição na expressão desse gene no grupo H-AA comparado ao grupo C (Fig. 16 e 18).

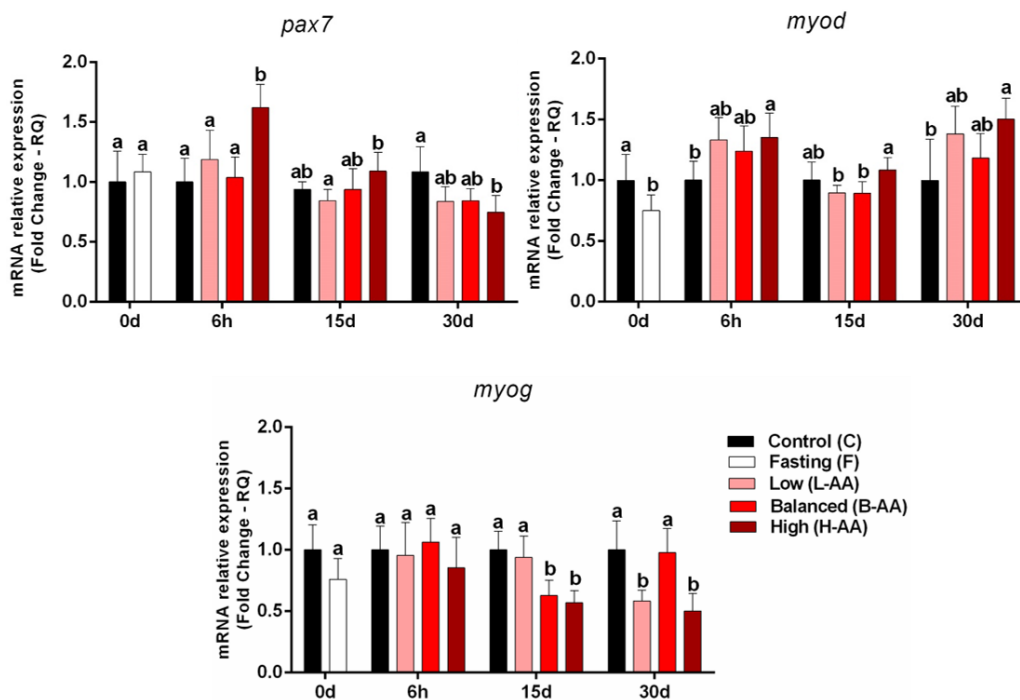


Fig. 16. Expressão de genes relacionados aos processos miogênicos nos grupos Control e Fasting após jejum (0d) e Control, Low, Balanced e High-supplementation após realimentação (6h, 15d e 30d). Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste t para comparações entre os grupos Control e Fasting e ANOVA one-way para os grupos realimentados ($p < 0,05$).

Após o período de jejum, houve aumento na expressão de *pgc1a* no grupo F. Aos 15 dias de realimentação houve aumento na expressão desse gene nos grupos B-AA e H-AA em relação ao grupo L-AA. Após 30 dias de realimentação, houve um expressivo aumento na expressão desse gene no grupo H-AA em relação aos demais grupos e no grupo B-AA em relação os grupos C e L-AA. Aos 15 dias, também observamos uma diminuição na expressão de *sdha* no grupo L-AA comparado ao grupo C (Fig. 17 e 18).

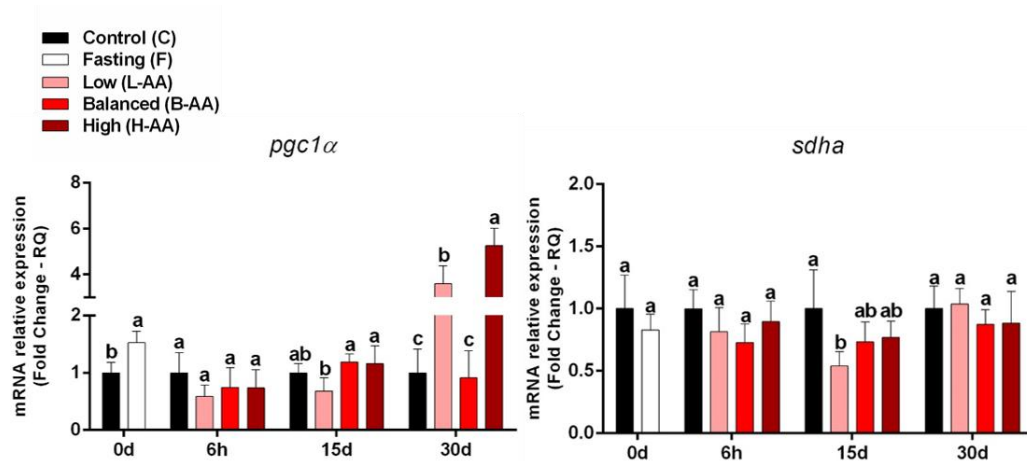


Fig. 17. Expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo nos grupos Control e Fasting após jejum (0d) e Control, Low, Balanced e High-supplementation após realimentação (6h, 15d e 30d). Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste t para comparações entre os grupos Control e Fasting e ANOVA one-way para os grupos realimentados ($p < 0,05$).

