



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**



**RESVERATROL POTENCIALIZA O
CRESCIMENTO MUSCULAR EM PACUS
(*Piaractus mesopotamicus*) SUBMETIDOS AO
EXERCÍCIO NATATÓRIO**

Me. Rondinelle Artur Simões Salomão
Biólogo

Jaboticabal – São Paulo
2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**



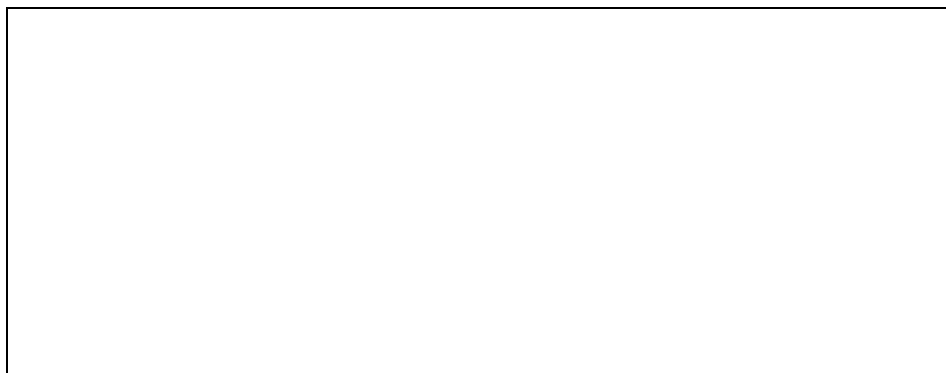
**RESVERATROL POTENCIALIZA O
CRESCIMENTO MUSCULAR EM PACUS
(*Piaractus mesopotamicus*) SUBMETIDOS AO
EXERCÍCIO NATATÓRIO**

Me. Rondinelle Artur Simões Salomão

Orientadora: Profa. Dra. Maeli Dal Pai

Tese apresentada ao Programa de Pós – graduação em Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

Jaboticabal, São Paulo
2018



Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
LISTA DE ABREVIACÕES.....	6
LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Organização da musculatura natatória dos peixes.....	12
1.2. Miogênese e crescimento muscular nos peixes.....	13
1.3. Catabolismo muscular	15
1.4. Anabolismo muscular (Via de sinalização IGF→ PI3K→AKT→mTOR).....	17
1.5. Resveratrol e Exercício.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. HIPÓTESE.....	22
4. OBJETIVOS	22
5. MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1. Delineamento experimental.....	22
5.2. Análise morfológica e morfométrica.....	25
5.3. Análise da expressão gênica	25
5.4. Extração do RNA total	27
5.5. Tratamento do RNA com DNase	28
5.6. Transcrição Reversa	28
5.7. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	29
5.8. Análise bioquímica.....	29
5.9. Análise estatística dos dados	30
6. RESULTADOS	30
6.1. Dados biométricos, morfologia e morfometria muscular.....	30
6.2. Análise bioquímica.....	33
6.3. Análise da expressão gênica.....	34
7. DISCUSSÃO.....	39
8. CONCLUSÃO.....	44
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

As pessoas esperam

Toda semana pela sexta-feira,

Todo ano pelo verão e

Toda vida pela felicidade.

*Faça diferente, transforme todos os dias
em sextas-feiras, aproveite as quatro estações e
não espere a vida passar para ser feliz!*

Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto.

A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender

(Autoria desconhecida).

Dedico este trabalho...

A minha filha Laura Rodrigues Salomão, por todos os momentos de felicidade e amor incondicional que me proporcionou e por me ensinar a ser uma pessoa melhor, princesa saiba que tudo o que o papai faz hoje é por ti.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Artur Bernardes Simões Salomão e Cleonice de Souza Salomão que sempre estiveram do meu lado, me apoio e me incentivei durante todos os momentos.

A minha orientadora Profa. Dra. Maeli Dal Pai, pela amizade, competência e acima de tudo pela paciência, agradeço também por ter me dado à oportunidade de ser seu aluno e de ter confiado em mim. Agradeço imensamente a ti professora, pois sem tua ajuda nada disso teria acontecido em minha vida, meu muito obrigado.

Ao meu Co-orientador Dr. Vander Bruno dos Santos, por todos esses anos de amizade e companheirismo, pela competência e pelos ensinamentos.

As minhas irmãs Danielle e Grazielle Salomão, aos meus cunhados Elton Pinheiro Salvador e Lucas Medeiros, e aos meus sobrinhos que tanto amo Eduarda e Miguel, que foram meus suportes fora do mundo acadêmico.

A toda família Rodrigues e Rigonato pelos momentos que passamos juntos, agradeço também a Beatriz Rodrigues Rigonato por ter me dado o melhor presente que eu poderia ter, minha filha.

Ao Prof. Dr. Edson Assunção Mareco, pela amizade, companheirismo e por ter sido meu “irmão” durante todo esse tempo, agradeço imensamente a ti Edsão e saiba que sempre poderá contar comigo, e sim te considero como um irmão.

A minha amiga Rosimeire (rorose), por todos os momentos juntos, pelos aconselhamentos, paciência e por ter sido uma pessoa especial em minha vida durante todos esses anos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético: Ivan, Juarez Bruno Duran, Bruna, Jéssica, Rafinha, Paulinha, Sarah e Tatá pelo convívio e pelos momentos de risadas.

Aos técnicos de laboratório, José Eduardo, Ricardo, Vivian e Helton por todos os momentos que passamos juntos, pelo profissionalismo e pela amizade.

Aos amigos dos demais laboratórios do Departamento de Morfologia.

Aos companheiros de República da K-Zona Rural, pela amizade, companheirismo e por terem me ensinado o verdadeiro significado de Fraternidade.

A todos os amigos da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pelos momentos juntos e pelo companheirismo.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação do CAUNESP pela disposição em sempre querer ajudar, em especial ao David pelo profissionalismo e pela paciência.

Aos membros da banca, por aceitarem fazer parte deste momento tão especial na minha vida.

Agradeço também a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte deste momento, e sempre torceram pela minha vitória.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

Meu muito obrigado!

LISTA DE ABREVIACÕES

Akt - Serine-threonine kinase

APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

C – Grupo controle

CE – Grupo controle com exercício

CAT - Catalase

E1 - Ubiquitinas ativadoras de enzimas

E2 - Ubiquitinas transportadoras de proteína

E3 - Ubiquitinas de conjugaco de enzimas

EROs – Espécies reativas de oxignio

IGF - Insulin like growth factor

LBME - Laboratório de Biologia do Músculo Estriado Esquelético

Mapk - Mitogen activated protein kinase

Mtor - Mammalian target of rapamycin

MRFs - Fatores Reguladores Miognicos

Miog – Miogenina

Pi3k - Phosphatidyl-inositol-3 kinase

Pgc1 α - Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha

R – Grupo resveratrol

RE – Grupo resveratrol com exercício

RES - Resveratrol

SOD - Superóxido dismutase

USP- Ubiquitin Specific Protease

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional das rações utilizadas nos diferentes tratamentos....24

Tabela 2. Descrição do gene e sequência dos primers utilizados no experimento.....26

Tabela 3. Razões de absorvância e concentração do RNA total extraído das amostras de músculo branco dos exemplares de alevinos de pacu analisados.....28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do arranjo das fibras musculares dentro do miômero de teleosteos: (A) vistas dorsal e lateral, (B) seção transversal, (C) vista lateral de três miômeros do meio do corpo do animal. (Adaptado: Sanger e Stoiber, 2001).....12

Figura 2. Esquema do processo de formação das fibras musculares esqueléticas na miogênese e a ação dos MRFs no processo de proliferação (*myod* e *myf5*) e diferenciação (*miogenina* e *mrf4*) dos mioblastos a partir das células precursoras miogênicas (adaptado: Watabe, 1999).....13

Figura 3. Esquema mostreo as células satélites e os mecanismos de crescimento muscular nos peixes. As células satélites se proliferam através da ativação da *myod* e *myf5* e com a expressão da *miogenina* e do *mrf4*, os mioblastos se diferenciam formando novos miotubos, contribuindo para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético. (Adapitado: Johnston, 1999).....14

Figura 4. Equema das principais vias de sinalização (Catabólica - *murf*, *foxo*, *atrogenin-1/mafbx*) e (Anabólica - *igf-1*, *pi3k*, *akt*, *mtor*) que controlam o fenótipo da fibra muscular (Adaptado: Bonaldo e Sandri 2013).....17

Figura 5. Esquema do modelo de exercício utilizado no experimento. À esquerda, vista superior dos tanques de cultivo e à direita, visão frontal dos tanques de 0,25 m³. A) Sistema de cultivo em que os peixes não passam por situação de exercício natatório. B) Sistema de cultivo provoceo corrente de água circular para promover a condição de exercício natatório nos peixes. (a) sistema de abastecimento de água; (b) caixas d'água de 0,25 m³; (c) sistema de escoamento da água das caixas para o sistema de filtragem. As setas indicam a direção das correntes formadas pela água.23

Figura 6. À esquerda, esquema demonstreo o local de coleta das amostras do tecido muscular, abaixo da nadadeira dorsal (FB), em vista longitudinal. À direita, esquema de corte transversal do corpo, localizando a profundidade do corte para retirada da amostra muscular. Legenda: FB; fibras brancas. FV; fibras vermelhas. No; notocorda. CE; cordão espinal.....25

Figura 7. Gráficos com médias e desvio padrão do peso corporal (A) e comprimento padrão (B) dos pacus ao início, aos 3, 7 e 30 dias do experimento. *Diferença estatística significativa entre os grupos. Significância: $p < 0,05$31

Figura 8. Seções transversais do músculo branco de pacu dos diferentes grupos estudados. Grupos: Controle, C (A); Controle e Exercício, CE (B); Resveratrol, R (C) e Resveratrol com Exercício, RE (D), aos 30 dias. Fibras musculares com morfologia normal (f), núcleos (n). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra: 5 μ m.....32

Figura 9. Gráficos de distribuição de frequência (%) das fibras musculares do pacu nas classes de diâmetros aos 7 dias, nos grupos estudados. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$33

Figura 10. Gráficos de distribuição de frequência (%) das fibras musculares do pacu nas classes de diâmetros aos 30 dias, nos grupos estudados. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$33

Figura 11. Avaliação da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em pacu aos 3 e 7 dias do experimento nos diferentes tratamentos. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$34

Figura 12. Avaliação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em pacu aos 3 e 7 dias do experimento nos diferentes tratamentos. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$34

Figura 13. Expressão gênica da *myod* em pacus durante o experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$35

Figura 14. Expressão gênica da *myog* em pacus durante o experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$35

Figura 15. Expressão dos mRNA em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. *igf-1* (A); *pi3K* (B); e *mtor* (C). Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$36

Figura 16. Expressão do gene *sdha* envolvido com o metabolismo em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$37

Figura 17. Expressão do gene *pgc1a* envolvido com o metabolismo em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$37

Figura 18. Expressão dos genes *murf* 1a (A) e *fbxo25* (B) envolvidos com o catabolismo em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$38

RESUMO

O pacu é um peixe bastante difundido na aquicultura, pois apresenta qualidades desejáveis como a rápido crescimento. O exercício pode ser um estímulo para promover crescimento e hipertrofia muscular, entretanto, pode produzir espécies reativas do oxigênio (ROS). O resveratrol possui várias ações biológicas como a atividade antioxidante e modifica a atividade de várias vias de sinalização celular. As propriedades antioxidantes do resveratrol podem reduzir a degradação das proteínas e potencialmente aumentar a taxa de crescimento. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do resveratrol no crescimento muscular de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), submetidos ao exercício natatório. Foram constituídos 04 grupos experimentais: Controle (C), Controle Exercício (CE), alimentados com ração Padrão/Referência e Resveratrol (R), e Resveratrol Exercício (RE) alimentados com ração formulada e suplementada com resveratrol (0,06% de inclusão), por 30 dias. Fragmentos de músculo branco foram retirados ao zero, três, sete e trinta dias e processados para as análises morfológica, morfométrica, bioquímica e molecular. O peso e comprimento dos animais do grupo RE foi maior no final do experimento (30 dias). A morfologia das fibras musculares mostrou-se normal em todos os grupos e em relação à distribuição das fibras em classes de diâmetro (<20, 20-40, 40-60 e >60 μ m), aos 7 dias, considero-se a classe <20 μ , o grupo CE apresentou menor frequência de fibras nessa classe comparada ao grupo C. Na classe 20-40 μ , o grupo C apresentou maior proporção de fibras nessa classe comparada ao grupo R. Na classe 40-60 μ , o grupo R apresentou maior frequência do que o grupo C. Na classe >60 μ , o grupo CE apresentou maior proporção de fibras comparado com o grupo C. Em relação à expressão gênica dos marcadores de miogênese (*Myod* e *MyoG*), 3 dias após o início do experimento, o nível de expressão do gene *Myod* mostrou aumento no grupo RE em relação ao grupo C. Aos 7 dias, os grupos R e RE apresentaram aumento na expressão da *Myod* em comparação aos grupos C e CE, respectivamente. A expressão da *MyoG*, aos 3 e 7 dias, foi maior no grupo R em relação ao grupo C. Em relação à expressão do mRNA dos genes envolvidos com o anabolismo (*igf-1*, PI3K e mTOR), aos 3 dias, a expressão do *igf-1* foi maior no grupo RE em relação ao grupo R. Aos 7 dias, o grupo RE apresentou aumento na expressão do *igf-1* em comparação aos grupos CE e R. Aos 3 dias, os níveis de expressão do gene PI3K foi maior nos grupos R e RE comparados aos grupos C e CE, respectivamente; já, aos 7 dias, houve uma inversão na expressão desse gene e nos grupos R e RE, a expressão foi menor comparado aos grupos C e CE, respectivamente. A expressão do gene mTOR mostrou variação somente aos 7 dias. Nos grupos R e RE, a expressão foi maior em comparação aos grupos C e CE, respectivamente. No grupo CE, o nível de expressão foi menor comparado com o grupo C. Em relação à expressão dos genes envolvidos com metabolismo (SDHA e PGC1- α), aos 7 dias, observou-se um aumento nos níveis de expressão do gene SDHA no grupo RE comparado aos grupos CE e R. O grupo R apresentou uma expressão maior comparado ao grupo C. Em relação ao gene PGC1 α , os níveis de expressão aos 3 dias, foi maior nos grupos CE e R comparado aos grupos C e RE, respectivamente. Aos 7 dias, os grupos C e CE apresentaram níveis de expressão maior comparado aos grupos R e RE, respectivamente. O grupo CE apresentou maior expressão desse gene comparado ao grupo C. Os genes envolvidos com o catabolismo (*FBXO25* e *Murf1a*), aos 3 dias, os níveis de expressão do gene *Murf1a*, foi maior no grupo C comparado ao grupo R; aos 7 dias, a expressão do *Murf1a* foi maior no grupo C comparado aos grupos CE e R. A expressão do gene *FBXO25*, aos 3 dias, foi maior no grupo C comparado ao grupo R. Aos 7 dias, o nível de expressão desse gene foi maior no grupo CE comparado ao grupo RE. Aos 7 dias, o grupo CE mostrou uma diminuição da atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT), comparada com o grupo C. O grupo RE mostrou atividade CAT menor do que o grupo R o qual foi semelhante ao grupo C. A atividade da enzima Sódio Dismutase (SOD), aos 7 dias, foi menor no grupo CE comparada aos grupos C e RE. Sugerimos que o resveratrol foi eficiente na prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético do pacu, submetido ou não ao exercício natatório. Esse fato possivelmente favoreceu o aumento no nível de expressão de genes miogênicos, anabolizantes e metabólicos e a diminuição na expressão de genes catabólicos. Notavelmente, todas essas mudanças ocorreram junto com um aumento na massa muscular.

