

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CULTURA CELULAR DE MIOBLASTOS DE PEIXES
COMO UM MODELO PARA ENTENDER A REGULAÇÃO DO
DESENVOLVIMENTO E CRESCIMENTO MUSCULAR.

BRUNO OLIVEIRA DA SILVA DURAN

Orientadora MAELI DAL PAI

Coorientador DANIEL GARCIA DE LA SERRANA CASTILLO

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

Maeli Dal Pai

**BOTUCATU – SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Duran, Bruno Oliveira da Silva.

Cultura celular de mioblastos de peixes como um modelo para entender a regulação do desenvolvimento e crescimento muscular / Bruno Oliveira da Silva Duran. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Daniel Garcia de la Serrana Castillo

Capes: 20000006

1. Peixe. 2. Músculo esquelético. 3. Desenvolvimento muscular.

Palavras-chave: Crescimento muscular; Cultura celular; Miogênese; Músculo esquelético; Peixe.

Quando ouvi o sábio astrônomo

Quando ouvi o sábio astrônomo,
Quando as provas, as figuras, foram postas em colunas diante de mim,
Quando ele me mostrou os gráficos e diagramas, para somar, dividir e mensurar,
Quando eu, sentado, ouvi o astrônomo a discursar sob aplausos no anfiteatro,
Logo e inexplicavelmente eu me senti doente e cansado
Até me levantar e sair devagar para caminhar sozinho no ar úmido e místico da noite
E de tempos em tempos olhar em perfeito silêncio para as estrelas.

Walt Whitman

Invictus

Sob o manto da noite que me cobre,
Negro como as profundezas de um pólo a outro,
Eu agradeço a todos os deuses
Por minha alma invencível.
Nas garras ferozes das circunstâncias
Eu não me encolhi, nem chorei alto.
Sob os golpes do destino
Minha cabeça sangra, mas não se curva.
Além deste lugar de ódio e lágrimas
Só assoma o horror da sombra.
Mesmo assim, a ameaça dos anos me encontra
E sempre me encontrará sem medo.
Não importa que o portão seja estreito,
E que a lista seja grande em punições,
Eu sou o mestre do meu destino.
Eu sou o capitão da minha alma.

William Ernest Henley

Dedico este trabalho às pessoas que mais me ajudaram nessa jornada e que estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, sempre que precisei.

minha mãe, Sueli de Fatima Oliveira
meu pai, Antonio Francisco da Silva Duran
e meu irmão, Lucas Oliveira da Silva Duran

Muito obrigado por tudo.
Amo vocês mais do que tudo nesse mundo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente à Maeli Dal Pai, minha orientadora e segunda mãe, pessoa a qual admiro imensamente e tenho como exemplo de competência e profissionalismo. Obrigado por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e confiança durante os últimos dez anos, sem os quais eu não chegaria até aqui. Minha vida profissional e pessoal foi inteiramente moldada pela senhora, e sou muito grato por ter feito parte da história de seu laboratório. Divido o mérito desse trabalho com a senhora.

Agradeço imensamente ao Daniel Garcia de la Serrana Castillo, meu coorientador, com quem aprendi muito sobre músculo esquelético de peixes, pesquisa científica e ambiente de trabalho. Obrigado por permitir minha experiência internacional em um laboratório de ponta e por ter acreditado em mim, me fazendo dar o melhor para a conclusão dessa tese e me incentivando a buscar cada vez mais conhecimento.

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais, Antonio Francisco da Silva Duran e Sueli de Fatima Oliveira, e ao meu irmão, Lucas Oliveira da Silva Duran. Vocês são a base da minha vida, meu local de reconforto, meu ponto de partida e de chegada. Obrigado por todo o amor, carinho, apoio, paciência e força que me deram. Sei que vocês batalharam muito e se esforçaram ao máximo pensando no meu bem. Hoje sou um ser humano íntegro e digno graças a vocês. Toda a minha dedicação e persistência no trabalho e na vida é para um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram por mim. Eu amo vocês mais que tudo.

Agradeço meus avós, Jacy Rosa de Lima Oliveira e Oswaldo Ribeiro da Silva, meus tios, Suzana Dolores Duran Lemos e Lair de Lemos, e meus primos, Adriana Lemos e Marcelo Lemos. Obrigado pelo amparo e por todo o carinho que vocês sempre dedicaram a mim.