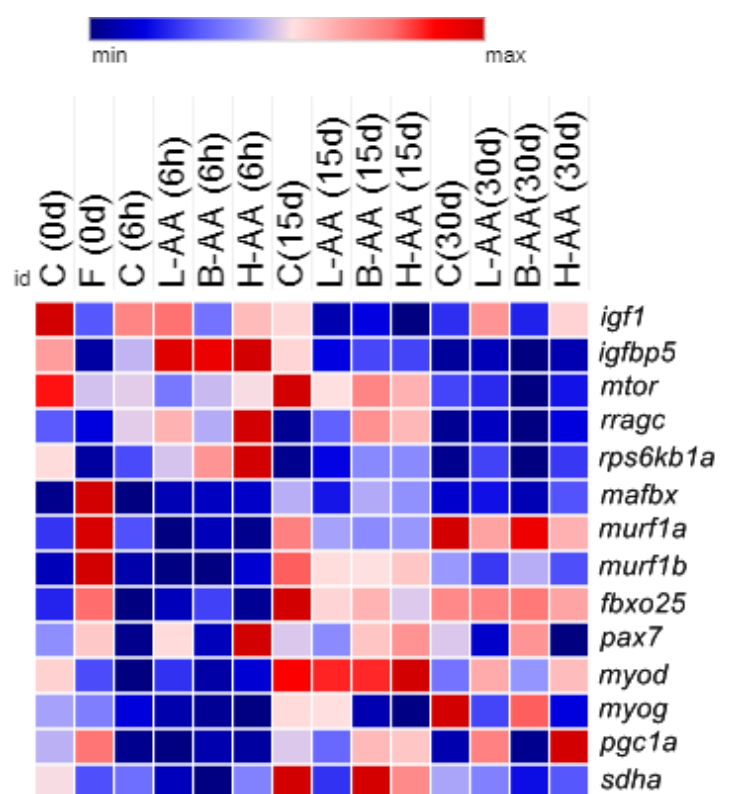


Fig.18. Heatmap resumindo a expressão dos genes avaliados ao longo do período experimental (eixo horizontal) nos grupos Control, Fasting, Low, Balanced e High-

supplementation (eixo vertical). Maiores níveis de expressão em vermelho e menores níveis de expressão em azul. Dados expressos através da média de ΔCt , por grupo experimental.

5.4. Atividade de enzimas antioxidantes

Após 6 horas de realimentação, observamos uma diminuição na atividade da enzima catalase (Cat) nos grupos B-AA e H-AA em relação ao grupo L-AA; esse parâmetro se manteve baixo aos 30 dias de realimentação no grupo H-AA em relação aos demais grupos. Após 6 horas e 15 dias de realimentação, houve um aumento na atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx), nos grupos realimentados em relação ao grupo C. Ao longo do período experimental não encontramos diferença na atividade de superóxido dismutase (Sod) entre os grupos analisados (Fig. 19).

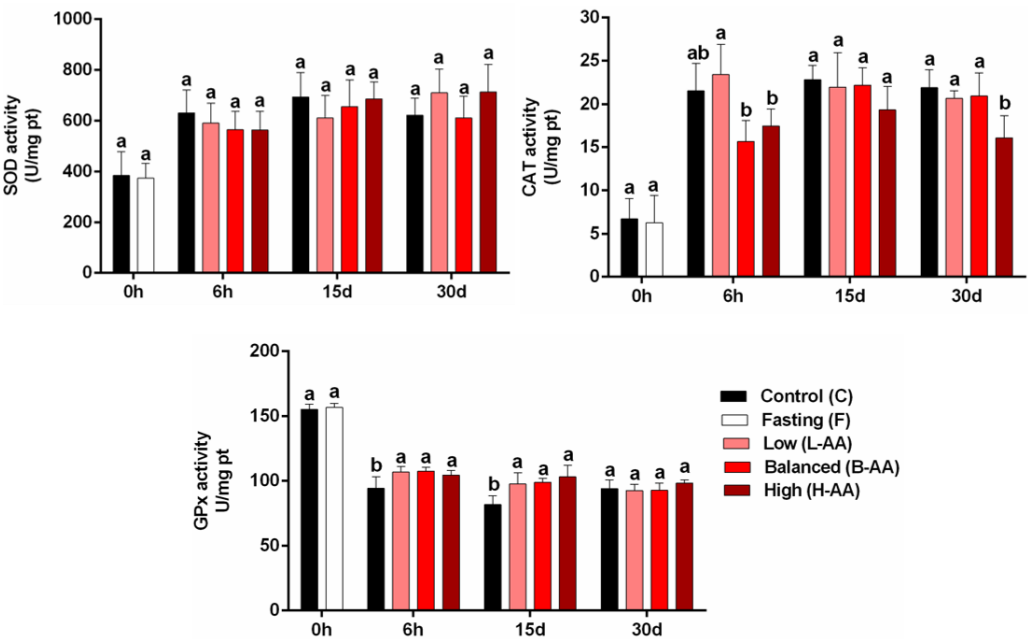


Fig. 19. Atividade das enzimas antioxidantes nos grupos Control e Fasting após jejum (0d) e Control, Low, Balanced e High-supplementation após realimentação (6h, 15d e 30d). Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste t para comparações entre os grupos Control e Fasting e ANOVA one-way para os grupos realimentados ($p < 0,05$).

5.5. Cultura celular primária

5.5.1 Análise morfométrica

Após as 96 horas de restrição de nutrientes houve diminuição no diâmetro dos miotubos no grupo Dpvd. Após o reestabelecimento das condições normais de crescimento, observamos aumento no diâmetro dos miotubos no grupo Dpvd+Cplt em relação ao grupo Dpvd e no grupo Dpvd +AA comparado aos grupos Dpvd e Dpvd +Cplt (Fig.20).