Palavras chave: Músculo esquelético, Peixe, Antioxidantes, Exercício, Anabolismo, Catabolismo

ABSTRACT

The pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a tropical fish with important economic value to aquaculture due to the high speed of growth. Exercise can be a powerful stimulus to promote muscle growth e hypertrophy, however, it may promote oxidative stress with the production of reactive oxygen species (ROS) e e modifies the activity of several cell signaling pathways. The antioxidant properties of resveratrol can reduce protein degradation e potentially increase the rate of growth. The aim of our study was to evaluate the effect of resveratrol on muscle growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to swimming exercise. Four experimental groups were used: Control (C), Control Exercise (CE) fed with steard/reference diet e Resveratrol (R), e Resveratrol Exercise (RE) fed with diet formulated e supplemented with resveratrol (0.06% inclusion), for 30 days. White muscle samples were removed at zero, three, seven e thirty days e processed for morphological, morphometric, biochemical e molecular analyzes. The weight (g) e length (cm) of the RE animals were higher at the end of the experiment (30 days). Muscle fibers morphology was normal in all groups. At 7 days, the distribution of muscle fiber in diameter classes (<20, 20-40, 40-60 e > 60µm) showed that, considering the class < 20µ, CE group had a lower fiber frequency compared to C group. In the class 20-40µ, C group presented a higher proportion of fibers compared to R group. In the class 40-60µ, R presented higher frequency than C group. In the class >60µ, CE group presented a higher fibers frequency compared to C group. There was an increase in the expression level of the myogenic marker *Myod* at 3 days in the RE compared to the C group. At 7 days, the R e RE groups showed an increase in *Myod* expression compared to the C e CE groups, respectively. MyoG expression at 3 e 7 days was higher in group R than group C. Regarding mRNA expression of genes involved with anabolism (*igf-1*, PI3K e mTOR) at 3 days, the *igf-1* level was higher in the RE than in the R group. At 7 days, the RE group showed increased *igf-1* expression compared to the CE e R groups. At 3 days, the expression levels of PI3K gene was higher in the R e RE compared to C e CE groups, respectively; at 7 days, there was a reversal in the expression of this gene; in the R e RE groups, the expression level was lower compared to the C e CE groups, respectively. Gene expression of the mTOR gene showed variation only at 7 days. In the R e RE groups, the mTOR gene expression was higher in comparison to C e CE groups, respectively. Considering the catabolic genes (*Murfla* e *FBXO25*), at 3 days, the expression levels of *Murfla* was higher in C compared to R group; at 7 days, *Murfla* expression was higher in C compared to the CE e R groups. At 3 days, *FBXO25* gene expression was higher in C compared to R group. At 7 days, the expression level of this gene was higher in the CE compared to the RE group. Regarding the mRNA expression of the genes involved with metabolism (SDHA e PGC1α), at 7 days, an increase in SDHA gene expression levels in the RE compared to the CE e R groups was observed. The R showed a higher expression compared to the C group. In relation to the PGC1α, the expression levels, at 3 days, were higher in the CE e R groups compared to the C e RE groups, respectively. At 7 days, C e CE groups presented increased expression levels compared to R e RE groups, respectively. CE showed higher expression of this gene compared to C group. At 7 days, CE group showed a decrease in the activity of the Catalase (CAT) enzyme compared to C group. RE group showed lower CAT activity than the R group, which was similar to the C group. The enzyme activity Sodium Dismutase (SOD), at 7 days, was lower in the EC compared to C e RE groups. Our results suggest that resveratrol was efficient in preventing the formation of reactive oxygen species in skeletal muscle, with a positive effect on muscle growth in Pacu fingerlings submitted to swimming exercise. There was an increase in the expression level of myogenic, anabolic e metabolic genes e a decrease in the expression of catabolic genes. Notably, all of these changes occurred along with an increase in muscle mass.

Key-words: Skeletal Muscle, Fish, Antioxidants, Exercise, Anabolism, Catabolism

1. INTRODUÇÃO

1.1. Organização da musculatura natatória dos peixes

O músculo natatório dos peixes teleósteos, compreendendo a aproximadamente 70% da massa total do corpo, é constituído por unidades rearranjadas em série, os miômeros (Bone, 1978). Eles são separados uns dos outros por uma camada de tecido conjuntivo, os miosseptos pelos quais a força de contração da fibra muscular miotomal é transmitida, para o esqueleto axial e nadadeira caudal, resultando na ondulação do corpo e propulsão para frente (Videler 1993, apud Sanger e Stoiber, 2001).

Cada miômero contém uma região superficial de forma de cunha disposta diretamente abaixo da linha lateral, nas quais as fibras musculares correm paralelas ao eixo do corpo, e uma parte profunda na qual as fibras musculares estão arranjadas em uma forma helical, formando ângulos em torno de 40° (Figura 1).

Os músculos locomotores de todos os grupos de peixes são altamente especializados para reunir a ampla gama de produção de força, que é requerida do sistema muscular durante a locomoção em velocidade que pode ser mantida por tempo indefinido, e também em alta velocidade de curta duração. A musculatura é constituída por diferentes tipos de fibras musculares e essas diferentes fibras musculares são destinadas a operar em diferentes sequências ondulatórias (Rome et al, 1988).

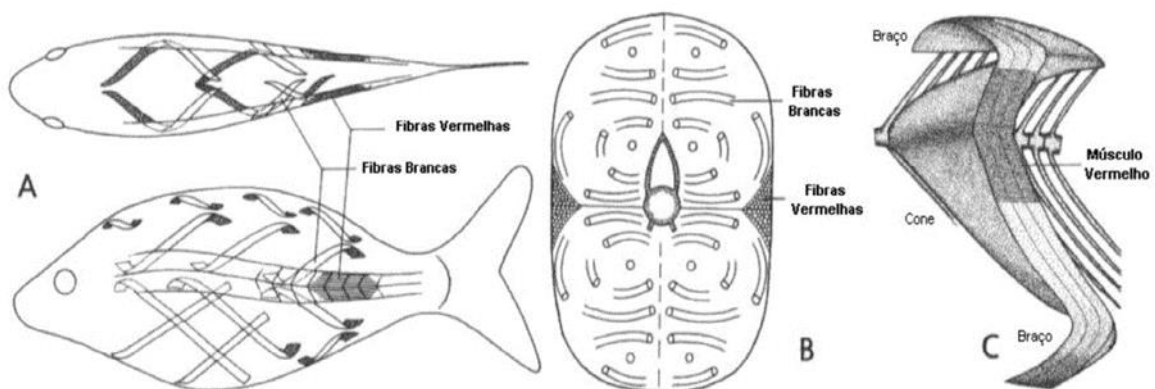


Figura 1. Diagrama esquemático do arranjo das fibras musculares dentro do miômero de teleósteos: (A) vistas dorsal e lateral, (B) seção transversal, (C) vista lateral de três miômeros do meio do corpo do animal. (Adaptado: Sanger e Stoiber, 2001).

A organização muscular encontrada em peixes teleósteos segue o seguinte padrão: a maior parte da musculatura consiste de fibras musculares brancas (rápidas e glicolíticas). A musculatura vermelha está localizada na região superficial,

principalmente, na região próxima da linha lateral. Essa musculatura é formada por fibras musculares vermelhas (lentas e oxidativas). Entre as duas musculaturas, observa-se uma camada de fibras intermediárias, com fibras apresentando características intermediárias entre as musculaturas branca e vermelha (Van Raamsdonk et al., 1978, 1980; Johnston, 1981). A cor do músculo é indicativa do grau de vascularização de cada tipo de fibra e o músculo vermelho aparece escuro devido seu alto conteúdo de mioglobina, densidade mitocondrial, e grande número de capilares em contraste aos baixos valores desses parâmetros no músculo branco (Sanger e Stoiber, 2001).

1.2. Miogênese e crescimento muscular nos peixes

A formação das primeiras fibras musculares esqueléticas ocorre na fase embrionária a partir de células precursoras miogênicas que se diferenciam em mioblastos nos somitos. Esses mioblastos, mononucleados, sofrem mitoses e posteriormente fundem-se uns aos outros, formando miotubos multinucleados que, posteriormente, se diferenciam em fibras musculares maduras (Johnston, 1999).

Entre as moléculas sinalizadoras que regulam o processo da miogênese, destacam-se os fatores transcricionais músculo específicos, os Fatores Reguladores Miogênicos (MRFs), que controlam a ativação, proliferação e diferenciação dos mioblastos. São descritos quatro MRFs: *myf5*, *myod*, *miogenina (miog)* e *mrf4* (Rescan, 2001).

A *myod* e o *myf5* são conhecidos como fatores primários na miogênese, sendo expressos em mioblastos na fase de proliferação, que antecede a fase de diferenciação, enquanto que a *miog* e o *mrf4* são expressos em células na fase de fusão e diferenciação em fibras musculares imaturas (Megeny e Rudnicki, 1995; Watabe, 1999) (Figura 2).

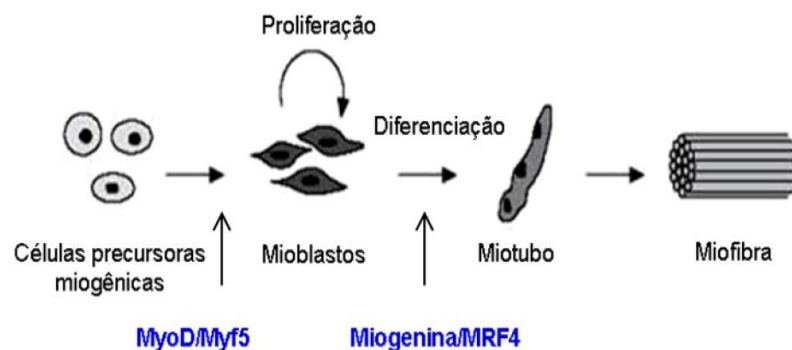


Figura 2. Esquema do processo de formação das fibras musculares esqueléticas na miogênese e a ação dos MRFs no processo de proliferação (*myod* e *myf5*) e diferenciação (*miog* e *mrf4*) dos mioblastos a partir das células precursoras miogênicas (adaptado: Watabe, 1999).

Durante o processo da miogênese, alguns mioblastos permanecem como células precursoras miogênicas indiferenciadas no tecido muscular. Essas células são denominadas mioblasto adulto, células precursoras miogênicas ou células satélites e estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática da fibra muscular (Mauro, 1961; Campion, 1984). Esse tipo celular tem papel importante nos processos de crescimento (Schultz 1996; White et al. 2010), regeneração (Wang e Rudnicki, 2011) e manutenção da homeostase muscular (Blaauw e Reggiani, 2014).

Nos peixes, o crescimento pós-embriônico da musculatura estriada ocorre a partir da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites, que são responsáveis pelos mecanismos de crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans e Akster, 1995). Na hiperplasia, a fusão entre as células satélites ativadas resulta na formação de novos miotubos na superfície das fibras existentes, com posterior diferenciação em novas fibras musculares. Na hipertrofia, as células satélites ativadas fundem-se com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, levando assim ao aumento na área da fibra muscular (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowleson e Veggetti, 2001) (Figura 3).

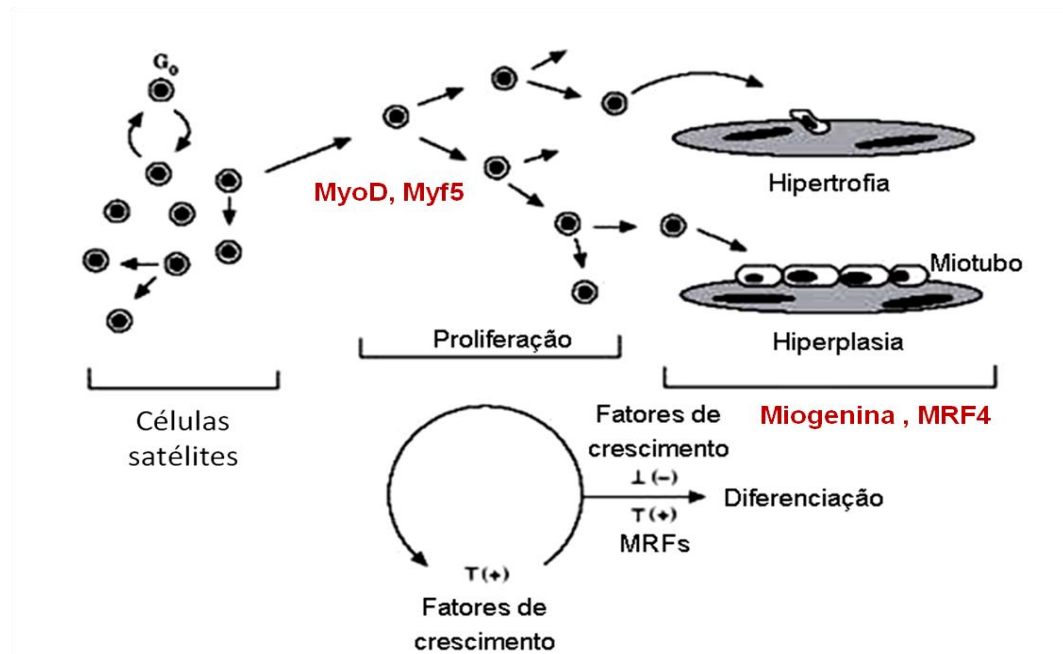


Figura 3. Esquema mostra as células satélites e os mecanismos de crescimento muscular nos peixes. As células satélites se proliferam através da ativação da *myod* e *myf5* e com a expressão da *miogenina* e do *mrf4*, os mioblastos se diferenciam formando novos miotubos, contribuindo para o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo esquelético. (Adaptado: Johnston, 1999).

Durante o crescimento hiperplásico e hipertrófico da musculatura, é observada a retomada dos eventos ocorridos durante a miogênese e as contribuições relativas da

hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular são variáveis, dependendo da espécie, fase de crescimento e tipo de músculo (Dal Pai et al., 2000; Johansen e Overturf, 2005; Aguiar et al., 2005; Almeida et al., 2008, 2010).

1.3. Catabolismo muscular

O processo de crescimento bem como a manutenção do fenótipo muscular, é controlado pelo balanço entre a ativação ou inibição de vias de sinalização, que controlam a atividade das vias catabólicas e anabólicas na musculatura estriada esquelética (Bonaldo e Sandri, 2013; Johnston et al., 2011). Na aquicultura, muitos estudos têm como foco principal a maximização do processo de síntese proteica durante o crescimento muscular, fato que pode ser obtido pelo aumento da taxa de síntese e diminuição da degradação proteica (Wilson et al., 2015).

O catabolismo proteico muscular é um mecanismo que ocorre normalmente para a manutenção do turnover proteico normal do músculo (Sartorelli e Fulco, 2004), na sarcopenia e caquexia (Sakuma e Yamaguchi, 2012) e também pode ocorrer sob a influência de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, como a temperatura, a disponibilidade de alimentos e a qualidade da água (Johnston et al., 2011; Fuentes et al., 2012; Paula et al., 2017). Situações de estresse podem promover a degradação de proteínas musculares, processo que ocorre principalmente pela ativação do sistema não lisossomal ubiquitina-proteassoma (USP- Ubiquitin Specific Protease), entre as quais destacam-se as ubiquitinas-ligases e a via relacionada com a autofagia (Seiliez et al., 2008; Bower et al., 2010; Fuentes et al., 2012; Bonaldo e Sandri, 2013).

O sistema USP é constituído por ubiquitinas ativadoras de enzimas (E1), ubiquitinas transportadoras de proteína (E2) e ubiquitinas de conjugação de enzimas (E3 ubiquitina ligases), responsáveis pelo reconhecimento, ubiquitinação e degradação de proteínas musculares (Fuentes et al., 2012). Dentre as USPs destacam-se os genes que participam do processo referentes a E3 ubiquitinas, tais como: *murf*, *fbxo25* e *mafbx* (Fuentes et al., 2012), importantes pela participação no controle do turnover protéico e manutenção da função muscular (Sarbasov et al., 2005; Wullschleger et al., 2006) (Figura 04).

Na degradação proteica via sistema USP ocorre a ligação das proteínas a serem degradadas às moléculas de ubiquitinas (ubiquitinação das proteínas), processo mediado por enzimas E3 ubiquitina-ligases. Essas E3 catalizam a transferência das proteínas de uma forma ativa da molécula de ubiquitina para uma molécula de

ubiquitina carreadora (E2); posteriormente essas proteínas são carreadas até o proteossoma 26S onde são degradadas (Bower e Johnston, 2010; Fuentes, et al., 2012; Tacchi et al., 2010; Tacchi, et al., 2012).