Agradeço muito à minha namorada, Cecilia Luvizutti Ferreira da Silva, que foi a pessoa mais especial que surgiu em minha vida nos últimos anos me presenteando com seu amor, amizade, carinho e companheirismo. Sou uma pessoa melhor agora que tenho você comigo, e dedico minha vida a fazer você feliz. Amo muito você e quero viver para sempre ao seu lado. Agradeço também a Orlando Ferreira da Silva e Irene Luvizutti Ferreira da Silva, pessoas

maravilhosas que tive a sorte de conhecer e agora ter em minha família. Obrigado pela confiança e pelo acolhimento. Podem sempre contar comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos membros da banca de qualificação e de defesa, Adalberto Luis Val, Rafael Henrique Nóbrega, Edson Assunção Mareco, Diogo Teruo Hashimoto, Leonardo Susumu Takahashi, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho e Robson Francisco Carvalho, pela disponibilidade e pelos valorosos conselhos e sugestões para a melhoria dessa tese e elaboração dos artigos.

Agradeço a todos os docentes e funcionários do Departamento de Morfologia, especialmente os professores Dr. Robson Francisco Carvalho, Dr. Sérgio Luis Felisbino, Dr. Luis Antonio Justulin Jr., Dr. Rafael Henrique Nóbrega, Dra. Flávia Karina Delella e Dr. Wellerson Rodrigo Scarano. Obrigado por todo o aprendizado e por terem feito desse espaço minha segunda casa.

Agradeço a todos os amigos, novos e antigos, do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado, Bruno Fantinatti, Carlos Alves, Diogo Moraes, Douglas Marques, Edson Mareco, Erika Perez, Fernanda Alves, Flavia Fernandes, Francielle Mosele, Grasieli de Oliveira, Guilherme Alcarás, Isabele Magiore, Ivan Vechetti, Jason Fernandez, Jakeline Oliveira, Jéssica Silvino, Juarez Ferreira, Juliana Giusti, Leonardo de Moraes, Letícia Oliveira, Maria Laura Kuniyoshi, Paula Freire, Paula Souza, Rafaela Nunes, Raquel Bertaglia, Rodrigo Souza, Rondinelle Salomão, Sarah Cury, Tassiana Gutierrez, Vander Santos e Warlen Piedade. Agradeço especialmente à Fernanda Carani e Fernanda Losi, que tiveram a paciência de me ensinar desde o início praticamente tudo que sei hoje, e à Bruna Zanella, que nos últimos anos me ajudou incansavelmente nas pesquisas, experimentos, relatórios e artigos, sempre com um sorriso no rosto (e uma considerável porção de patadas).

Agradeço aos meus amigos do Departamento de Morfologia, Ana Carolina Camargo, André Teves, Alana Rezende, Ariana Musa, Brenda Minatel, Bruno Martinucci, Caroline Barquilha, Caio Cesar, Cristiane Pinho, Elian Ribeiro, Flávia Bessi, Helga Nunes, Isabela Barbosa, Jordana Oliveira, Ketlin Colombelli, Luiz Frediane, Maira Cuciolo, Matheus Fioretto,

Nilton Santos, Teng Fwu Shing e Vivian Cypriano. Agradeço especialmente ao Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos, praticamente meu irmão e pessoa a qual sou muito grato pela convivência e companheirismo. Sou muito feliz em ter você como meu amigo.

Agradeço aos meus amigos da escola, Amilson Pedroso, Eduardo Sisti, Giovana Secato, Laura Marchi e Maria Fernanda Rodilhano, e aos meus amigos da universidade, Ana Elisa Sales, Bruno Spinetti, Duílio Zerbinato, Helder Rosa, Marco Aurélio Pessotto, Maria Lúcia Iwai, Mariella Lima, Patricia Dalprat e Raisa Mello. Obrigado por estarem sempre do meu lado, me apoiando nos momentos fáceis e difíceis.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas e auxílios financeiros concedidos: processos nº 2015/03234-8, 2016/01086-4, 2016/19683-9 e 2016/05009-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos auxílios financeiros concedidos: 447233/2014 e 302656/2015-4.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Peixes	11
1.2. Músculo esquelético	14
1.3. Miogênese	21
1.4. Crescimento muscular pós-natal	25
1.5. Duplicação do genoma	33
1.6. microRNAs	36
1.7. Cultura celular primária de mioblastos	40
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	43
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo geral	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. Criação dos peixes e coleta das amostras	45
4.2. Isolamento e cultura celular primária de mioblastos	46
4.3. Tratamentos realizados nas culturas celulares de mioblastos	47
4.4. Imunofluorescência	48
4.5. Ensaio de proliferação dos mioblastos	48
4.6. Ensaio de migração dos mioblastos	49
4.7. Jejum e realimentação	50
4.8. Identificação de parálogos linhagem-específicos (LSPs) e miRNAs	50
4.9. Extração, quantificação e análise da integridade de RNA	52
4.10. Tratamento com DNase e transcrição reversa	53
4.11. PCR em tempo real	53
5. REFERÊNCIAS GERAIS	54
6. CAPÍTULO I	60
<i>Ascorbic acid stimulates the in vitro myoblast proliferation and migration of pacu (Piaractus mesopotamicus)</i>	
7. CAPÍTULO II	88
<i>Rainbow trout slow myoblast cell culture as a model to study slow skeletal muscle and the characterization of mir-133 and mir-499 families as a case of study</i>	
8. CAPÍTULO III	120
<i>Lineage-specific paralogues regulating skeletal muscle growth in Ostariophysi superorder</i>	
9. CONCLUSÕES	146
10. APÊNDICE	147