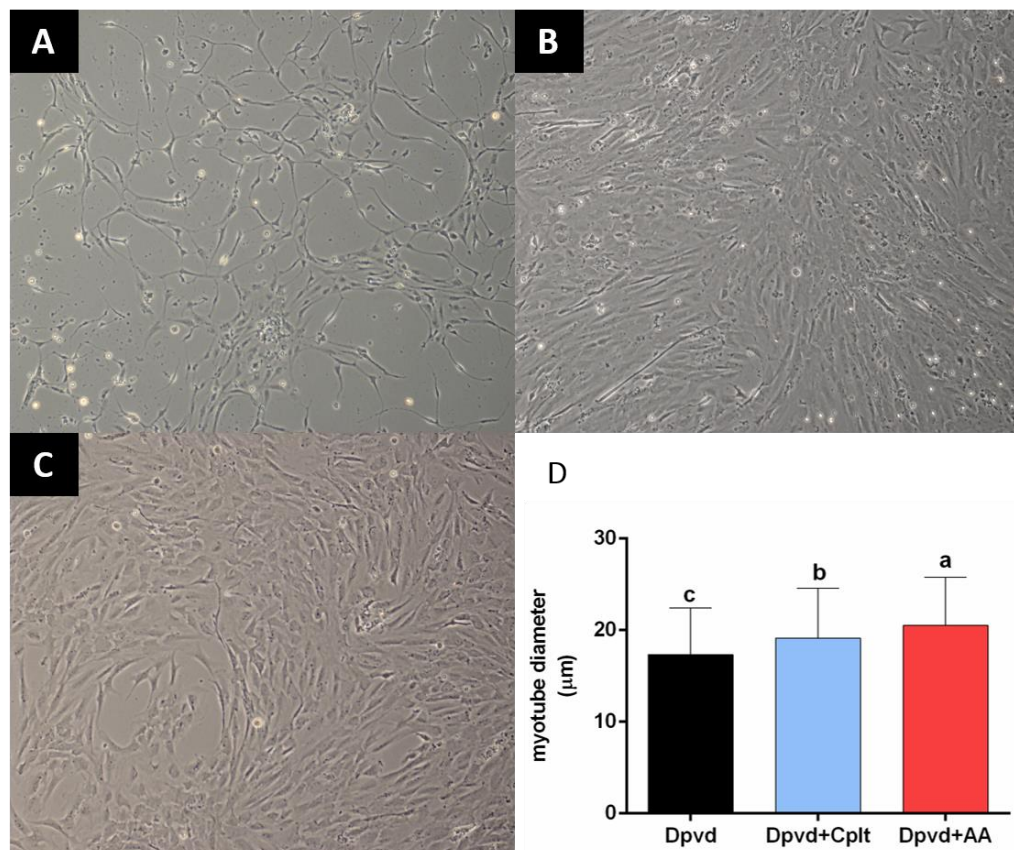


Fig. 20. Cultura primária de células musculares de pacu e diâmetro dos miotubos nos grupos (A) Dpvd, (B) Dpvd+Cplt, e (C) Dpvd+AA. Imagens obtidas em microscópio invertido. Aumento de 10x. Escala: 100 μm. (D) Diâmetro dos miotubos nos grupos Dpvd, Dpvd +Cplt e Dpvd+AA. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média ± DP. Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

5.5.2 Ensaio de migração celular

A partir dos resultados de “wound closure” observamos que a taxa de migração celular foi semelhante entre os grupos experimentais desde o início até 15 horas de tratamento. Após 20 e 25 horas, observamos maiores taxas de migração no grupo Dpvd+Cplt em relação ao

grupo Dpvd. Em relação a velocidade em que as células migraram, após 15 horas de tratamento o grupo Dpvd+AA teve uma maior taxa de migração em relação ao grupo Dpvd e após 25 horas de tratamento, os grupos Dpvd+AA e Dpvd+Cplt apresentaram maiores taxas de migração em relação ao grupo Dpvd (Fig.21).

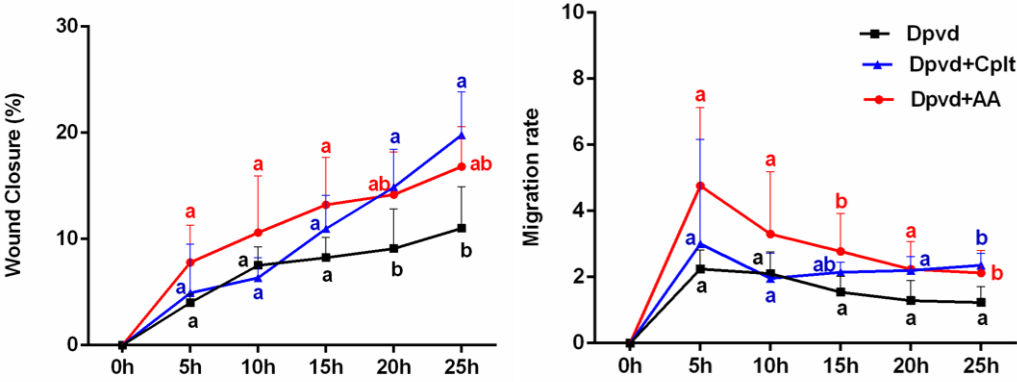


Fig. 21. Migração celular. Análises realizadas após 5, 10, 15, 20 e 25 horas de tratamento nos grupos Dpvd, Dpvd+Cplt e Dpvd+AA. Porcentagem de fechamento (*wound closure*) e taxa de migração (*migration rate*) representando a variação no espaço a ser fechado por período de análise. Dados representados em média e DP. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Teste de ANOVA one-way ($p < 0,05$).

5.5.3 Atividade de enzimas antioxidantes

Ao final do período experimental, observamos um aumento na atividade da enzima catalase (Cat) nos grupos Dpvd+Cplt e Dpvd+AA em relação ao grupo Dpvd e aumento na atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no grupo Dpvd+AA em relação ao grupo Dpvd (Fig. 22).

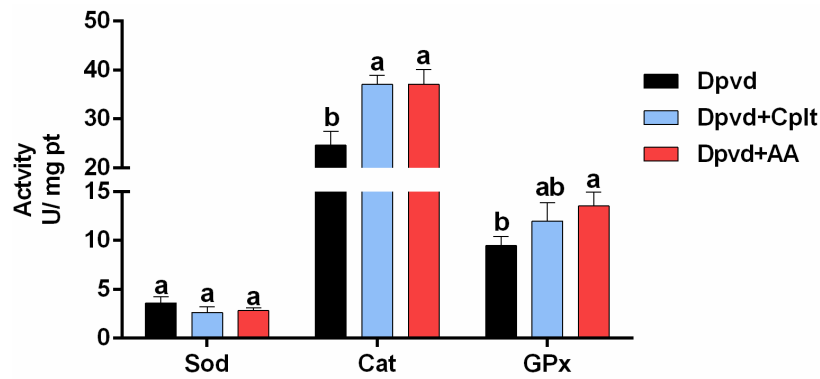


Fig. 22. Atividade das enzimas antioxidantes nos grupos Dpvd, Dpvd+Cplt, e Dpvd+AA. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de ANOVA one-way ($p < 0,05$).

5.5.4 Expressão gênica

Em relação aos genes envolvidos nos processos anabólicos, houve aumento na expressão de *igf1* no grupo Dpvd +AA comparado aos outros grupos, acompanhado por um aumento na expressão de *mtor* nos grupos Dpvd+Cplt e Dpvd+AA comparado ao grupo Dpvd. A expressão de *rps6kb1a* também aumentou no grupo Dpvd+Cplt comparado ao grupo Dpvd e no grupo Dpvd+AA em relação aos outros grupos experimentais. Considerando os genes catabólicos, houve diminuição na expressão de *mafbx* e *fbxo25* nos grupos Dpvd+Cplt e Dpvd+AA comparado do grupo Dpvd. Além disso, observamos um aumento na expressão de *myod* nesses mesmos grupos ao final do período experimental (Figs. 23, 24 e 25).