Cleuele e Evenhuis, 2010 demonstraram, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), após 28 dias de privação alimentar, um aumento nos níveis de expressão do gene *mafbox* nos músculos *fast* e *slow*, com um decréscimo nos níveis após o período de realimentação sem alteração na expressão de *fbxo25* em ambas as musculaturas, *fast* e *slow*. Fuentes et al., 2012 observaram em juvenis de linguado (*Paralichthys adspersus*), após 21 dias de privação alimentar, um aumento na expressão de *mafbox* e *murfl* no músculo *fast* e um decréscimo após quatro semanas de realimentação. Mareco et al, 2015, através da realização do transcriptoma do músculo vermelho e branco do pacu, realizou um estudo abrangente sobre os componentes de vias metabólicas, de miogênese e anabólicas. O estudo também possibilitou a avaliação da expressão gênica da ubiquitina ligase E3 e de componentes da via USP, no contexto da transição entre o estado de jejum de 5 dias (estado catabólico) e a saciação (estado anabólico).

Paula et al., 2017 demonstraram que, juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a privação alimentar por curtos períodos de tempo (10 dias) e realimentados por 60 horas, obtiveram um aumento nos níveis dos genes envolvidos com as vias catabólicas, como o *fbxo25*, *atg12* e *bcl2* no músculo *fast* e um decréscimo na expressão desses genes após 6 e 60 horas de realimentação.

A atividade dos genes catabólicos pode ser modulada por ações diretas ou indiretas através da interação com fatores transcricionais como o *pgc1 α* (do inglês: *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha*), cofator envolvido com a biogênese mitocondrial, como uma estratégia de suporte energético, via aumento do número de mitocôndrias e síntese de ATP (Fuentes et al, 2013). Acredita-se que a manutenção de altos níveis de *pgc1 α* durante condições catabólicas ocorra como uma possível adaptação do animal na tentativa de manter os processos metabólicos basais do tecido em situações de desequilíbrio entre as atividades anabólicas e catabólicas no músculo estriado (Wende et al., 2005; Puigserver et al., 2003).

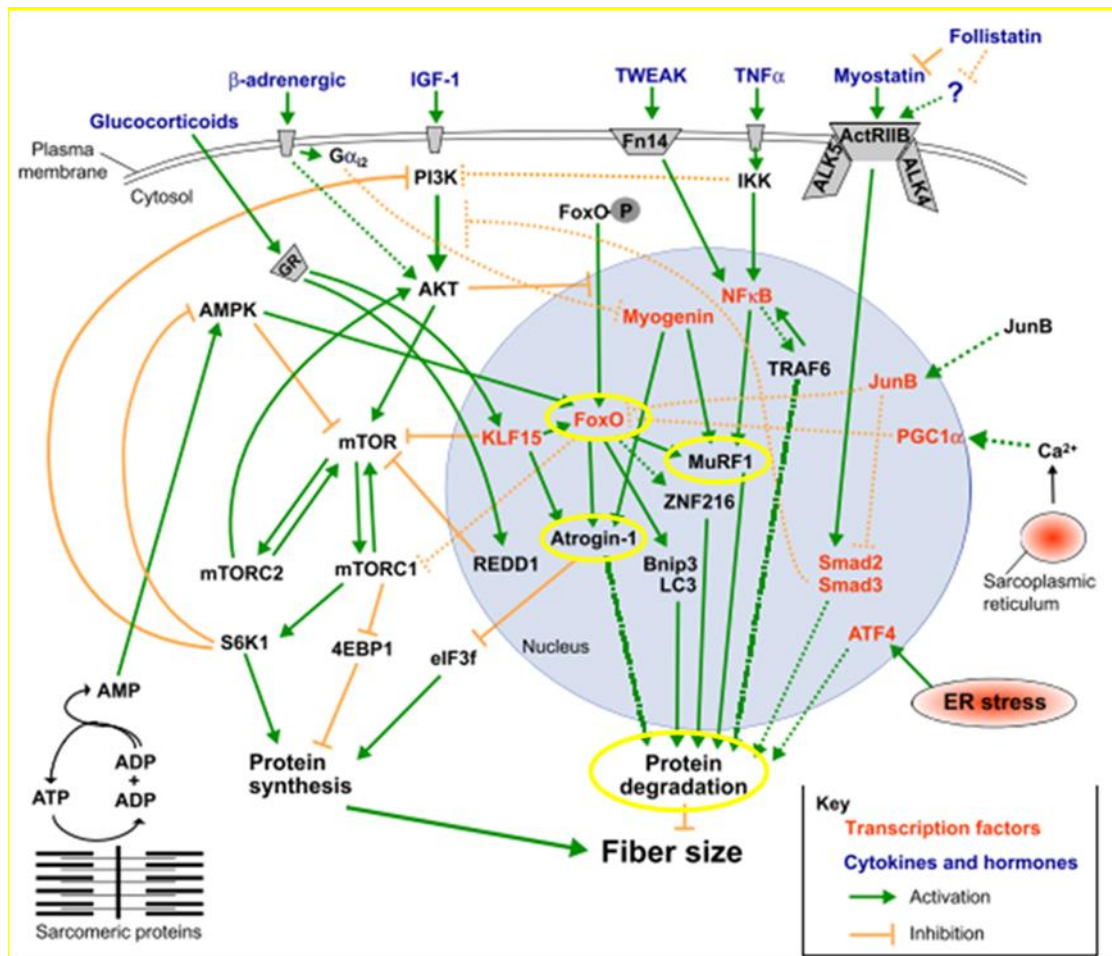


Figura 4. Equema das principais vias de sinalização (Catabólica - *murf*, *foxo*, *atrogin-1/mafbx*) e (Anabólica - *igf-1*, *pi3k*, *akt*, *mtor*) que controlam o fenótipo da fibra muscular (Adaptado: Bonaldo e Sandri 2013).

1.4. Anabolismo muscular (Via de sinalização *igf*→*pi3k*→*akt*→*mtor*)

A via do *igf-1* é uma das principais vias envolvidas no crescimento muscular (Schiaffino et al., 2013). A interação do *igf-1* (*insulin like growth factor 1*) ao seu receptor leva à ativação do *pi3k* (*phosphatidyl-inositol-3 kinase*), que promove a ligação com *akt* (*Sandrine-threonine kinase*). Quando ativa, essa quinase leva a fosforilação de *mtor* (*mammalian target of rapamycin*) que estimula a síntese proteica através da ativação da proteína p70S6K (Schiaffino et al., 2013). O sistema IGF, constituído pelos IGFs (I e II), seus receptores e pelas proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs: *IGF binding proteins*), é essencial para a formação, crescimento e manutenção do fenótipo do músculo esquelético (Funkenstein et al., 2006) (Figura 4).

O *igf-1* está envolvido com a regulação do metabolismo celular de proteínas, lipídios, carboidratos e minerais, com a proliferação e diferenciação celular e com o crescimento corporal (Moriyama et al., 2000). Vários tecidos, como o cérebro, músculo,

rins e intestino produzem *igf-1* localmente, embora o fígado seja o sítio primário de sua produção, sendo responsável pela produção de 75% de todo o *igf-1* circulante do corpo (Schweer et al., 1983). As funções do *igf-1* sobre o músculo esquelético são bem estabelecidas em mamíferos, sendo já descrito o alto nível de conservação das proteínas envolvidas nessa via, entre os vertebrados. O *igf-1* possui importantes ações metabólica e mitogênica, e está envolvido com a regulação do desenvolvimento e crescimento muscular (Reinecke et al., 1997; Reinecke e Collet, 1998).

O *igf-1* regula as vias anabólicas do músculo esquelético, levando ao aumento ou manutenção da massa muscular (Otto e Patel, 2010). O aumento da massa muscular, pelo processo de hipertrofia pode ocorrer pela incorporação de núcleos de células precursoras miogênicas após proliferação, às fibras musculares em crescimento ou em regeneração (Florini et al., 1993, 1996). O *igf-1* pode ativar duas principais vias de sinalização: mediada pela *mapk* (*mitogen activated protein kinase*) que promove a proliferação de mioblastos, durante a miogênese, ou de células precursoras miogênicas, durante o crescimento muscular (Halevy e Cantley, 2004); a segunda via de sinalização que pode ser ativada, é mediada pelas proteínas *pi3k/akt/mtor*, que promovem a ativação de diferentes proteínas-alvo, resultando no aumento da síntese de proteínas musculares levando à hipertrofia (Lai et al., 2004). A manutenção da massa muscular, mediada pelo *igf-1*, ocorre pela inibição das vias da atrofia muscular, impedindo a degradação e a perda de massa muscular (Otto e Patel, 2010).

1.5. Resveratrol e Exercício

Durante o metabolismo celular são produzidos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) que são neutralizadas por um sistema de defesa antioxidante. Esse sistema consiste de enzimas, como a catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e vários antioxidantes não enzimáticos incluindo vitaminas A, E e C, glutathione e flavonóides (Urso e Clarkson, 2003). O resveratrol (RES) é um polifenol quimicamente caracterizado como *3,5,4'-tri-hydroxystilbene* presente nas sementes e casca das uvas, vinho tinto, amoras, mirtilos e amendoim, entre outras fontes (Nieman et al., 2012). O vinho tinto é uma das fontes naturais mais comum de resveratrol. Muitos estudos in vivo e in vitro relataram diferentes propriedades importantes deste composto natural. Não é um composto tóxico, sendo facilmente absorvido e bem tolerado pelos seres humanos (Walle et al., 2004).

O resveratrol possui várias ações biológicas como ação antioxidante (Howitz et al., 2003), efeito cardioprotetor, inibidor da atividade NF-kBeta e ativa a proteína quinase AMPK (Dutt et al., 2015; Tian et al., 2016; Yang et al., 2016). Estudos tem demonstrado que o resveratrol possui efeito benéfico, *in vivo e in vitro*, inibindo a degradação proteica, atenuando assim a atrofia muscular, como demonstrado em estudos *in vitro* (Wyke et al., 2004; Wang et al., 2014). Estudos *in vivo* demonstraram que a suplementação de resveratrol atenuou a perda de massa muscular e a degradação proteica em camundongos caquéticos (Wyke et al., 2004). Muitas evidências têm indicado que esse composto tem efeitos benéficos atenuando a atrofia muscular em condições como diabetes, caquexia e distrofia muscular de duchene (Chen et al., 2012; Hori et al., 2011; Shadfar et al., 2011).

Estudos realizados em peixes examinaram os efeitos dos antioxidantes sobre o crescimento muscular para avaliar a aplicação prática desses suplementos na aquicultura. Estes estudos indicam que a suplementação antioxidante em peixes tem potencial para aumentar o crescimento, mas os efeitos são espécie específicos e dependentes da dose (Darias et al., 2011). Esta visão também é consistente com estudos que examinaram os efeitos de produtos oxidados na dieta de peixes. A suplementação dietética de óleo de peixe oxidado mostrou aumentar o estresse oxidativo, levando a uma diminuição do crescimento de peixes, como em juvenis de dourada (Gao et al., 2012).

Segundo Wilson et al. (2015), juvenis de linguado (*Paralichthys lethostigma*) suplementados com resveratrol tiveram uma diminuição nos marcadores de dano oxidativo muscular e na degradação de proteínas levando a um aumento no crescimento. O estudo mostrou que o RES parece exercer efeitos antioxidantes no músculo e, provavelmente, outros tecidos, levando a uma redução do dano oxidativo lipídico, uma menor degradação proteica possibilite o o aumento do crescimento.

Há um crescente interesse em investigar o potencial do RES para modular o desempenho físico e prevenir o estresse oxidativo (Dolinsky et al., 2011). Assim, alguns autores têm demonstrado que a combinação de resveratrol e exercício melhora a função muscular, aumentando a capacidade de exercício e a resistência muscular esquelética (Yu et al., 2002; Dolinsky et al., 2012).

Em um estudo envolvendo 14 atletas, a suplementação com RES foi eficaz na inibição da peroxidação lipídica causada pelo exercício (McAnulty et al., 2013), e

também aumentou a expressão de enzimas antioxidantes em células endoteliais (Spanier et al., 2009) e músculo liso (Gu et al., 2014).

Segundo Sung et al. (2017), o tratamento com RES em camundongos com insuficiência cardíaca induzida por constrição da aorta, promove uma melhora na performance do exercício, o qual leva à alteração na composição da microbiota intestinal, com melhor aproveitamento da glicose e melhora no metabolismo e função muscular. Os resultados sugerem que a suplementação com resveratrol pode efetivamente melhorar a fadiga e a intolerância ao exercício que ocorre na insuficiência cardíaca através desses mecanismos.

Muhammad et al., 2017 estudaram o efeito anti envelhecimento da suplementação de RES associado ao exercício natatório (4 semanas) no músculo gastrocnêmio em camundongos. Os autores observaram que houve um aumento no tempo de exaustão nos animais dos grupos que receberam resveratrol e/ou exercício, e o grupo resveratrol/exercício apresentou maior atividade da enzima citrato sintase, índice aumento da função mitocondrial. Conforme os estudos de Liao et al. (2017), o exercício, o resveratrol e a combinação dos dois elementos provavelmente exercem um efeito protetor nas vias de sinalização envolvidas com a apoptose, pela ativação do sistema AMPK/Sirt1, melhora a qualidade muscular e prevenindo a perda de massa muscular no envelhecimento.

Liao et al., 2017 demonstraram que, em ratos senis, o exercício aeróbico de 6 semanas e a combinação exercício/resveratrol promoveram a melhora na massa do muscular no músculo gastrocnêmio aumentando significativamente a força de prensão relativa e massa muscular em ratos idosos. Os autores, relatam ainda que embora o resveratrol não aumente a qualidade do músculo esquelético, ele poderia melhorar a força e preservar a morfologia muscular e que a combinação do exercício/resveratrol pode ter um efeito sinérgico nesta melhora.

O *Piaractus mesopotamicus*, popularmente conhecido como pacu, é encontrado na bacia do Prata, mas sua distribuição está mais concentrada nas planícies alagadas da região Centro-Oeste do Brasil, sendo um dos peixes mais estudados no Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiros. Possui crescimento rápido e indeterminado, com peso variando de 1,0 a 1,5 kg no primeiro ano de criação, podendo, posteriormente, atingir até 20 kg (Urbinati & Gonçalves, 2005). No Brasil, o cultivo do pacu corresponde à aproximadamente 33.5% da produção nacional (MPA, 2013). É uma espécie que apresenta diversas características economicamente interessantes, como rusticidade, alta

fertilidade, rápido crescimento, adaptação à alimentação artificial e carne saborosa, o que contribui para o alto valor comercial que possuem para a pesca e piscicultura brasileiras e a torna objeto de pesquisas para a melhoria de sua produção.

Vários estudos envolvendo a musculatura estriada do pacu tem sido realizados no nosso laboratório (Laboratório de Biologia do Músculo Estriado, LBME). Esses, envolveram a caracterização morfológica e do crescimento muscular (Dal Pai et al., 2000; Dal Pai-Silva et al., 2003), análises moleculares de fatores que regulam o crescimento muscular (Almeida et al., 2008; 2010), análises da expressão de microRNAs em diferentes fases do crescimento e em culturas primárias de mioblastos (Duran et al., 2015) e análises globais de expressão gênica nos músculos, vermelho e branco (Mareco et al., 2015). Estudos envolvendo a ação de fatores extrínsecos, como privação alimentar seguida de realimentação, nessa espécie, também tem sido realizados demonstrando que, durante o período de jejum, a musculatura branca é mais afetada do que a musculatura vermelha, fato que foi observado pela análise da expressão gênica de componentes da via do catabolismo e anabolismo muscular (Mareco et al., 2015; Gutierrez de Paula et al., 2017).

Como a musculatura estriada esquelética, que corresponde à maior parte da massa corporal, é uma importante fonte de proteínas para o consumo, estudos que envolvem a caracterização do crescimento muscular bem como a utilização de componentes nutricionais que atuem favorecendo positivamente o crescimento e a plasticidade muscular são de extrema relevância, tendo em vista que a taxa de crescimento ou o desempenho nos peixes é um parâmetro importante para o sucesso da aquicultura e está diretamente relacionada com o ganho de massa muscular.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de protocolos envolvendo o enriquecimento de rações com antioxidantes vêm ganhando espaço no meio científico e no setor produtivo, pois acredita-se que o cultivo de peixes, como o pacu, com esse tipo de suplementação pode ser utilizado na aquicultura como estratégia alimentar para aumentar e favorecer o crescimento, e conseqüentemente, diminuir os custos na produção pela diminuição do estresse.

Como antioxidantes também podem melhorar o desempenho físico e prevenir o estresse oxidativo, a combinação de resveratrol e exercício pode melhorar a função muscular, aumentar a resistência e o ganho de massa muscular.