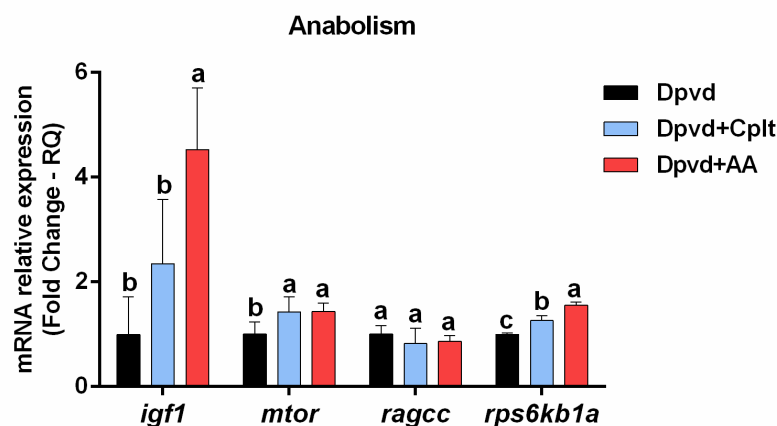


Fig. 23. Expressão de genes envolvidos nas vias de anabolismo nos grupos Dpvd, Dpvd+Cplt e Dpvd+AA. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de ANOVA one-way ($p < 0,05$).

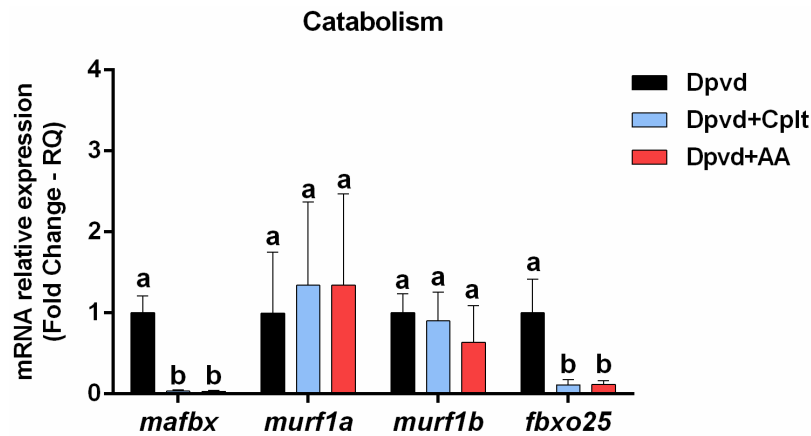


Fig. 24. Expressão de genes envolvidos nas vias de catabolismo nos grupos Dpvd, Dpvd+Cplt e Dpvd+AA. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de ANOVA one-way ($p < 0,05$).

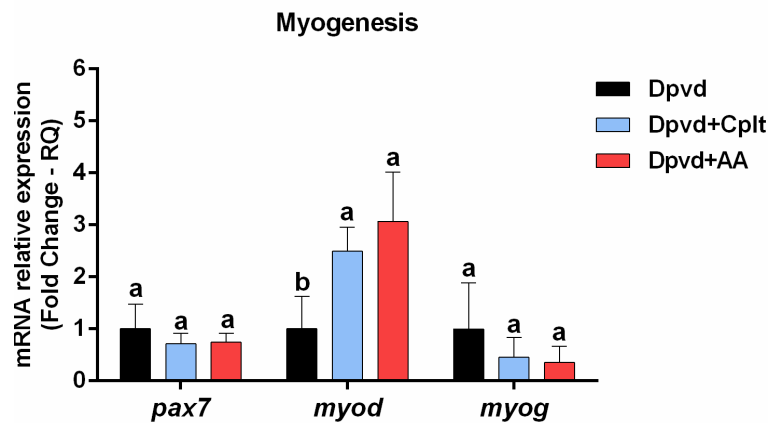


Fig. 25. Expressão de genes envolvidos nos processos miogênicos nos grupos Dpvd, Dpvd+Cplt e Dpvd+AA. Letras diferentes indicam diferenças significativamente estatísticas entre os grupos. Dados representados em média $\pm$ DP. Teste de ANOVA one-way ($p < 0,05$).

6. Discussão

O tecido muscular esquelético é composto majoritariamente de proteínas. Além de exercerem funções estruturais e contráteis, em situações de restrição alimentar, as proteínas podem ser degradadas e utilizadas como fonte de aminoácidos (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). No presente estudo, encontramos diminuição no diâmetro das fibras, aumento na expressão dos genes catabólicos e diminuição de genes anabólicos nos animais submetidos ao jejum. Após um curto período de realimentação (6 horas), houve um aumento na expressão de genes anabólicos e miogênicos nos animais com maior suplementação de AA (grupo H-AA). Aos 15 dias, houve diminuição geral na expressão dos genes no grupo L-AA, além de recuperação no diâmetro das fibras e aumento na expressão dos genes miogênicos no grupo H-AA. Ao final do período de realimentação, apenas o grupo H-AA apresentou recuperação no diâmetro das fibras musculares, além de melhora do metabolismo oxidativo (aumento na expressão de *pgc1α*) e aumento na expressão de *myod*. Além disso, a maior suplementação com AA promoveu diminuição na atividade da enzima antioxidante catalase.

Períodos de jejum compreendem parte da vida de diversas espécies de peixes e podem ocorrer devido a diferentes condições, como migração, reprodução e contextos de escassez de alimentos. A mobilização de reservas metabólicas permite que os animais sobrevivam frente a esse desafio (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995). No presente estudo, os animais submetidos ao jejum apresentaram perda de massa muscular representada pelo aumento da frequência de fibras pequenas (classe 10-20 μm) e diminuição das maiores fibras (classe $>40 \mu\text{m}$). Além disso, esses animais tiveram diminuição no comprimento e peso corporal, o que demonstra os efeitos do jejum no organismo como um todo. A perda de massa muscular, representada por essas mesmas características, também foi observada em outras espécies de peixes como tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) juvenis submetidos a 5 dias de jejum (NEBO et al., 2013), em *Ctenopharyngodon idellus* submetidos a 14 dias de jejum (XU et al., 2019), em pacus no estágio larval submetidos a 15 dias de jejum (LEITÃO et al., 2011) e juvenis submetidos a 30 dias de jejum (KUNIYOSHI et al., 2019). Além disso, *Pleuronectes platessa* submetidos a 4 meses de jejum, apresentaram diminuição no diâmetro das fibras e vesículas similares à lisossomos no tecido muscular, indicando a ocorrência do processo de atrofia muscular em decorrência dessa situação (JOHNSTON, 1981).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre normalmente em organismos aeróbicos principalmente devido ao metabolismo mitocondrial e, quando em altas concentrações, essas moléculas podem ocasionar danos celulares (revisado por TURRENS, 1997). Situações de restrição de nutrientes desencadeiam um aumento na produção de ROS,