3. HIPÓTESE

A nossa hipótese é que o resveratrol potencializa o crescimento muscular em pacus, submetidos ao exercício natatório.

4. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é avaliar o efeito do resveratrol no crescimento muscular de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), submetidos ao exercício natatório nos seguintes parâmetros;

- a) A morfologia e a morfometria das fibras musculares;
- b) A atividade das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT).
- c) A expressão de genes envolvidos com a miogênese (*myod* e *miogenina (myog)*), com as vias do catabolismo (*fbxo25* e *murfla*), do anabolismo (*igf-1*, *pi3k* e *mtor*) e metabolismo energético (*sdha* e *pgc1-α*).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado no Pólo Regional da Alta Sorocabana, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Presidente Prudente, SP. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado Esquelético (LBME), no Departamento de Morfologia, IBB, UNESP, Botucatu. Os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os Princípios Éticos em Pesquisa Animal aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo do experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (Protocolo nº 1020-CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu, São Paulo.

Alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com aproximadamente 20g foram cultivados em 2 sistemas de recirculação contendo 4 caixas d'água de 0,25 m³ cada, com filtro biológico e sistema ultravioleta. A densidade dos peixes foi de 80 peixes/m³. Foi mantido um fluxo de água constante em cada caixa, de modo que em duas caixas esse fluxo foi aleatório (Figura 5A). Em outras duas caixas, um fluxo direcionado de

água formou uma corrente circular (com força centrípeta) promovendo uma situação de exercício, forçando os peixes a nadarem contra o fluxo (Figura 5B), a uma velocidade de 27,5 cm/s, semelhante ao utilizado por Johnston et al., 1980. O fluxo da água, inicialmente com velocidade de 12,7 cm/s, foi gradualmente aumentada (2,11 cm/s ao dia) ao longo de uma semana até atingir a velocidade final de 27,5 cm/s, que se manteve constante até o final do experimento (30 dias).

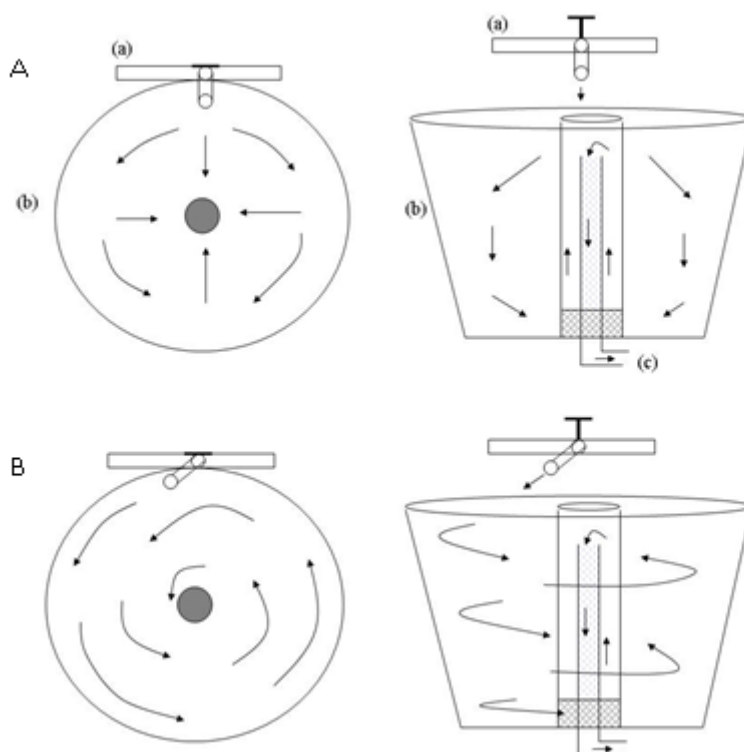


Figura 5. Esquema do modelo de exercício utilizado no experimento. À esquerda, vista superior dos tanques de cultivo e à direita, visão frontal dos tanques de 0,25 m³. A) Sistema de cultivo em que os peixes não passam por situação de exercício natatório. B) Sistema de cultivo promoveo corrente de água circular para promover a condição de exercício natatório nos peixes. (a) sistema de abastecimento de água; (b) caixas d'água de 0,25 m³; (c) sistema de escoamento da água das caixas para o sistema de filtragem. As setas indicam a direção das correntes formadas pela água.

A temperatura da água dos sistemas de recirculação foi mantida à 28° C. O oxigênio dissolvido e temperatura foram monitorados diariamente e pH, alcalinidade, dureza, amônia, nitrito e nitrato semanalmente.

Os peixes foram alimentados três vezes ao dia e a quantidade fornecida foi até a saciedade aparente. Em quatro caixas, os peixes foram alimentados com ração formulada e suplementada com resveratrol (0,06% de inclusão) e nas outras 4 caixas, os peixes foram alimentados com ração normal (Padrão/Referência). A composição das

rações está apresentada na Tabela 1. Foram constituídos 04 grupos experimentais: Controle (C), Controle Exercício (CE), Resveratrol (R), e Resveratrol Exercício (RE).

Tabela 1. Composição nutricional das rações utilizadas nos diferentes tratamentos.

COMPOSIÇÃO	Referência	Suplementada
ED	3036,66	3034,90
PD	25,00	25,00
PB	27,50	27,50
FB	4,67	4,67
EE	6,00	6,00
Ca	1,14	1,13
Pdisp.	0,75	0,75
MM	5,14	5,14
Resveratrol	0,00	0,06

Energia digestível (ED); Proteína digestível (PD); Proteína bruta (PB); Fibra bruta (FB); Extrato etéreo (EE); Cálcio (Ca); Fósforo disponível (Pdisp.); Matéria mineral (MM).

Durante o arraçoamento o sistema de recirculação de água foi desligado por um período de 30 minutos para permitir o consumo da ração pelos peixes. Foram feitas amostragens de 10 peixes de cada tratamento no início (0 dias), aos 03, 07 e 30 dias de cultivo. Os peixes passaram por um período de 24 horas de jejum antes da coleta das amostras musculares. Em cada período, todos os animais antes das coletas foram insensibilizados e eutanasiados por meio de benzocaína diluída na água, na concentração de 250mg/L durante 10 minutos, até a interrupção do movimento opercular.

No início (0 dias), 3, 7 e 30 dias (final do experimento), foram aferidos o peso (g) e o comprimento padrão (cm). Os animais foram anestesiados com benzocaína (100-200 mg/L de água) e eutanasiados. Amostras musculares foram retiradas, (músculo branco, n= 7 de cada grupo), na porção mediana do corpo, abaixo da nadadeira dorsal (Figura 6), e processadas para a avaliação morfológica e morfométrica, bioquímica e molecular.

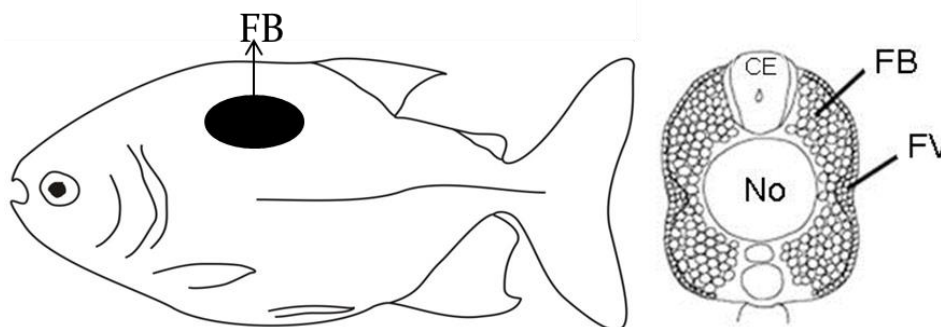


Figura 6. À esquerda, esquema demonstreo o local de coleta das amostras do tecido muscular, abaixo da nadadeira dorsal (FB), em vista longitudinal. À direita, esquema de corte transversal do corpo, localizando a profundidade do corte para retirada da amostra muscular. Legenda: FB; fibras brancas. FV; fibras vermelhas. No; notocorda. CE; cordão espinal.

5.2. Análise morfológica e morfométrica

Amostras musculares dos peixes dos grupos estudados, coletados aos 7 e 30 dias foram fixadas em formol tamponado, processadas e incluídas em historesina. Secções transversais de 4 μ m foram obtidas com Micrótomo Leica RM2165 e coradas em Hematoxilina e Eosina, para a análise do padrão geral da morfologia das fibras musculares.

Foi calculado o diâmetro de 1000 fibras musculares por animal com auxílio de um microscópio Leica DM50 acoplado a um sistema de análise de imagem. Os valores do diâmetro médio das fibras musculares foram agrupados nas classes de diâmetros <20, 20-40, 40-60 e >60 μ m, conforme a metodologia adotada por Almeida et al. (2008), e as médias foram plotadas em um histograma de frequência (%). Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis One Way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla Dunn para diferenças entre os tratamentos. O nível de significância foi de 5% para todas as análises.

5.3. Análise de expressão gênica

Para a análise da expressão gênica, fragmentos de músculo branco dos peixes dos grupos estudados foram retirados aos 3 e 7 dias, foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até o processamento. A avaliação quantitativa da expressão gênica foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR).

A avaliação da expressão gênica dos marcadores de miogênese (*myod* e *miogenina - myog*), síntese proteica (*igf-1*, *mtor*, *pi3k*), metabolismo oxidativo (*pgc1a* e *sdha*) e degradação proteica (*fbxo25*, *murfla*) no músculo esquelético foi realizada

através da reação PCR em tempo real (RT-qPCR). Os primers dos genes avaliados (Tabela 2) foram desenhados com base nos dados obtidos do transcriptoma do músculo vermelho e branco do pacu depositado no European Nucleotide Archive accession, número: PRJEB6656 (Mareco et al., 2015). Os primers foram desenhados através do software Primer3 v.0.4.0 e NetPrimer (Premier Biosoft, USA).

Tabela 2. Descrição do gene e sequência dos primers utilizados no experimento

Identificação do Gene	Sequência do Primer
<i>myod</i>	5' GTTCGTCGTCTTCCTCTTGC 3' 5' ACCCGTGCTTTAACACCAAC 3'
<i>myog</i>	5' CAGACCAGAGGTTTTATGAA 3' 5' TAGATGTTGGGGATGGCTTG 3'
<i>igf 1</i>	5' ATTTCAGCAAGCCAACAGGT 3' 5' CGCACAAATACATCTCAAGTCG 3'
<i>pi3k</i>	5' GTCTGGAGCCTGGCAGTAAG 3' 5' CTTCTGTGTGCTGGGAGTCA 3'
<i>mtor</i>	5' TTGGGAGAGACGTACTION 3' 5' CACAGGACTGGTGTAGGAA 3'
<i>sdha</i>	5' ACCTGATGCTGAATGCTGTG 3' 5' AGTGTGCTTCCTCCAGTGC 3'
<i>pgc1-α</i>	5' GAGGGTGAGCGTTCAAAGAG 3' 5' ATGAGGCTGAGCAGAGAGGA 3'
<i>fbxo25</i>	5' CGTAGGTGAAGTAGCCGCCA 3' 5' GGAGAAGTCCAGCCTGTTGA 3'
<i>murfla</i>	5' CCATTGATGCCTTGGTTGC 3' 5' CCTTCTCGTCCTGCTCTTTG 3'

5.4. Extração do RNA total

Os fragmentos musculares congelados foram homogeneizados com o homogeneizador politrom em 1ml de TRIzol Reagent para cada 50/100mg tecido (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O material foi incubado por 5 minutos em temperatura de 28°C. Em seguida, foi descartada a parte insolúvel e adicionado 0,2ml de clorofórmio para cada 1ml de TRIzol e a solução foi incubada por 3 minutos à temperatura de 28°C. O material foi centrifugado a 12000rpm por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa formada foi separada. O RNA foi precipitado com 0,5 ml de álcool isopropílico por 10 minutos à temperatura de 28°C e, posteriormente, centrifugado a 12000rpm por 10 minutos a 4°C. O “pellet” de RNA formado foi lavado com 1 ml de etanol 75 %, centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante removido cuidadosamente.

Após secagem, o pellet de RNA foi dissolvido em *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, USA) e armazenado a -80°C até o processamento. Para a quantificação do RNA foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare, USA), que também permitiu uma estimativa da qualidade da extração pela medida de absorbância de 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 (Tabela 3). A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A agarose foi dissolvida em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA). Uma alíquota de 1 µL do RNA total foi adicionada a 5 µL de uma solução contendo o tampão de corrida OrangeG e o corante *GelRed®* (Biotium, USA). Essa mistura foi aplicada no gel e submetida à corrida eletroforética a 120 V por cerca de 1 hora e 30 minutos. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e a integridade do RNA total extraído foi confirmada pela presença das bandas referentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S.

Além disso, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar no sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, USA), que fornece um número de integridade do RNA (RIN) baseado nas bandas do 28S e 18S. A amostra de RNA é classificada num sistema numérico de 1 a 10, sendo 1 o perfil de maior degradação e 10 o perfil de maior integridade. Nós utilizamos somente amostras com um RIN igual ou superior a 7.0.

Tabela 3. Razões de absorvância e concentração do RNA total extraído das amostras de músculo branco dos exemplares de alevinos de pacu analisados.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Razão (A_{260}/A_{280})	Razão (A_{260}/A_{230})
1	1905	2,04	1,61
2	1975	2,03	1,72
3	1223	2,06	1,71
4	1196	2,28	1,68
5	1926	2,07	1,70
6	1170	1,93	2,13
7	1147	2,00	1,62
8	1085	2,03	1,74
9	1063	1,96	1,73
10	1192	1,97	1,63

5.5. Tratamento do RNA com DNase

Durante os procedimentos de extração do RNA, pode ser que ocorra contaminação das amostras por DNA genômico. Esse DNA contaminante pode, eventualmente, servir de molde durante a amplificação pela PCR, gere um produto que não corresponde ao fragmento de interesse. Dessa forma, o RNA total extraído foi submetido ao tratamento com o kit *DNase I, Amplification Grade* (Thermo Fisher Scientific, USA), a fim de eliminar qualquer possível resíduo de DNA genômico contaminante das amostras. Conforme as instruções do protocolo, 1 μL de *10X DNase I Reaction Buffer*, 1 μL de *DNase I Amplification Grade* (1 U/ μL) e *UltraPureTM Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, USA), na quantidade suficiente para completar 10 μL de solução, foram adicionados a 1 μg do RNA total de cada amostra. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 μL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima *DNase I*.

5.6. Transcrição reversa

Foi realizada a transcrição reversa do RNA pelo *High Capacity cDNA archive kit* (Thermo Fisher Scientific, USA), em que 1 μg do RNA total tratado com *DNase I* (11 μL de solução) foram acrescidos de 2 μL de *10X RT Buffer*, 0,8 μL de *25X dNTP Mix* (100mM), 1 μL de *MultiScribeTM Reverse Transcriptase* (50 U/ μL), 2 μL de *10X RT Reom Primers* e 1 μL de *RNase Inhibitor* (20 U/ μL). O volume final da reação foi ajustado para 20 μL com *UltraPureTM Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, USA). Cada amostra foi incubada a 25°C por 10 minutos, a 37°C por

120 minutos e a 85°C por 5 minutos. Os produtos da reação de transcrição reversa foram armazenados a -20°C e utilizados nas reações de PCR.

5.7. Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Os níveis de expressão dos mRNAs foram detectados por PCR em Tempo Real, através da plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA). As amostras de cDNA foram amplificadas utilizando-se o *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, USA) e primers sintetizados pela Invitrogen (USA). Os primers foram diluídos em *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, USA) e suas concentrações ajustadas para 5 µM. Conforme instruções do fabricante, foram utilizados 8 µL de cDNA diluído (1:20), 1.5 µL de *Primer Forward*, 1.5 µL de *Primer Reverse* e 4 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, USA), totalizando um volume final de 15 µL de solução. As reações foram realizadas em duplicata, nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Foi feita a análise da Curva de Dissociação dos fragmentos ao término de cada reação de PCR, um passo de 20 minutos em que a temperatura da reação aumenta gradualmente de 60 para 95°C, possibilitando a avaliação da especificidade de amplificação de cada conjunto de primers pela presença de um único pico de fluorescência.

A quantificação relativa da expressão foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando o software *DataAssist™ v3.01* (Thermo Fisher Scientific, USA). Foram testados os genes β -*ppia* e *rpl13* para utilização como genes de referência, porém as expressões dos genes alvo foram normalizadas pelo gene *ppia*, cujo valor de expressão foi constante entre todas as amostras utilizadas.