caracterizando um processo de estresse fisiológico (RODRÍGUEZ-VARGAS et al., 2012), o que pode levar à inibição do crescimento muscular. A vitamina C, ou sua forma reduzida, o ácido ascórbico, é considerada um dos mais efetivos agentes antioxidantes, podendo inibir uma série de moléculas danosas aos organismos (COMBS; MCCCUNG, 2017). Esse composto pode prevenir diferentes reações maléficas como a peroxidação de lipídeos, situação que desestrutura membranas celulares; além de contribuir para a prevenção da oxidação de proteínas e do DNA, contribuindo para a estabilidade celular. Sua suplementação tem se mostrado vantajosa em diferentes espécies de peixes, incluindo o pacu. Nessa espécie, a suplementação com AA promoveu uma melhora na cicatrização da pele (MORAES et al., 2003), na resposta inflamatória (BELO et al., 2012) e na resistência parasitária (MARTINS, 1998). Em concordância, experimentos com mioblastos de pacu realizados em nosso laboratório, demonstraram que o AA estimula o processo de migração e proliferação celular após situação de estresse fisiológico, etapas importantes durante o crescimento muscular (DURAN et al., 2019). No presente estudo, após a retomada da alimentação, aos 15 dias, observamos que os animais que receberam a maior dosagem de AA (grupo H-AA) apresentaram um padrão de distribuição de fibras nas classes de diâmetro semelhante ao grupo C, enquanto os grupos L-AA e B-AA permaneceram com um padrão de distribuição semelhante ao encontrado durante o período de jejum, com maior frequência de fibras nas menores classes e menor frequência nas maiores classes. Acreditamos que a maior suplementação de AA tenha exercido uma função antioxidante, promovendo condições favoráveis para que a retomada do crescimento muscular nesse grupo fosse acelerada após o restabelecimento da nutrição. Ainda, é possível que nos grupos L-AA e B-AA essa resposta tenha sido tardia, sendo necessários 30 dias de realimentação para que se igulassem ao grupo C na classe de menor diâmetro, embora ao final da realimentação apenas o grupo H-AA tenha sido similar ao grupo C considerando a classe de maior diâmetro ($> 40\mu\text{m}$).

Além de ser um potente antioxidante, o AA também atua como um cofator em diferentes etapas da biossíntese de colágeno (MURAD et al., 1981). A ausência desse composto resulta em uma série de anomalias em peixes, afetando principalmente o desenvolvimento ósseo e das brânquias, particularmente nas fases iniciais de desenvolvimento (revisado por DARIAS et al., 2011). O colágeno é uma das principais moléculas que compõe a matriz extracelular (MEC) do tecido muscular, que por sua vez impacta diretamente na transmissão de força, manutenção e reparo desse tecido (GILLIES; LIEBER, 2011). Em peixes, a proporção entre a quantidade de colágeno e proteínas estruturais no tecido muscular ainda influencia na textura e maciez do produto final (revisado por JOHNSTON, 1999;

LISTRAT et al., 2016). Considerando essa relação, avaliamos se a suplementação de AA impactaria na produção de colágeno na musculatura esquelética, considerando os resultados das análises morfológicas, os períodos de jejum e realimentação não impactaram significativamente na quantidade de colágeno na musculatura dos animais. Essa característica, em conjunto com a recuperação no diâmetro das fibras no grupo H-AA, indica que a suplementação com AA durante esse período promoveu a recuperação no diâmetro das fibras musculares sem impactar na estrutura da MEC desse tecido.

Em relação as enzimas antioxidantes, a baixa atividade da enzima Cat após a realimentação reforça nossa hipótese dos impactos do AA no estabelecimento de condições favoráveis ao crescimento muscular. Enzimas antioxidantes como Cat e GPx atuam na neutralização de ROS, transformando-os em moléculas não reativas (revisado por BIRBEN et al., 2012). Nesse sentido, é possível que a baixa atividade da enzima Cat após 6 horas de realimentação nos grupos B-AA e H-AA, seja reflexo da neutralização das ROS pelo AA, uma vez que a quantidade de substrato impacta diretamente na atividade enzimática (NELSON; COX, 2014). Ainda, podemos observar a manutenção da baixa atividade dessa enzima aos 30 dias de realimentação no grupo H-AA, indicando a manutenção dos efeitos antioxidantes desse antioxidante ao longo do período experimental. Em relação à atividade de GPx, acreditamos que o fator extrínseco que teve maior influência foi a retomada da alimentação, uma vez que sua atividade se manteve em valores similares entre os grupos que receberam diferentes quantidades de AA. O aumento na atividade dessa enzima em situações de realimentação também foi observado por HIDALGO et al., 2017, no músculo esquelético de *Umbrina cirrosa*, indicando um estímulo ao sistema antioxidante com o restabelecimento dos fatores nutricionais adequados ao crescimento.

Quando em situação de restrição alimentar os peixes podem reduzir os gastos energéticos através da diminuição da atividade locomotora, mantendo apenas as atividades de sustentação basal, o que resulta numa diminuição do metabolismo como um todo (revisado por ALI; NICIEZA; WOOTTON, 2003). No presente estudo, a não mobilização das enzimas antioxidantes nos animais submetidos ao jejum, pode ser reflexo da baixa atividade metabólica durante esse período, possivelmente como uma estratégia para manutenção das reservas energéticas e diminuição da produção das ROS. A não alteração na atividade de enzimas antioxidantes durante o jejum também foi observada na musculatura de *Umbrina cirrosa*, embora nesse mesmo período os níveis de malondialdeído, um marcador de estresse oxidativo, tenha aumentado nesses animais, levantando a hipótese de que possa ter acontecido

uma possível falha do sistema antioxidante e combate as ROS frente a esse desafio (HIDALGO et al., 2017).

O fenótipo muscular sofre forte influência da expressão de genes relacionados a vias de síntese e degradação proteica, que por sua vez tem sua expressão modulada por fatores intrínsecos e extrínsecos aos organismos (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). No presente estudo, o período de jejum impactou diretamente na expressão dos componentes dessas vias, tanto estimulando significativamente genes envolvidos com processo de catabolismo quanto reduzindo a expressão de genes relacionados aos processos de miogênese e anabolismo muscular. O perfil de alteração transcricional apresentado pelos animais do grupo F, possivelmente contribuiu para sua manutenção frente a esse desafio por meio da disponibilização de aminoácidos via degradação proteica (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011; PAULA et al., 2017) e redução de gastos energéticos com a síntese de proteínas. Essa estratégia de sobrevivência durante períodos de jejum foi observada em diferentes espécies de peixes como pacus em fases iniciais de desenvolvimento (MARECO et al., 2015), salmão do Atlântico (TACCHI et al., 2012; VALENTE et al., 2012) e truta arco-íris (RESCAN et al., 2007), representando uma estratégia para maximizar as chances de sobrevivência em situações ambientais adversas como a restrição alimentar. Além disso, o aumento na expressão de *pcg1a*, um importante estimulador da biogênese mitocondrial, observado no grupo F, pode representar uma alternativa para maior produção de ATP mitocondrial, reforçando nossa hipótese de maximização energética para manutenção da atividade metabólica basal e sobrevivência durante esse período. Resultados similares foram demonstrados em outros trabalhos avaliando a expressão desse gene no músculo esquelético de peixes em situações de jejum e realimentação (FUENTES et al., 2013c; PAULA et al., 2017), corroborando os dados encontrados no presente estudo.

No início do período de realimentação, embora a expressão de *igf1* e *mtor*, genes chaves na via de síntese de proteínas, não tenha apresentado alteração, encontramos um aumento na expressão de componentes associados a essa cascata de sinalização nos animais com maior suplementação de AA, grupo H-AA.

O gene *Rragc* participa da formação do heterodímero RagA/RagB - RagC/RagD, que na presença de aminoácidos pode estimular a atividade do complexo MTORC1, alocando-o próximo à membrana lisossomal. Nessa situação, sinais estimulatórios são enviados a esse complexo promovendo a síntese proteica (revisado por HUANG; FINGAR, 2014). Nesse sentido, o silenciamento de genes ortólogos de *RagB* e *RagC* em células de *Drosophila* cultivadas na presença de aminoácidos, levou a diminuição na fosforilação de alvos do

complexo Mtorc1 (SANCAK et al., 2008). Além disso, células HEK-293T com proteínas RAG silenciadas, apresentaram falhas na mobilização intracelular de MTORC1, reforçando o papel dessas proteínas na mediação da resposta frente ao estímulo por aminoácidos (SANCAK et al., 2008). Um outro componente dessa via de sinalização, o IGFBP5, também atua estimulando os processos anabólicos, podendo concentrar IGF1 próximo ao seu sítio de ligação, aumentando as possibilidades de interação ligante-receptor e potencializando as ações desse fator de crescimento (JONES et al., 1993). O aumento na expressão de *igfbp5* concomitante ao aumento na atividade de fatores anabólicos como Igf1 e Mtor foi encontrado em células musculares de salmão do Atlântico submetidas a restrição e posterior suplementação de aminoácidos (BOWER; JOHNSTON, 2010a). Essa correlação entre *igf1* e *igfbp5* também foi observada após a realimentação em salmão do Atlântico (BOWER; JOHNSTON, 2010b), truta arco-íris (GABILLARD; KAMANGAR; MONTSEERRAT, 2006) e *Paralichthys adspersus* (FUENTES et al., 2015).

No presente estudo, o aumento na expressão de *igfbp5* e *rragc* pode estar positivamente relacionado ao aumento da atividade de seus alvos e, em consequência no aumento da expressão de *rps6kb1a*, também chamada de p70S6K, uma quinase ribossomal que atua na síntese proteica e um dos principais alvos do complexo MTORC1 (revisado por GLASS, 2005). Considerando a atuação dessas moléculas, o aumento na expressão dos genes *igfbp5*, *rragc* e *rps6kb1a* no grupo H-AA, pode indicar uma rápida resposta após a retomada da alimentação e um estímulo à síntese de proteínas nesses animais em comparação aos outros grupos realimentados.

A ingestão alimentar em conjunto ao aumento da atividade de processos anabólicos podem desestimular a expressão de genes catabólicos no tecido muscular (revisado por JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). O curto período de realimentação (6 horas) não foi suficiente para reduzir a expressão de *mafbx*. Acreditamos que isso se deve ao aumento expressivo desse gene durante o jejum (aproximadamente 35x), sendo necessário um maior tempo de realimentação para a sua regulação negativa. Em paralelo, considerando o menor estímulo durante o jejum do gene *murf1a* (aproximadamente 4x), esse curto período de realimentação foi capaz de induzir uma diminuição em sua expressão. Embora tanto *Mafbx* quanto *Murf1* sejam classificados como E3 ubiquitina-ligases e participem do mesmo sistema de degradação proteica, *Murf1* tem uma maior relação na degradação de componentes miofibrilares e estruturais como as miosinas, enquanto *Mafbx* está relacionado a degradação de *Myod* e ao fator de iniciação de tradução, eIF3f (revisado por GLASS, 2010). Sendo assim, a diferença na intensidade de resposta ao estímulo tanto no período de jejum quanto de

realimentação entre esses genes pode estar relacionada aos seus diferentes alvos. Além disso, a expressão diferencial da E3 ubiquitina ligase *fbxo25* nesse mesmo período, demonstra que componentes pertencentes às mesmas vias de atuação podem atuar diferentemente frente ao mesmo estímulo. O padrão de expressão diferencial entre os componentes do sistema ubiquitina-proteassoma também foi encontrado no músculo esquelético de salmão do Atlântico após jejum e realimentação (TACCHI et al., 2010), corroborando a resposta diferencial desses atrogenes encontradas no presente estudo. Ainda em relação a *murf1*, a diferença no padrão de expressão de seus genes parálogos *murf1a* e *murf1b* no presente estudo, destaca as diferentes respostas de genes parálogos frente as mesmas situações extrínsecas (revisado por JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011).