5.8. Análise bioquímica

Aos 3 e 7 dias do experimento, amostras musculares dos peixes dos grupos estudados foram retiradas e congeladas em nitrogênio líquido para a extração de proteínas. Foi utilizada uma solução contendo RIPA Buffer e um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, USA). Foi realizada uma trituração mecânica do tecido e, após centrifugação (8000 x g; 10 min; 4°C), o sobrenadante foi coletado e o conteúdo proteico foi quantificado. O extrato proteico foi utilizado para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT).

Em meio alcalino (pH 10.0), o composto hidroxilamina é capaz de gerar radicais livres que promovem a redução do reagente Nitro Blue Tetrazolium (NBT) e levam à formação de Formazan, que possui coloração roxa ou azulada. Após a adição das amostras, a atividade da enzima SOD foi determinada pela capacidade de inibir a redução do NBT, ocasionando alterações na intensidade da coloração proporcionais à concentração proteica.

Para avaliação da atividade da enzima CAT foram utilizados 30% de peróxido de hidrogênio em PBS e o reagente 3,3'-Diaminobenzidina (DAB). O peróxido de hidrogênio é capaz de oxidar o DAB e produzir um precipitado marrom, cuja intensidade da coloração pode ser alterada conforme a atividade da CAT. A atividade das enzimas foi avaliada em espectrofotômetro Ultrospec UV-Vis, Swift II Software (GE Healthcare Life Sciences, United Kingdom).

5.9. Análise estatística dos dados

Todos os dados foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Dunn para diferenças dentro do mesmo tratamento, e teste t entre os tratamentos. O nível de significância foi de 5% para todas as análises e o programa utilizado para as análises foi o GraphPad Prism 5 Software, USA.

6. RESULTADOS

6.1. Dados Biométricos, Morfologia e Morfometria Muscular

A análise do peso e comprimento dos peixes, nos grupos e períodos analisados mostrou que os animais do grupo RE apresentaram maior peso no final do experimento (30 dias). Os animais dos demais grupos não apresentaram diferença significativa no peso. O comprimento não variou entre os animais dos grupos estudados (Figura 7).

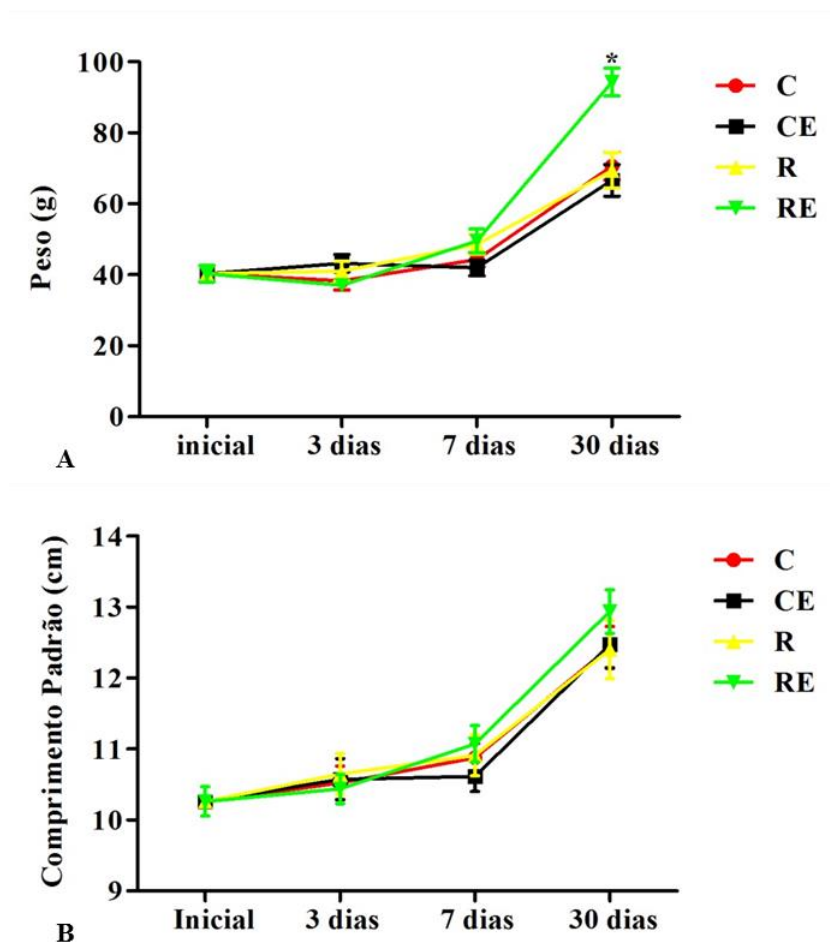


Figura 7. Gráficos com médias e desvio padrão do peso corporal (A) e comprimento padrão (B) dos pacus ao início, aos 3, 7 e 30 dias do experimento. *Diferença estatística significativa entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

A coloração das amostras musculares pela Hematoxilina e Eosina permitiu a observação das fibras musculares e os seus respectivos núcleos. As características morfológicas das fibras musculares foram normais e semelhantes nos peixes de todos os grupos estudados, sendo distribuídas em mosaico (fibras de diferentes formatos e tamanhos) (Figura 8).

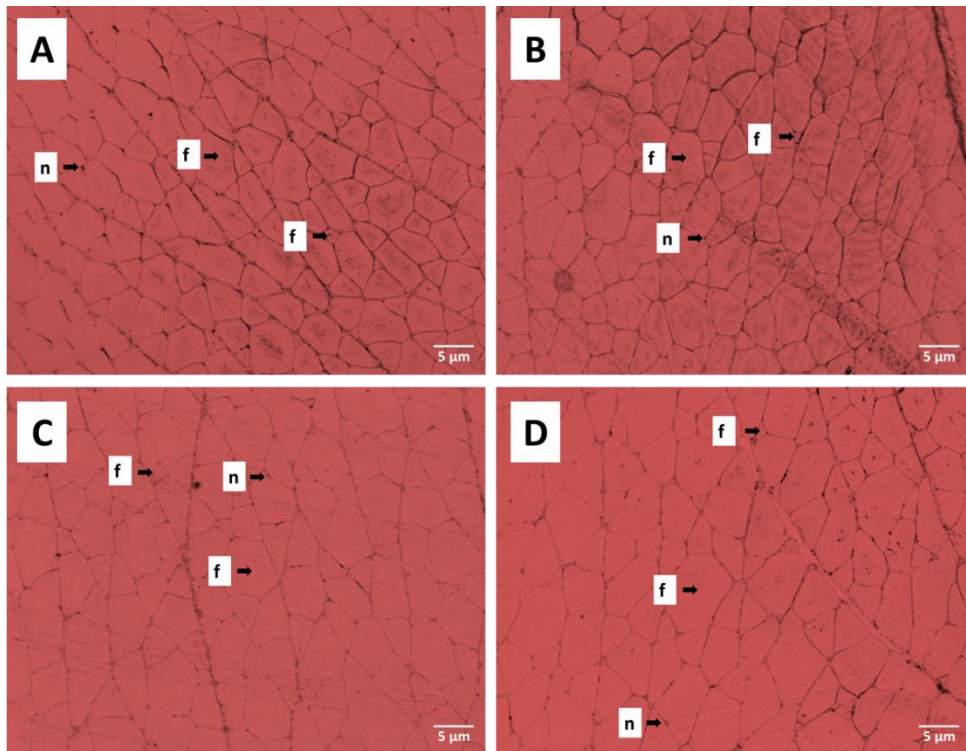


Figura 8. Seções transversais do músculo branco de pacu dos diferentes grupos estudados. Grupos: Controle, C (A); Controle e Exercício, CE (B); Resveratrol, R (C) e Resveratrol com Exercício, RE (D), aos 30 dias. Fibras musculares com morfologia normal (f), núcleos (n). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra: 5 μ m.

Em relação à distribuição das fibras em classes de diâmetro, observamos que, aos 7 dias, considero-se a classe $< 20\mu$, o grupo CE apresentou menor frequência de fibras nessa classe comparada ao grupo C. Os grupos R e RE foram semelhantes na frequência de fibras nessa classe de diâmetro. Na classe 20-40 μ , o grupo C apresentou maior proporção de fibras nessa classe comparada ao grupo R. Na classe 40-60 μ , os grupos, R e RE foram semelhantes quanto à frequência de fibras, sendo maior do que o grupo C. Na classe $> 60\mu$, o grupo CE apresentou maior frequência de fibras comparado com o grupo C, sendo semelhante aos demais grupos (Figura 9).

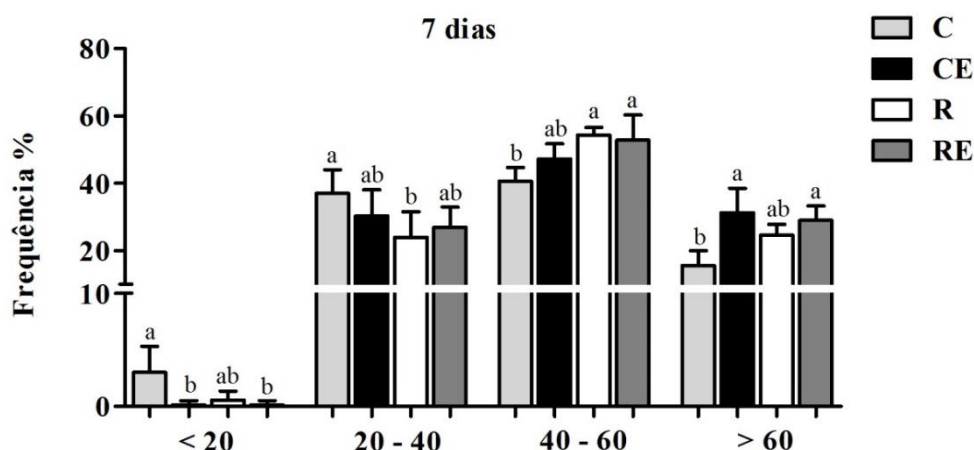


Figura 9. Gráficos de distribuição de frequência (%) das fibras musculares do pacu nas classes de diâmetros aos 7 dias, nos grupos estudados. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

Aos 30 dias, houve diferença entre os grupos RE e C analisados quanto à frequência das fibras nas classes de diâmetro de 20 – 40μm e > 60μm (Figura 10).

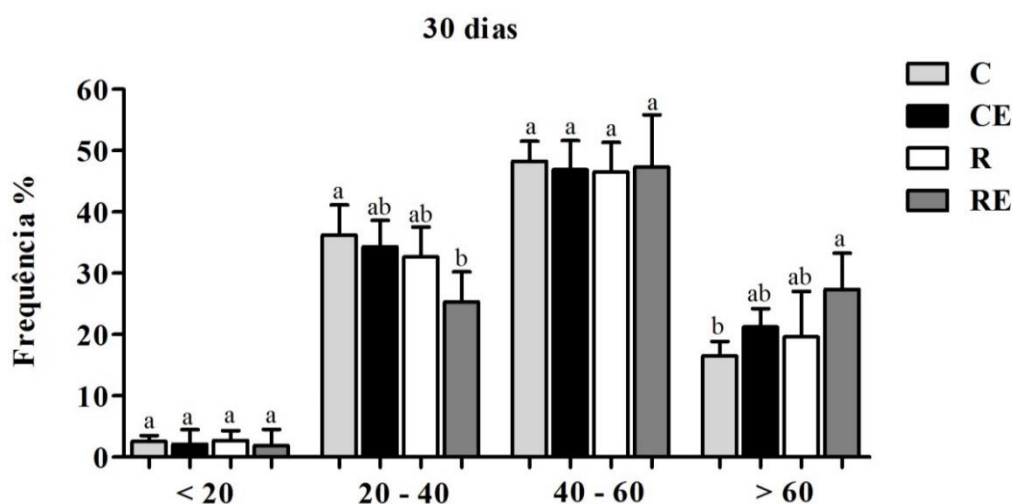


Figura 10. Gráficos de distribuição de frequência (%) das fibras musculares do pacu nas classes de diâmetros aos 30 dias, nos grupos estudados. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

6.2. Análise Bioquímica

A análise da atividade da enzima antioxidante Catalase (CAT) não mostrou diferença entre os grupos aos 3 dias do experimento. Aos 7 dias, o grupo CE mostrou uma diminuição da atividade da enzima, comparada com o grupo C (Figura 11). O grupo RE mostrou atividade da enzima menor do que o grupo R o qual foi semelhante ao grupo C. Em relação à atividade da enzima Sódio Dismutase (SOD), não houve

diferença estatística entre os grupos aos 3 dias do experimento e aos 7 dias, somente o grupo CE mostrou uma redução na atividade da enzima comparada aos grupos C e RE, que mostraram um padrão semelhante (Figura 12).

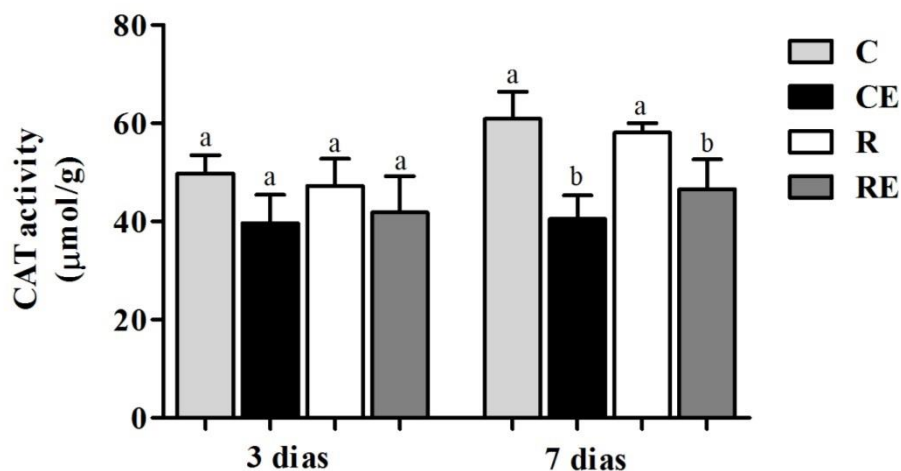


Figura 11. Avaliação da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em pacu aos 3 e 7 dias do experimento nos diferentes tratamentos. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

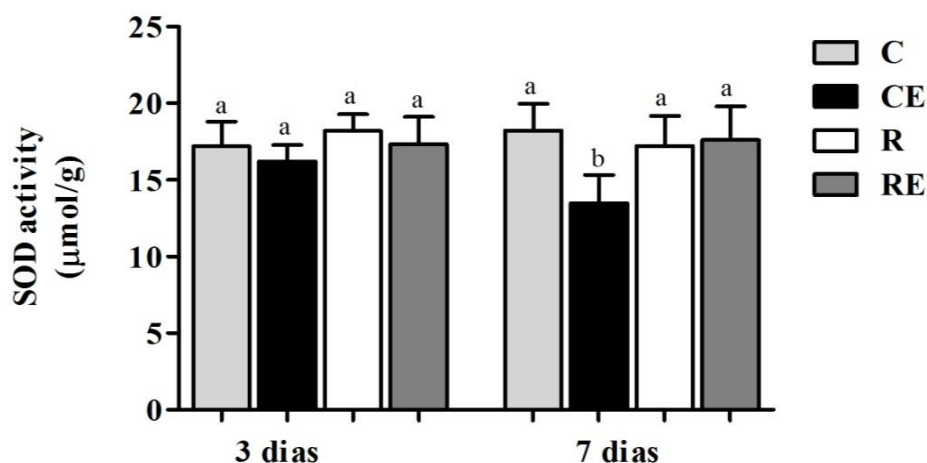


Figura 12. Avaliação da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em pacu aos 3 e 7 dias do experimento nos diferentes tratamentos. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

6.3. Análise da expressão gênica

A avaliação da expressão gênica dos marcadores de miogênese (*myod* e *myog*), 3 dias após o início do experimento, mostrou aumento nos níveis de expressão no grupo RE em relação ao grupo controle (C). Aos 7 dias, os grupos R e RE apresentaram aumento na expressão da *myod* em comparação aos grupos C e CE, respectivamente (Figura 13). Em relação à expressão da *myog*, 3 e 7 dias após o início do experimento,

observamos um aumento nos níveis de expressão no grupo R em relação ao grupo controle (C) (Figura 14).