O crescimento muscular pós-embrionário envolve a ativação e proliferação das MPCs, também chamadas de células satélites. Células satélites são células quiescentes, localizadas na periferia das fibras musculares, comprometidas com a linhagem miogênica, cujos comprometimento e atividade são modulados pela expressão do fator de transcrição, *Pax7* (SEALE et al., 2000). A proliferação e diferenciação dessas células em mioblastos que, por sua vez, podem proliferar e incorporar seus núcleos a fibras em formação e/ou expansão, contribui respectivamente para os processos de crescimento por hiperplasia e hipertrofia muscular em peixes (KOUMANS et al., 1991). Em nossas análises, o aumento na expressão de *myod* no grupo H-AA, após 6 horas de realimentação, pode indicar um estímulo à proliferação de mioblastos em resposta a alimentação e, possivelmente, pelo balanceamento do status redox mantido pela maior suplementação do AA (COMBS; MCCCUNG, 2017). Em concordância, a suplementação com AA promoveu um aumento nas taxas de proliferação e migração celular em células musculares de pacu isoladas, mesmo após efeitos estressores (DURAN et al., 2019). Ainda, no presente estudo, o aumento na expressão de *myod* vem ao encontro ao aumento na expressão de genes anabólicos nesse mesmo grupo, indicando um estímulo à proliferação celular e síntese proteica, processos que em sinergismo contribuem para o crescimento muscular. A ligação de IGF1 ao seu receptor está relacionada ao controle positivo dos processos de proliferação celular, a partir de respostas como a inibição da apoptose e indução mitogênica (MOMMSEN, 2001). No presente estudo, embora a expressão de *igf1* não tenha apresentado alterações, o aumento na expressão dos genes *downstream* dessa via pode indicar uma influência da atividade desse fator de crescimento na expressão de *myod*. Além disso, o aumento na expressão de *pax7* no grupo H-AA, nesse período, reflete um importante indicador da manutenção do *pool* de células satélites (SEALE et al., 2000)

mesmo com os indícios de uma maior taxa proliferativa nesses animais, fator essencial para futuros processos de crescimento e reparo muscular.

Após 15 dias de realimentação, de maneira geral, observamos uma diminuição na expressão dos genes relacionados às vias de biogênese mitocondrial, miogênese, anabolismo e catabolismo muscular nos animais que receberam a menor dosagem de AA (grupo L-AA). A baixa expressão dos genes avaliados, assim como a manutenção da maior atividade das enzimas antioxidantes nesse grupo, pode indicar um efeito prolongado do estresse fisiológico ocasionado pelo jejum, impactando os processos metabólicos como um todo e a recuperação do tecido muscular. Nesse sentido, no músculo esquelético de *Umbrina cirrosa* submetidos a jejum foi observada uma diminuição metabólica generalizada associada ao aumento de marcadores de estresse oxidativo (HIDALGO et al., 2017), em concordância aos dados observados em nosso estudo. Em relação aos grupos B-AA e H-AA, embora a expressão de *igf1* e *igfbp5* tenha se mantido baixa, a expressão dos componentes *downstream* dessa via (*mtor*, *ragcc* e *rps6kb1a*) foi similar em relação ao grupo C, indicando uma possível retomada dos processos anabólicos no grupo B-AA e manutenção desse processo no grupo H-AA. Ainda, considerando que o crescimento muscular resulta do balanço entre as vias de anabolismo e catabolismo (BOWER; JOHNSTON, 2010b; JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011), a baixa expressão do atrogene *murf1a* e a expressão de *mafbx* similar ao grupo C pode indicar um desestímulo à degradação proteica, possibilitando um saldo positivo aos processos anabólicos nos grupos B-AA e H-AA durante esse período.

De forma interessante, a expressão de *myod* permaneceu elevada no grupo H-AA aos 15 dias de realimentação, indicando a manutenção da maior taxa proliferativa nesses animais mesmo ao longo do período experimental. A maior expressão desse gene pode estar contribuindo para recuperação do fenótipo muscular, através da “doação” de núcleos para fibras em crescimento resultando no crescimento muscular por hipertrofia, como observado pela distribuição de fibras nas classes de diâmetro. Além disso, é possível que a diminuição na expressão de *myog* observada nos grupos B-AA e H-AA possa estar contribuindo para que o processo de proliferação seja prolongado por um maior período, resultando em maiores chances de crescimento muscular. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com células musculares isoladas de truta arco-íris na presença de antocianidinas, compostos antioxidantes, no qual houve aumento na expressão de *pax7* e maior taxa *pax7/myod*, indicando um possível atraso na progressão do ciclo celular, embora essas células continuassem a apresentar um comprometimento para a progressão a diferenciação terminal (VILLASANTE et al., 2016).

Ainda, os estímulos aos fatores miogênicos no grupo H-AA foram mantidos aos 30 dias de realimentação. A manutenção da maior expressão de *myod* concomitante com a menor expressão de *pax7* nesses animais, pode indicar um maior comprometimento com a entrada no ciclo celular, visto que uma razão intermediária de células *Pax7/Myod*⁺ pode indicar a transição do estado quiescente para o estado de proliferação celular (CHAPALAMADUGU et al., 2009; OLGUIN et al., 2007). Em concordância, a manutenção da baixa expressão de *myog* reforça nossa hipótese do aumento do estágio proliferativo dos mioblastos nesse grupo. Além disso, encontramos também um aumento expressivo do gene *pgc1a*, indutor da biogênese mitocondrial nesses animais. Em células animais, a mitocôndria é considerada o principal sítio de produção de ROS (TURRENS, 1997). No presente estudo, o aumento expressivo de *pgc1a* em conjunto com a diminuição da atividade da enzima Cat nesse mesmo período, pode indicar que a maior suplementação de AA, a partir de sua ação na neutralização das ROS, pode estar propiciando um microambiente favorável a produção energética, possibilitando melhores condições para o crescimento, como observado também pela recuperação das fibras de maiores diâmetros somente nesse grupo.