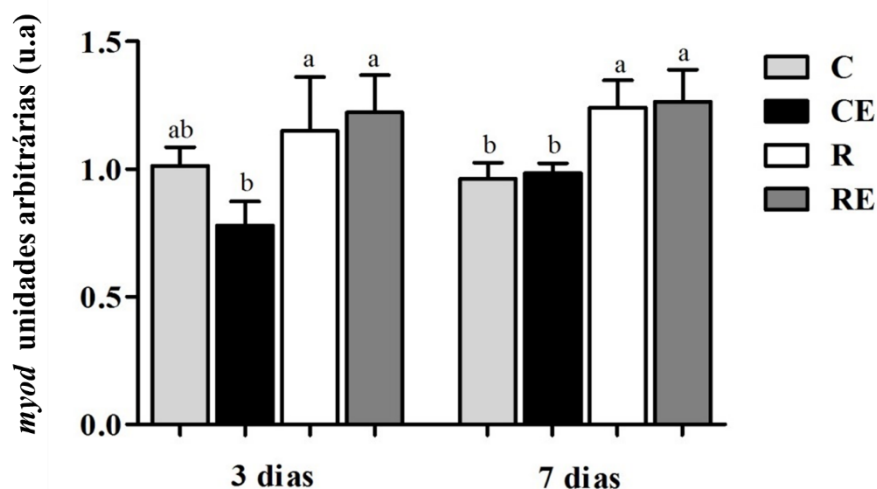


Figura 13. Expressão gênica da *myod* em pacus durante o experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

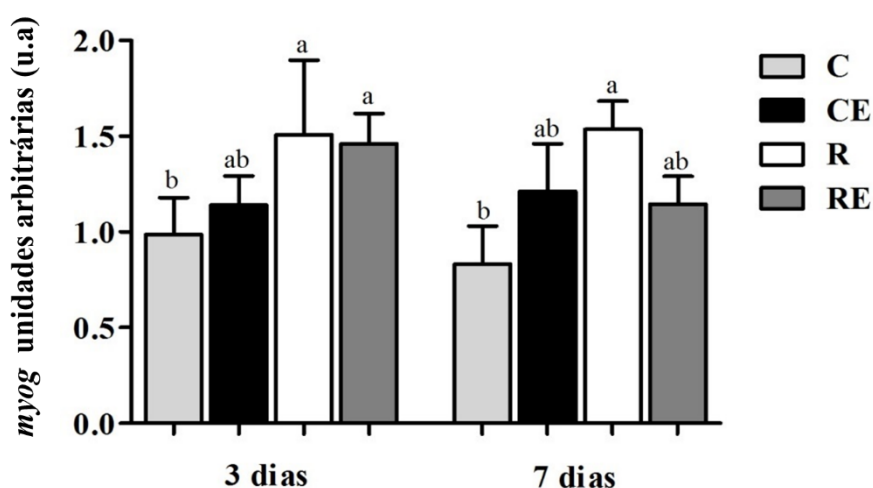


Figura 14. Expressão gênica da *myog* em pacus durante o experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

A avaliação da expressão do mRNA dos genes envolvidos com o anabolismo (*igf-1*, *pi3k* e *mtor*), após 3 dias do início do experimento, mostrou um aumento nos níveis de expressão do *igf-1* no grupo RE em relação ao grupo R. Aos 7 dias, o grupo RE apresentou aumento na expressão do *igf-1* em comparação aos demais grupos C, CE e R (Figura 15A). O gene *pi3k* apresentou aumento dos níveis de expressão nos grupos R e RE, comparados aos grupos C e CE; já, aos 7 dias, a expressão desse gene nos grupos R e RE foi menor comparado aos grupos C e CE (Figura 15B). A expressão do gene *mtor* mostrou variação somente aos 7 dias. Nos grupos R e RE a expressão foi

maior em comparação aos grupos C e CE. No grupo CE, o nível de expressão foi menor comparado com o grupo controle C (Figura 15C).

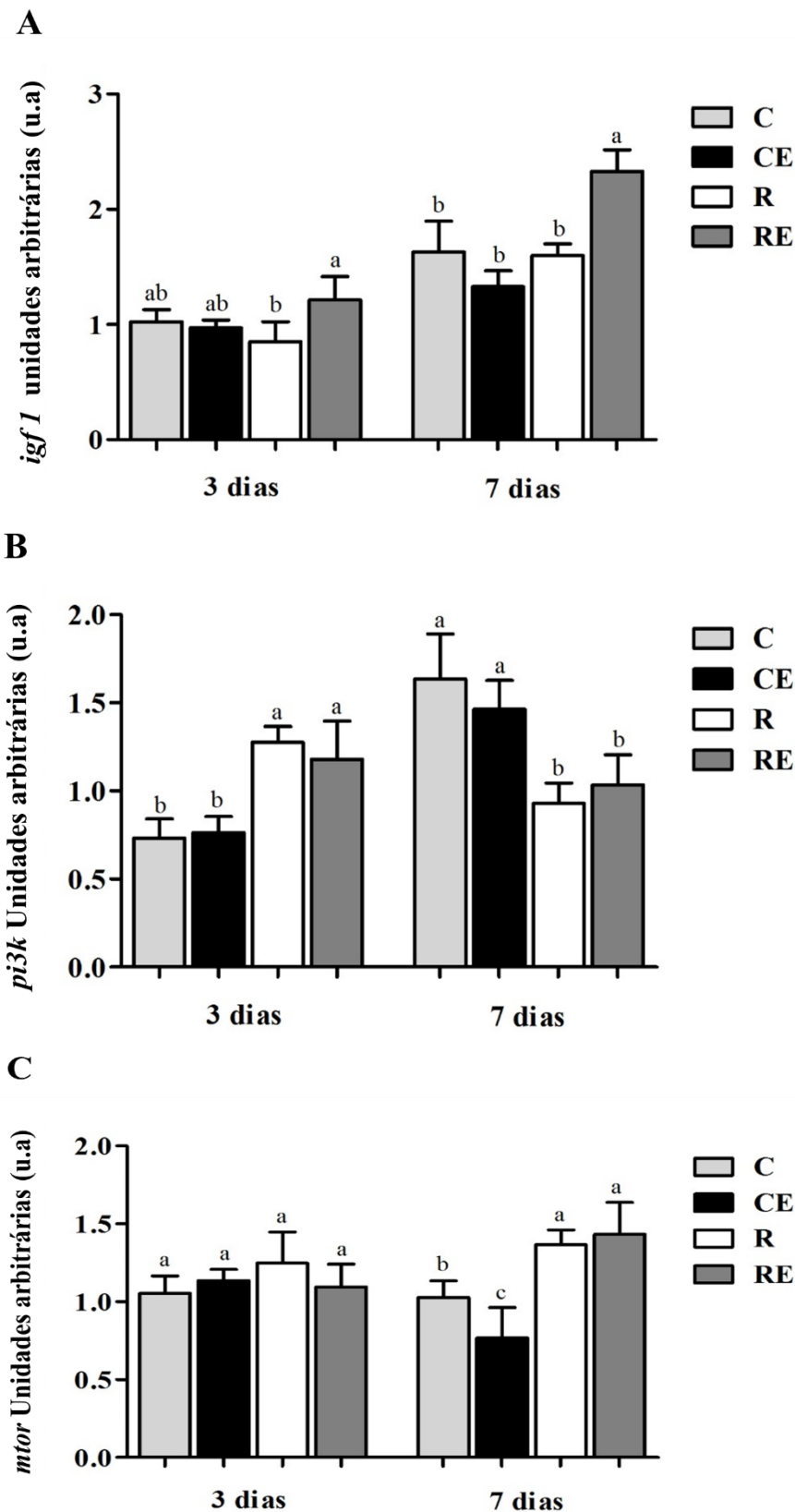


Figura 15. Expressão dos mRNA em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. *igf-1* (A); *pi3K* (B); e *mtor* (C). Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

Em relação à expressão do mRNA dos genes envolvidos com metabolismo energético (*sdha* e *pgc1- α*), os níveis de expressão do gene *sdha* não apresentou diferença após 3 dias do início do experimento. Aos 7 dias, observou-se um aumento nos níveis de expressão do gene no RE comparado aos grupos CE e R. O grupo R apresentou uma expressão maior comparado ao grupo C (Figura 16). Em relação à expressão do mRNA do gene *pgc1- α* , os níveis de expressão aos 3 dias, foi maior nos grupos CE e R comparada aos grupos C e RE. Aos 7 dias, os grupos C e CE apresentaram níveis de expressão do gene maior comparado aos demais grupos, R e RE. O grupo CE apresentou maior expressão desse gene comparado ao grupo C (Figura 17).

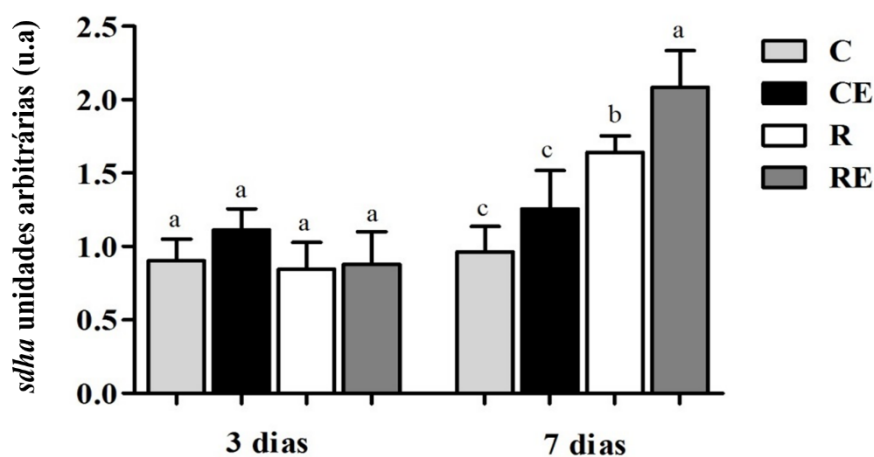


Figura 16. Expressão do gene *sdha* envolvido com o metabolismo em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

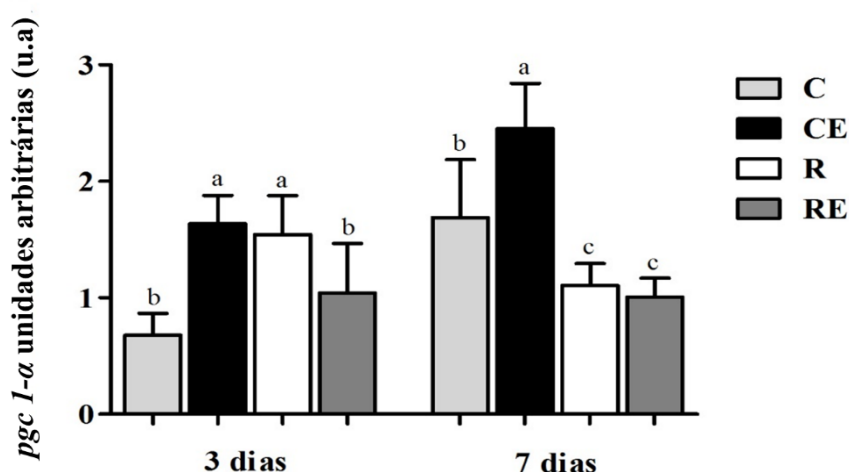


Figura 17. Expressão do gene *pgc1 α* envolvido com o metabolismo em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

Foram avaliados os níveis de expressão dos genes envolvidos com o catabolismo (*fbxo25* e *murf1a*). Aos 3 dias, os níveis de expressão do gene *murf1a*, foi maior no grupo C comparado ao grupo R. Sete dias após o início do experimento, a expressão do atrogene *Murf1a* foi maior no grupo C comparado aos grupos CE e R (Figura 18A). A expressão do gene *fbxo25*, aos 3 dias, foi maior no grupo C comparado ao grupo R. Aos 7 dias, o nível de expressão desse gene foi maior no grupo CE comparado ao grupo RE. (Figura 18B).

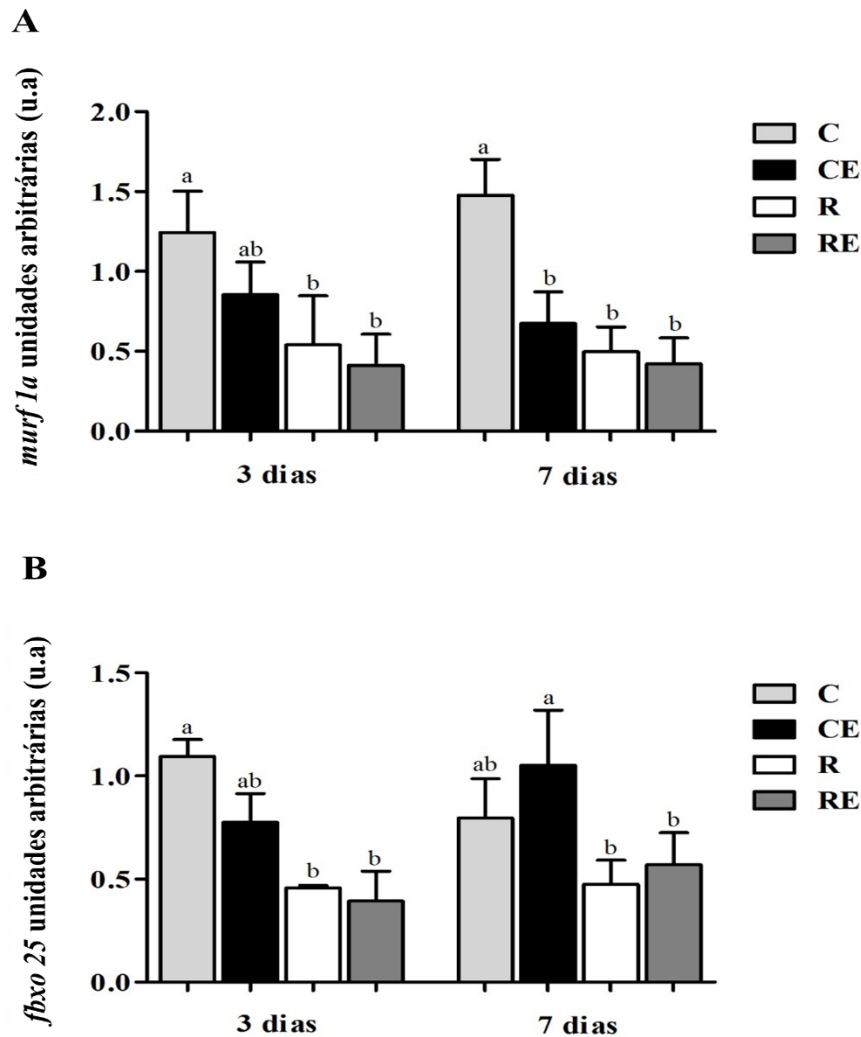


Figura 18. Expressão dos genes *murf1a* (A) e *fbxo25* (B) envolvidos com o catabolismo em pacus aos 3 e 7 dias do experimento. Grupos: Controle (C); Controle com Exercício (CE); Resveratrol (R); Resveratrol com Exercício (RE). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos. Significância: $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

Embora muitos estudos têm demonstrado o efeito benéfico do resveratrol como antioxidante em vários tecidos e órgãos em mamíferos, poucos relatam o impacto desse composto em peixes (Valenzano et al., 2006), com enfoque na análise muscular (Wilson et al., 2015). Os resultados do presente estudo sugerem que o resveratrol teve um efeito positivo no aumento na massa muscular em alevinos de pacu submetidos ao exercício natatório. Houve aumento no nível de expressão de genes miogênicos, anabólicos, e do metabolismo oxidativo e diminuição na expressão de genes catabólicos; o exercício diminuiu a atividade da enzima antioxidantes e o resveratrol manteve a atividade da enzima SOD diminuindo a atividade da enzima CAT. Esses resultados são importantes para a aquicultura, uma vez que, há um considerável interesse na área para a maximização do crescimento para o setor produtivo. Tendo em vista que o músculo esquelético forma a maior parte da massa corporal em peixes (~70%), (Bone, 1978; Johnston, 2011) estudos que avaliem estratégias que promovem o aumento da síntese e diminuição nas taxas de degradação de proteínas são indicadores importantes para avaliação do crescimento muscular nesses animais.