A proteólise é um processo que ocorre mesmo em situações normais aos organismos, sendo importante para a função muscular e *turnover* proteico (revisado por BONALDO; SANDRI, 2013). Camundongos submetidos ao procedimento de ablação do músculo sinergista apresentaram aumento nas taxas de crescimento muscular associado ao aumento na atividade do sistema proteassoma. Quando submetidos ao silenciamento de *Mafbx*, esses animais apresentaram uma diminuição no crescimento muscular, indicando a atuação desse atrogene na remodelação e crescimento muscular (BAEHR; TUNZI; BODINE, 2014). Nesse sentido, o aumento na expressão de *mafbx* no grupo H-AA aos 30 dias de realimentação também pode estar contribuindo para a manutenção do processo de hipertrofia muscular através do *turnover* proteico muscular nesses animais.

Ainda considerando o final do período experimental, o grupo L-AA inesperadamente apresentou similaridades ao grupo H-AA em relação a expressão gênica. Quando em restrição de nutrientes como carboidratos, lipídeos e proteínas, os peixes podem apresentar um comportamento de maior ingestão alimentar como estratégia para suprir as necessidades energéticas do composto ausente ou em baixa concentração em sua dieta (ABIMORAD; CARNEIRO, 2007; ALI; NICIEZA; WOOTTON, 2003; JOBLING et al., 1994). O maior consumo alimentar durante a realimentação em animais submetidos a períodos de jejum, processo denominado hiperfagia, pode resultar na recuperação de parâmetros como peso, comprimento e do tecido muscular (ALI; NICIEZA; WOOTTON, 2003; KUNIYOSHI et al.,

2019). De fato, um maior consumo alimentar foi observado em pacus com alimentação deficiente em vitaminas C e E, porém a maior ingestão alimentar não resultou em melhoras nos parâmetros de crescimento na ausência dessas vitaminas (GARCIA et al., 2011). Sendo assim, é possível que a expressão gênica nos animais do grupo L-AA possa estar relacionada ao maior consumo alimentar nesse período. Embora no protocolo experimental aplicado neste estudo a oferta alimentar tenha sido similar entre os grupos, o consumo alimentar em si não foi mensurado, o que pode ter influenciado no padrão de expressão gênica desses animais, porém sem resultar diretamente na recuperação do diâmetro das fibras musculares. Nesse sentido, possivelmente a semelhança nos parâmetros consumo alimentar e níveis de AA nos grupos C e B-AA, pode ter influenciado nos resultados similares de expressão gênica entre esses grupos, embora esse cenário também não tenha possibilitado a recuperação do diâmetro das maiores fibras musculares durante a realimentação no grupo B-AA.

Em nossas análises *in vitro*, observamos que os miotubos mantidos em meio de restrição de nutrientes, grupo Dpvd, apresentaram uma redução em seu diâmetro, baixas taxas de migração celular e atividade de enzimas antioxidantes, aumento na expressão de genes catabólicos e diminuição na expressão de genes anabólicos e miogênicos. Esses dados corroboram os nossos resultados observados *in vivo*, reforçando o perfil de resposta proteolítico e estressor da restrição de nutrientes. Após o restabelecimento das condições de crescimento adequadas, o grupo Dpvd+Cplt apresentou um aumento no diâmetro das células, acompanhado por um aumento na expressão de genes anabólicos e miogênicos (*mtor*, *rps6kb1a* e *myod*), diminuição de genes catabólicos e maiores taxas de migração celular em relação ao grupo Dpvd. A baixa fosforilação e ativação de enzimas anabólicas seguida por posterior ativação e aumento em sua atividade na presença de aminoácidos também foi observada em mioblastos isolados de salmão do Atlântico (DE LA SERRANA; JOHNSTON, 2013). Em concordância, um aumento na expressão de componentes anabólicos como Igf1 e seus alvos *downstream* na presença de aminoácidos também foi detectado em células musculares isoladas de *Sparus aurata* (VÉLEZ et al., 2014) e salmão do Atlântico (BOWER; JOHNSTON, 2010a), indicando a retomada do metabolismo celular e estímulo aos processos de crescimento, a partir da mobilização das vias anabólicas e miogênicas pelos componentes presentes no meio de cultivo celular, como os aminoácidos.

Embora o estabelecimento das condições ideais de crescimento tenha promovido um estímulo aos processos anabólicos e hipertrofia dos miotubos (grupo Dpvd+Cplt), as células suplementadas com AA tiveram o maior diâmetro entre os grupos avaliados, maior expressão de *igf1*, *rps6kb1a* e *myod* e maior atividade da enzima GPx. Dados similares foram

observados por nosso grupo de pesquisa em mioblastos isolados de pacu suplementados desde o início do cultivo celular com AA, apresentando um aumento na expressão de *myog* e *mtor* mesmo quando comparado as células em condições normais de crescimento (DURAN et al., 2019). Em conjunto esses resultados indicam que embora a presença dos nutrientes presentes no meio de cultivo seja importante e necessária para a recuperação do fenótipo e metabolismo das células musculares, a suplementação de AA pode promover condições que favoreçam ainda mais o restabelecimento da homeostase celular e para que a resposta frente a esse desafio ocorra de forma rápida e efetiva. Ainda, a partir de nossos dados de migração celular, podemos observar que a resposta primária à suplementação de AA foi o estímulo ao anabolismo e hipertrofia das células em detrimento à migração celular, processo que foi mais acentuado nas células que não receberam esse composto (grupo Dpvd+Cplt). Além disso, nossos dados indicam que a suplementação de AA pode afetar diretamente a recuperação de células musculares submetidas a tratamentos estressores, corroborando os resultados encontrados *in vivo*.

7. Conclusões

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

8. Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1, p. 57–67, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1882 WATABE, S. Myogenic Regulatory factors. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). . **Muscle**
1883 **development and growth**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2001. p. 19–36.

1884 WILLIAMSON, D. L.; BUTLER, D. C.; ALWAY, S. E. AMPK inhibits myoblast
1885 differentiation through a PGC-1 α -dependent mechanism. **American Journal of Physiology -**
1886 **Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 2, p. 304–314, 2009.

1887 WITT, S. H. et al. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins
1888 redundantly: Towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. **Journal of**
1889 **Molecular Biology**, v. 350, n. 4, p. 713–722, 2005.

1890 XU, Y. et al. Fish growth in response to different feeding regimes and the related molecular
1891 mechanism on the changes in skeletal muscle growth in grass carp (*Ctenopharyngodon*
1892 *idellus*). **Aquaculture**, v. 512, n. March, p. 734295, 2019.

1893 ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. New Jersey: Prentice - Hall, 2009.

1894