Estudos recentes têm demonstrado que entre os efeitos benéficos do resveratrol destaca-se a atividade antioxidante (Howitz et al., 2003), a inibição da degradação proteica muscular, com atenuação na atrofia (Wyke et al., 2004; Russel et al., 2006; Alamdari et al., 2012) e melhora na função muscular, em animais idosos com sarcopenia (Bennett et al., 2013; Joseph et al., 2013). Entretanto, o real efeito e o potencial mecanismo de ação do resveratrol sobre a função muscular não está bem estabelecido (Liao et al., 2017). Por outro lado, também tem sido demonstrado que os efeitos do resveratrol podem ser regulados por diferentes mecanismos, fato demonstrado por estudos realizados em diferentes modelos de atrofia muscular. Esse composto pode atenuar o processo inflamatório diminuindo a atividade do NFkB (Kubota et al., 2009) uma das principais cascatas que regulam a expressão dos atrogenes (Rom et al., 2016). Sun et al., 2017, demonstraram que o resveratrol preveniu o aumento na expressão do atrogene *murfl* em cultura de células C2C12 e nos músculos sóleo e EDL, em modelo de camundongos com indução de doença renal crônica. Segundo os autores, o efeito do resveratrol foi, em parte, mediado pela atenuação da degradação e não pelo aumento da síntese de proteínas. Shadfar et al., 2011, observaram que o resveratrol inibe a atrofia cardíaca acentuada na caquexia, possivelmente através da inibição da atividade do

NFkB e Murf1. No nosso experimento, os grupos R e RE apresentaram diminuição na expressão do atrogenes *murf* 1a e *fbxo25*, E3 ubiquitina-ligases que participam do sistema ubiquitina-proteassoma (Bonaldo e Sandri, 2013, Schiaffino et al, 2013), responsáveis pela degradação de proteínas pelo proteassoma 26S (Bower e Johnston, 2010; Bonaldo e Sandri, 2013). Essa diminuição da expressão dos atrogenes no músculo dos animais dos grupos que receberam resveratrol, submetidos ou não ao exercício, é um indicativo que esse composto foi benéfico para diminuir o catabolismo proteico muscular no pacu nas condições estudadas. Wilson et al., 2015, demonstraram que o uso de ração suplementada com resveratrol, sem promover nenhuma condição estressora, exerceu um efeito positivo sobre o crescimento no linguado *Paralichthys lethostigma*, reduzindo a degradação proteica. Tendo em vista que o catabolismo proteico muscular é um mecanismo importante para o turnover proteico normal do músculo (Sartorelli e Fulco, 2004), e o balanço entre o catabolismo e anabolismo coordena a manutenção do fenótipo da fibra, a diminuição da expressão dos genes catabólicos observada no nosso estudo é uma condição que poderia favorecer o crescimento muscular.

Os dados obtidos mostraram também que o exercício natatório utilizado não foi condição totalmente suficiente para promover estresse e aumentar o catabolismo proteico, a julgar pela diminuição do nível de expressão do gene *murf* 1 no grupo CE comparado ao grupo C. No entanto, a expressão do gene *fbxo25* no grupo CE maior do que no grupo RE e semelhante ao grupo C, provavelmente está relacionada com o turnover proteico normal do músculo.

O crescimento pós embrionário do músculo estriado esquelético em peixes ocorre por dois mecanismos: hipertrofia, onde ocorre o aumento de síntese proteica nas fibras e aumento do número de núcleos com a incorporação de novos núcleos provenientes das células satélites (ou células precursoras miogênicas) e hiperplasia, com a formação de novas fibras musculares a partir da fusão das células satélites (ou células precursoras miogênicas) na superfície de fibras musculares existentes e posterior separação pela matriz extracelular (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowleron e Veggetti, 2001). A distribuição das fibras musculares em diferentes classes de diâmetros ou área é uma técnica padronizada em várias espécies, sendo utilizada como uma medida para determinar o recrutamento (hiperplasia) e hipertrofia de fibras musculares (Rowleron e Veggetti, 2001). A presença de hiperplasia no músculo pode ser avaliada analisando-se o diâmetro das fibras musculares com diâmetro < do que 20/30µm. Nos pacus utilizados no nosso estudo (alevinos de 20g), a análise do

diâmetro das fibras musculares mostrou que hiperplasia e hipertrofia estão ocorrendo na fase de crescimento analisada. No entanto, tendo em vista a maior proporção de fibras com diâmetro $<$ do que $20\mu\text{m}$ e menor proporção de fibras com diâmetro $>$ $60\mu\text{m}$ no grupo C comparado ao grupo CE e RE pode indicar que nesse período, o exercício pode ter colaborado com a hipertrofia das fibras musculares. Aos 30 dias, o grupo RE apresentou diferença ao grupo C nas fibras com diâmetro de 20 - $40\mu\text{m}$ e nas fibras na classe $>$ $60\mu\text{m}$, sendo semelhantes aos grupos CE e ao grupo R em ambas as classes.

A hipertrofia muscular está diretamente relacionada com o aumento da síntese proteica/anabolismo (Bonaldo e Sandri, 2013; Johnston et al., 2011). No nosso estudo, a análise de genes envolvidos com a via anabólica (*igf-1*, *pi3k* e *mtor*) mostrou variação entre os grupos aos 3 e 7 dias, porém, essa variação foi maior entre os grupos que receberam resveratrol na ração (Grupos R e RE). Em relação ao gene *igf-1*, aos 3 e 7 dias a expressão foi maior no grupo RE comparado ao grupo R. O nível de expressão gene do *pi3k* foi maior nos grupos R e RE aos 3 dias e menor aos 7 dias, comparado aos demais grupos C e CE, respectivamente. A expressão gênica do *mtor* aos 7 dias foi maior nos grupos R e RE comparada aos grupos C e CE, respectivamente. O grupo C apresentou maior expressão desse gene que no grupo CE.

O *igf-1* (*insulin like growth factor 1*), que é parte integrante da via de sinalização envolvida com o crescimento, hipertrofia ou manutenção da massa muscular (Otto e Patel, 2010; Schiaffino et al, 2013). O aumento da massa muscular pode ocorrer pela incorporação de núcleos de células precursoras miogênicas após proliferação, às fibras musculares em crescimento ou em regeneração (Florini et al., 1993, 1996) e/ou pelo aumento nos níveis proteicos internamente à fibra muscular (Otto e Patel, 2010). O IGF-1, ao interagir com seu receptor, leva à estimulação da síntese proteica através da ativação da enzima PI3K (*phosphatidyl-inositol-3 kinase*), que promove um sítio de ligação à membrana para outra enzima cinase, a Akt (*Sandrine-threonine kinase*). A ativação da Akt leva à fosforilação de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) culminando com a ativação da síntese de proteínas que promovem a hipertrofia da fibra muscular (Lai et al., 2004). O aumento nos níveis de expressão do genes anabólicos *igf-1*, e em especial, a expressão aumentada do gene *mtor* nos grupos R e RE no nosso estudo, é um indicador que o resveratrol favoreceu ou melhorou o anabolismo e a síntese proteica (Hemmings e Restuccia, 2012). É provável que esse favorecimento do anabolismo ocorra pela diminuição do catabolismo; segundo Otto e Patel, 2010, a manutenção da massa muscular, mediada pelo *igf-1*, ocorre pela inibição das vias da

atrofia muscular, impedindo a degradação e a perda de massa muscular. Ressaltamos que, no presente experimento, observamos diminuição na expressão dos genes do catabolismo aos 7 dias do experimento no músculo nos grupos R e RE.

O *igf-1* também pode estimular a via de sinalização mediada pela MAPK (*mitogen activated protein kinase*) que promove a proliferação de mioblastos, durante a miogênese, ou de células precursoras miogênicas, durante o crescimento muscular (Halevy e Cantley, 2004). Isso pode explicar, em parte o aumento na expressão do mRNA da *myod* no músculo dos animais dos grupos R e RE aos 7 dias, comparado aos grupos C e CE, respectivamente. Como a *myod* está envolvida com a proliferação das células precursoras miogênicas ou células satélites, durante o crescimento muscular (Megeny e Rudnicki, 1995; Rudnicki e Jaenisch, 1995; Watabe, 1999), é provável que o resveratrol esteja favorecendo o processo de proliferação, bem como a diferenciação, mediada pela *miogenina* (Megeny e Rudnicki, 1995; Rudnicki e Jaenisch, 1995; Watabe, 1999), podendo contribuir para o aumento da síntese de proteínas e o anabolismo muscular.

Sabe-se que exercícios de resistência aumentam a capacidade oxidativa muscular pelo aumento da vascularização e aumento da atividade de enzimas mitocondriais (Saltin e Rowell, 1980). Em peixes, Palstra et al., 2014 observaram, em zebra fish treinados a velocidade de 0,1 e 0,4m/s durante 20 dias, resposta adaptativa muscular com aumento da massa muscular por hipertrofia e aumento da vascularização por angiogênese, nas fibras brancas. Santos et al., 2017, também relataram que o exercício natatório (fluxo direcionado de água formando uma corrente circular forçeo os peixes a nadarem contra o fluxo, à velocidade de 27,5 cm/s), influenciou a morfologia do corpo (houve aumento da massa muscular especialmente na região caudal), a celularidade muscular e promoveu hipertrofia das fibras brancas em peixes cultivados a 24°C.

No nosso estudo, utilizamos um protocolo de exercício adaptado de Johnston et al., 1980. Nesse protocolo, a velocidade do fluxo inicial da água foi de 12,7 cm/s sendo gradualmente aumentada (2,11 cm/s ao dia) ao longo de uma semana até atingir a velocidade de 27,5 cm/s, a qual foi mantida até o final do experimento (30 dias). Santos et al., 2017, utilizou protocolo semelhante, porém com algumas modificações: a velocidade do fluxo da água foi constante (27,5 cm/s), o tempo de exercício foi maior (6 meses). Nessas condições os autores observaram hipertrofia muscular, fato que não foi observado no nosso estudo, considerando o grupo CE comparado ao grupo C aos 30

dias, embora aos 7 dias, o grupo CE apresentou maior frequência de fibras com diâmetro $> 60\mu\text{m}$.

No presente experimento, o nível de expressão do gene *sdha*, aos 7 dias foi maior no grupo RE comparado aos grupos R e CE e no grupo R comparado ao grupo C, demonstrando uma possível adaptação metabólica oxidativa muscular nos animais dos grupos R e RE. O nível de expressão do gene *pgc1- α* foi maior nos animais do grupo CE comparado ao grupo C e RE nos dois períodos analisados. Aos 3 dias, o gene *pgc1- α* foi mais expresso no grupo R comparado ao grupo RE e aos 7 dias, C foi maior que R. O *pgc1- α* está envolvido com o aumento e regulação de vias metabólicas oxidativas nas fibras musculares (Lin et al., 2004; 2005; Olesen et al., 2013) como uma estratégia de suporte energético, via aumento do número de mitocôndrias e síntese de ATP, além de regular as defesas antioxidantes (Lin et al., 2002; Lenk et al., 2010; Fuentes et al., 2013). Assim, nossos resultados sugerem que o exercício natatório promoveu um aumento na atividade metabólica oxidativa no músculo do pacu, fato também sugerido por Holloszy, 1984. Nos grupos R e RE, a expressão do gene *sdha* foi maior comparado aos grupos C e CE. Esse fato demonstra que o resveratrol exerceu um efeito positivo aumentando o metabolismo oxidativo muscular, e a maior expressão do gene no grupo RE em relação ao grupo R demonstra que o resveratrol potencializou o efeito do exercício no aumento do metabolismo oxidativo, embora a expressão do *pgc1- α* foi menor nesses grupos.

Alguns estudos têm demonstrado que o resveratrol, que possui atividade antioxidante, aumenta o metabolismo oxidativo muscular (Lagouge et al., 2006; Um et al., 2010) bem como a atividade das enzimas antioxidantes (Carizzo et al., 2013; Muhammad e Allam, 2017). No nosso estudo, aos 7 dias, a atividade da enzima SOD foi baixa no grupo CE comparada aos demais grupos. Sugerimos que o tipo de exercício utilizado, a natação, foi benéfico e não foi suficiente para levar a produção de radicais livres em grandes quantidades, fato que já foi demonstrado por outros autores, que descreveram que atividade física moderada tem efeito benéfico prevenindo a produção de radicais livres (Baltaci et al., 2016). Na presença do resveratrol e do exercício, a atividade da enzima se manteve semelhante ao controle, mantendo assim, o nível basal de atividade da enzima. Duran et al., 2018 também observaram, em cultura de mioblastos de pacu tratados com menadiona agente oxidante que induz a produção de radicais livres, menor atividade das enzimas CAT e SOD, enquanto o tratamento com ácido ascórbico, que possui atividade antioxidante, promoveu um aumento na atividade

dessas enzimas tanto no grupo tratado com ácido ascórbico como no grupo tratado com menadiona + ácido ascórbico. A baixa atividade da enzima Catalase nos grupos CE e RE comparada aos demais grupos também pode indicar que o exercício não foi suficiente para levar a produção de radicais livres em grandes quantidades. No entanto, o resveratrol não atuou na manutenção da atividade da enzima CAT frente ao estímulo utilizado (exercício natatório).

8. CONCLUSÃO

Sugerimos que o resveratrol associado ao exercício favoreceu o crescimento muscular pelo aumento no nível de expressão de genes miogênicos, anabolizantes e metabólicos e a diminuição na expressão de genes catabólicos. Notavelmente, todas essas mudanças ocorreram junto com um aumento na massa muscular.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, D.H., Barros, M.M., Padovani, C.R., Pezzato, L.E., Dal Pai-Silva, M., Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **J. Fish. Biol.** 67, 1-12. 2005.

Alamdari, N., Aversa, Z., Castellero, E., Gurav, A., Petkova, V., Tizio, S., Hasselgren, P.O. Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle -related ubiquitin ligases atrogin-1 e *Murf1* in cultured myotubes through a SIRT1 -dependent mechanism, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 417, 528e533. 2012.

Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., **Micron** 39, 1306-1311. 2008.

Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., Quantitative expression of myogenic regulatory factors *Myod* e myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron** 41, 997-1004. 2010.

Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. Resveratrol and exercise. **Biomed Rep**; 5:525–530. 2016.

Bennett BT, Mohamed JS, Alway SE. Effects of resveratrol on the recovery of muscle mass following disuse in the plantaris muscle of aged rats. **Plos One** 8:e83518. 2013.

Blaauw, B., Reggiani, C. The role of satellite cells in muscle hypertrophy. **J Muscle Res Cell Motil.** 35:3–10. 2014.

Bonaldo, P., Sandri, M. Cellular e molecular mechanisms of muscle atrophy. **Dis. Model. Mech.** 6, 25–39. 2013.

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

Bower, N.B., Garcia de la serrana, D., Johnston, I.A., Characterisation e differential regulation of *Mafbx*/Atrogin-1 a e b transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Biochemical e Biophysical Research Communications** 396, 265–271. 2010.

Campion, D.R., The muscle satellite cells. **Int. Ver. Cytol.** 87, 225-251. 1984.

Carrizzo A, Puca A, Damato A, Marino M, Franco E, Pompeo F, Traficante A, Civitillo F, Santini L, Trimarco V, *et al*: Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension e dyslipidemia by modulating NO metabolism. **Hypertension** 62: 359-366, 2013.

Cleuele, B. M., e Evenhuis, J. P. Molecular characterization of atrogin-1/F-box protein-32 (FBXO32) e F-box protein-25 (*FBXO25*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Expression across tissues in response to feed deprivation. **Comparative Biochemistry e Physiology - B Biochemistry e Molecular Biology**, 157(3), 248–257, 2010.

Chen, Y.J., Liu, Y.J., Yang, H.J., Yuan, Y., Liu, F.J., Tian, L.X., Laing, G.Y., Yuan, R.M. Effect of dietary oxidized fish oil on growth performance, body composition, antioxidant defence mechanism e liver histology of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*. **Aquac. Nutr.** 18, 321–331. 2012.

Dal Pai, V., Dal Pai-Silva, M., Carvalho, E.D., Fujihara, C.Y., Gregório, E.A., Curi, P.R., Morphological, histochemical e morphometric study of the myotomal muscle tissue of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). **Anat. Histol. Embriol.** 29, 283-289. 2000.

Dal Pai-Silva, M., Freitas, E.M.S., Dal Pai, V., Rodrigues, A.C: Morphological and histochemical study of myotomal muscle in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during the initial growth phases. **Arch. Fish Mar. Res.** 50, 149-160. 2003.

Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L: Overview of vitamin D e C requirements in fish e their influence on the skeletal system. **Aquac.** 315, 49–60, 2011.

De Paula, T. G. *et al*. Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **PLoS One** 15:12(5):e01776791–20, 2017.

Dolinsky VW e Dyck JR: Calorie restriction e resveratrol in cardiovascular health e disease. **Biochim Biophys Acta** 1812: 1477-1489, 2011.

Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS, Haykowsky M, Czubryt MP, Gordon T e Dyck JR: Improvements in skeletal muscle strength e cardiac function induced by resveratrol contribute to enhanced exercise performance in rats. **J Physiol** 590: 2783-2799, 2012.

Duran B.O., Ferneez G.J., Mareco, E.A., Moraes, L.N., Salomão, R.A., Gutierrez de Paula, T., Santos, V.B., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., Differential microRNA Expression in Fast- e Slow-Twitch Skeletal Muscle of *Piaractus mesopotamicus* during Growth. **PLoS One**. Nov 3;10(11):e 0141967. 2015.

Dutt, V., Gupta, S., Dabur, R., E. Injeti, A. Mittal, Skeletal muscle atrophy: potential therapeutic agents etheir mechanisms of action, **Pharmacol. Res.** 99, 86e100. 2015.

Florini, J.R., Ewton, D.Z., Magri, K.A., Mangiacapra, F.J., IGFs e muscle differentiation. **Adv. Exp. Med. Biol.** 343, 319-326. 1993.

Florini, J.R., Ewton, D.Z., Coolican, S.A., Growth hormone e the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocr. Rev.** 17, 481-517. 1996.

Fuentes, E.N., Ruiz, P., Valdes, J.A., Molina, A., Catabolic signaling pathways, atrogenes, e ubiquitinated proteins are regulated by the nutritional status in the muscle of the fine flounder. **PLoS ONE** 7, e44256. 2012.

Fuentes, E. N., Safian, D., Eir, I., Antonio, J., Elorza, A. A., Molina, A., Bjrnsson, B. T. Nutritional status modulates plasma leptin, AMPK e TOR activation, e mitochondrial biogenesis: Implications for cell metabolism e growth in skeletal muscle of the fine flounder. **General e Comparative Endocrinology**, 186, 172–180, 2013.

Funkenstein, B., Balas, V., Skopal, T., Radaelli, G., Rowlerson, A.,. Long-term culture of muscle explants from *Sparus aurata*. **Tissue e Cell** 38, 399-415. 2006.

Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Mamauag, R.E.P., Han, Y: Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance e reduction of lipid peroxidation in tissues e blood of red sea bream *Pagrus major*. **Aquac.** 356, 73–79, 2012.

Gu Q, Wang B, Zhang XF, Ma YP, Liu JD e Wang XZ: Chronic aerobic exercise training attenuates aortic stiffening e endothelial dysfunction through preserving aortic mitochondrial function in aged rats. **Exp Gerontol** 56: 37-44, 2014.

Hamre, K., Christiansen, R., Waagb, R., Maage, A., Torstensen, B.E., Lygren, B., Lie Wathne, E., Albrektsen, S: Antioxidant vitamins, minerals e lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects on growth performance e fillet quality. **Aquac. Nutr.** 10, 113–123, 2004.

Halevy, O., Cantley, L.C., Differential regulation of the phosphoinositide 3-kinase e MAP kinase pathways by hepatocyte growth factor vs. insulin-like growth factor-I in myogenic cells. **Exp. Cell Res.** 297, 224–234. 2004.

Hemmings, B.A., Restuccia, D.F. PI3K-PKB/Akt pathway. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 4, a011189. 2012.

Holloszy JO e Coyle EF: Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise e their metabolic consequences. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol** 56: 831-838, 1984.

Hori, Y.S., Kuno, A., Hosoda, R., M. Tanno, T. Miura, K. Shimamoto, Y. Horio, Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy, **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 338, 784e794. 2011.

Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature.** 425, 191–196. 2003.

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

Johnston, I.A., Moon, T.W: Endurance exercise training in the fast e slow muscles of a teleost fish (*Pollarchius virens*). **J. Comp. Physiol.** 135, 147–156, 1980.

Johnston, I.A., Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flat fish *Pleuronectes platessa*. **Cell Tissue Res.** 214, 369-379. 1981.

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

Johnston, I. A., Bower, N.I., Macqueen, D.J., Growth e the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **J Exp Biol.** 214:1617–1628. 2011.

Joseph, AM., Malamo, AG., Silvestre, J., Wawrzyniak, N., Carey-Love, S., Nguyen, LM., Dutta, D., Xu, J. Leeuwenburgh C e Adhihetty PJ: Short-term caloric restriction, resveratrol, or combined treatment regimens initiated in late-life alter mitochondrial protein expression profiles in a fiber-type specific manner in aged animals. **Exp Gerontol** 48: 858-868, 2013.

Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Myogenic cells in development e growth of fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 110, 3-20. 1995.

Kubota, S., Kurihara, T., Mochimaru, H., Satofuka, S., Noda, K., Ozawa, Y., Oike, Y., Ishida, S., Tsubota, K. Prevention of ocular inflammation in endotoxininduced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage e nuclear factor-kappaB activation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 50, 3512–3519. 2009.

Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. Resveratrol improves mitochondrial function e protects against metabolic disease by activating SIRT1 e PGC-1alpha. **Cell** 127, 1109–1122. 2006.

Lai, K.M., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, N.A., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. **Mol. Cell Biol.** 24, 9295-9304. 2004.

- Lenk, K., Schuler, G., Adams, V. Skeletal muscle wasting in cachexia e sarcopenia: molecular pathophysiology e impact of exercise training. **J. Cachex. Sarcopenia Muscle** 1, 9–21. 2010.
- Liao, Z. Y., Chen, J.L., Xiao, M.H., Sun, Y., Zhao, Y.X., Pu, D., Lv, A.K., Wang, M.L., Zhou, J., Zhu, S.Y., Zhao, K.X., Xiao, Q. The effect of exercise, resveratrol or their combination on Sarcopenia in aged rats via regulation of AMPK/Sirt1 pathway. **Experimental Gerontology**. 98. 177–183. 2017.
- Lin, S.J., Kaeberlein, M., Ealis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R., e Guarente, L. (b). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. **Nature** 418, 344–348. 2002.
- Lin, J., Heschin, C., e Spiegelman, B.M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab.** 1, 361–370. 2005.
- Lin, J., Wu, P.H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St Pierre, J., Zhang, C.Y., Mootha, V.K., Jager, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. **Cell**. 119, 121–135. 2004.
- Mareco, E. A., Garcia de la Serrana, D., Johnston, I. A., e Dal-Pai-Silva, M. Characterization of the transcriptome of fast e slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **BMC Genomics**, 16, 182. 2015.
- Mauro, A., Satellite cell of skeletal muscle fibers. **J. Bioph. Biochem. Cytol.** 9, 493-494. 1961.
- McAnulty LS, Miller LE, Hosick PA, Utter AC, Quindry JC e McAnulty SR: Effect of resveratrol e quercetin supplementation on redox status e inflammation after exercise. **Appl Physiol Nutr Metab** 38: 760-765, 2013.
- Megeney, L.A., Rudnicki, M.A., Determination versus differentiation e the *MyoD* family of transcription factors. **Biochem. Cell Biol.** 73, 723-732. 1995.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64, 1553-1562. 2000.
- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2011**. 60p. 2013.
- Muhammad, M. H., Allam, M. M. Resveratrol e/or exercise training counteract aging-associated decline of physical endurance in aged mice; targeting mitochondrial biogenesis e function. **The Journal of Physiological Sciences**. 2017.
- Nieman DC, Laupheimer MW, Ranchordas MK, Burke LM, Stear SJ, Castell LM. A-Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance. **Br J Sport Med**; 46:618–620. 2012.
- Olesen, J., Ringholm, S., Nielsen, M.M., Bret, C.T., Pedersen, J.T., Halling, J.F., Goodyear, L.J., Pilegaard, H. Role of PGC-1 α in exercise training- e resveratrolinduced prevention of age-associated inflammation. **Exp. Gerontol.** 48, 1274–1284. 2013.

Otto, A., Patel, K., Signalling e the control of skeletal muscle size. **Exp. Cell Res.** 316, 3059-3066. 2010.

Paula TGd, Zanella BTT, Fantinatti BEdA, Moraes LNd, Duran BOdS, Oliveira CBd, Salomão, R. A. S., Silva, R. N., Padovani, C.R., Santos, V. B., Mareco, E. A., Carvalho, R. F., Dal-Pai, M. S. Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **PLoS ONE** 12(5): e0177679. 2017.

Palstra, A.P., Rovira, M., Rizo-Roca, D., Torrella, J.R., Spaink, H.P., Planas, J.V. Swimming-induced exercise promotes hypertrophy e vascularization of fast skeletal muscle fibres e activation of myogenic e angiogenic transcriptional programs in adult zebrafish. **BMC Genom.** 15, 1136. 2014.

Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Spiegelman, B. M. . Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. **Nature**, 423(6939), 550–555. 2003.

Reinecke, M., Collet, C., The phylogeny of the insulin-like growth factors. **Int. Rev. Cytol.** 183, 1–94. 1998.

Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., Loffin-Cueni, D., Insulin like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene sequence, tissue expression, e cellular localization. **Endocrinology** 138, 3613–3619. 1997.

Rescan, P.Y., Jutel, I., Rallièrre, C., Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.** 204, 3523-3529. 2001.

Rome, L.C., Funke, R.P., Alexeer, R.M., Lutz, G., Aldridge, H., Scott, F., Freadman, M., Why animals have different muscle fibre types. **Nature** 335, 824-827. 1988.

Rom, O., Reznick, A.Z. The role of E3 ubiquitin-ligases *Murf-1* e *Mafbx* in loss of skeletal muscle mass, **Free. Radic. Biol. Med.** 98, 218-230. 2016.

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

Rudnicki, M.A., Jaenish, R., The *Myod* family of transcription factors e skeletal muscle myogenesis. **Bioessays** 17, 203-209. 1995.

Russell, S.T., Wyke, S.M., Tisdale, M.J. Mechanism of induction of muscle protein degradation by angiotensin II. **Cell. Signal.** 18, 1087–1096. 2006.

Saltin, B., Rowell, L.B. Functional adaptations to physical activity e inactivity. **Fed. Proc.** 39, 1506–1513. 1980.

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

Santos, V.B., Oliveira, M. W. M., Salomão, R. A. S., Santos, R. S., Gutierrez de Paula, T., Dal Pai, M. S., Mareco, E. A. Influence of temperature e exercise on growth performance, muscle, e adipose tissue in pacus (*Piaractus mesopotamicus*). **Journal of Thermal Biology**. 69. 221–227. 2017.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., e Sabatini, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, 17(6), 596–603. 2005.

Sakuma, K., e Yamaguchi, A: Sarcopenia e cachexia: The adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. **Journal of Cachexia, Sarcopenia e Muscle**, 3(2), 77–94, 2012.

Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., e Sandri, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth e atrophy. **FEBS Journal**, 280(17), 4294–4314. 2013.

Schultz, E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. **Dev Biol** 175:84–94. 1996.

Schweer, J.C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E.R., Synthesis e secretion of insulin-like growth factor e its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. **Endocrinology** 113, 297-305. 1983.

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

Shadfar, S., Couch, M.E., McKinney, K.A., L.J. Weinstein, X. Yin, J.E. Rodríguez, D.C. Guttridge, M. Willis, Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle e cardiac atrophy in vivo, **Nutr. Cancer**. 63. 749e762. 2011.

Spanier G, Xu H, Xia, N, Tobias S, Deng S, Wojnowski L, Forstermann U e Li H: Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxidodismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) e NADPH oxidase subunit (Nox4). **J Physiol Pharmacol** 60: 111-116, 2009.

Sun, L.J., Sun, Y.N., Chen, S.J., Liu, S. Jiang, G.R. Resveratrol attenuates skeletal muscle atrophy induced by chronic kidney disease via *Murfl* signaling pathway Biochemical e Biophysical. **Research Communications**. 487, 83e89. 2017.

Sung MM, Kim TT, Denou E, Soltys CM, Hamza SM, Byrne NJ, Masson G, Park H, Wishart DS, Madsen KL, Schertzer JD, Dyck JR. Improved glucose homeostasis in obese mice treated with resveratrol is associated with alterations in the gut microbiome. **Diabetes** 66: 418–425, 2017.

- Tacchi, L., Bickerdike, R., Secombes, C. J., Pooley, N. J., Urquhart, K. L., Collet, B., e Martin, S. a M. Ubiquitin E3 ligase atrogin-1 (Fbox-32) in Atlantic salmon (*Salmo salar*): sequence analysis, genomic structure e modulation of expression. **Comparative Biochemistry e Physiology. Part B**, Biochemistry e Molecular Biology, 157(4), 364–73. 2010.
- Tacchi, L., Bickerdike, R., Secombes, C. J., e Martin, S. a M. Muscle-specific RING finger (*Murf*) cDNAs in Atlantic salmon (*Salmo salar*) e their role as regulators of muscle protein degradation. **Marine Biotechnology** (New York, N.Y.), 14(1), 35–45. 2012.
- Tian, X., Liu, Y., Ren, G., L. Yin, X. Liang, T. Geng, H. Dang, R. An, Resveratrol limits diabetes-associated cognitive decline in rats by preventing oxidative stress e inflammation e modulating hippocampal structural synaptic plasticity. **Brain. Res.** 1. 1-9. 2016.
- Um, J.H., Park, S.J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M.W., Kim, M.K., Viollet, B., Chung, J.H. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. **Diabetes.** 59, 554–563. 2010.
- Urbinati, C.U., Gonçalves, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B. & Gomes, L.C. (Eds.), **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 225-255. 2005.
- Urso, M.L. Clarkson, P.M. Oxidative stress, exercise, e antioxidant supplementation. **Toxicology** 189, 41-/54. 2003.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., Cellierino, A. Resveratrol prolongs lifespan e retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. **Curr. Biol.** 16, 296–300. 2006.
- Van Raamsdonk, W., Pool, C.W., Kronnie, G., Differentiation of muscle fiber types in the teleost *Brachydanio rerio*. **Anat. Embryol.** 153, 137-155. 1978.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab Dispos**; 32:1377–1382. 2004.
- Wang, X.H., Mitch, W.E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease, **Nat. Rev. Nephrol.** 10. 504-516. 2014.
- Wang, YX., Rudnicki, MA. Satellite cells, the engines of muscle repair. **Nat Rev Mol Cell Biol** 13:127–133. 2011.
- Watabe, S., Myogenic regulatory factors e muscle differentiation during ontogeny in fish. **J. Fish Biol.** 55, 1-18. 1999.
- Wende, A. R., Huss, J. M., Schaeffer, P. J., Gigue, V., e Kelly, D. P. PGC-1 α Coactivates PDK4 Gene Expression via the Orphan Nuclear Receptor ERR α : a

Mechanism for Transcriptional Control of Muscle Glucose Metabolism. **Molecular e Cellular Biology**, 25(24), 10684–10694. 2005.

Wilson, W. N., Baumgarner, B. L., Watanabe, W. O., Alam, M. S., Kinsey, S. T. Effects of resveratrol on growth e skeletal muscle physiology of juvenile southern flounder. **Comparative Biochemistry e Physiology, Part A**, 183: 27–35. 2015.

White, RB., Bierinx, AS., Gnocchi, VF., Zammit, PS. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. **BMC Dev Biol** 10:21. 2010.

Wullschleger, S., Loewith, R., e Hall, M. N. TOR signaling in growth e metabolism. **Cell**, 124(3), 471–484. 2006.

Wyke, S.M., Russell, S.T., Tisdale, M.J. Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappa B activation, **Br. J. Cancer**. 91. 1742e1750. 2004.

Yang, Q., Wang, H.C., Liu, Y., Gao, C., Sun, L., Tao, L. Resveratrol cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury involves upregulation of adiponectin levels e multimerization in type 2 diabetic mice, **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 68 304e312. 2016.

Yu, C., Shin, YG., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, JW., Lee, YS., Hirschelman, WH., Pezzuto, JM., Mehta, RG., Van Breemen, RB. Human, rat, e mouse metabolism of resveratrol. **Pharm Res** 19: 1907-1914, 2002.