RESUMO

1 Os peixes são um grupo de organismos de extrema importância ecológica, ambiental e
2 principalmente econômica, devido à produção de carne destinada à alimentação dos seres
3 humanos. A carne é composta basicamente por músculo esquelético, um tecido biológico
4 altamente especializado que constitui cerca de 60% da massa corporal dos peixes, e está
5 intimamente relacionado à fisiologia desses animais. A miogênese e o crescimento do músculo
6 esquelético são dependentes da proliferação e migração de células denominadas mioblastos, que
7 podem levar ao aumento do número de fibras musculares (hiperplasia) e/ou aumento do tamanho
8 das fibras musculares (hipertrofia). Esse crescimento é regulado por diversos sinais extrínsecos,
9 como temperatura e oxigenação, e intrínsecos, como fatores transcricionais, microRNAs,
10 hormônios e nutrientes. Além da proliferação e diferenciação dos mioblastos, o tamanho das
11 fibras musculares também é influenciado por esses fatores através de um delicado balanço entre
12 as vias de sinalização de síntese e degradação proteica. Em peixes, essas redes moleculares que
13 controlam a homeostase e o crescimento do músculo esquelético tiveram uma expansão em seu
14 número de componentes devido a um evento de duplicação total do genoma, que culminou com
15 o aumento da complexidade desses organismos e, possivelmente, para uma maior diversidade
16 biológica. Uma das maneiras de estudar essas vias sinalizatórias e entender a complexidade da
17 regulação do crescimento muscular é através das culturas celulares primárias de mioblastos de
18 peixes. Durante o desenvolvimento das culturas celulares de mioblastos ocorre a retomada das
19 principais etapas da miogênese, como a proliferação e migração dos mioblastos, a diferenciação
20 e fusão em miotubos, e a maturação das fibras musculares. O ambiente *in vitro* das culturas
21 celulares de mioblastos apresenta menor número de variáveis quando comparadas ao músculo
22 esquelético num nível sistêmico, permitindo as análises sob condições controladas. Dessa forma,
23 o objetivo de nosso trabalho foi utilizar culturas celulares primárias de mioblastos de peixes
24 como ferramentas para investigar diferentes aspectos do crescimento do músculo esquelético.
25 Estudos como o nosso, que fornecem novas informações quanto aos mecanismos moleculares e
26 celulares que regulam o tecido muscular nos peixes, podem contribuir para a obtenção de
27 melhorias na piscicultura intensiva, relacionadas ao aumento de massa muscular e qualidade de
28 carne.

29

30

31

32 **ABSTRACT**

33 Fish are a group of organisms of extreme ecological, environmental and mainly economic
34 importance, due to the meat production intended for humans. Meat is primarily composed of
35 skeletal muscle, a highly specialized biological tissue that constitutes about 60% of fish body
36 mass, and it is closely related to the physiology of these animals. Myogenesis and skeletal
37 muscle growth are dependent on the proliferation and migration of cells called myoblasts, which
38 can promote an increase in muscle fibre number (hyperplasia) and/or increase in muscle fibre
39 size (hypertrophy). This growth is regulated by several extrinsic signals, such as temperature and
40 oxygenation, and intrinsic signals, such as transcriptional factors, microRNAs, hormones and
41 nutrients. In addition to myoblasts proliferation and differentiation, the muscle fibre sizes are
42 also influenced by these factors through a delicate balance between protein synthesis and
43 degradation signaling pathways. In fish, these molecular networks that control homeostasis and
44 skeletal muscle growth had an expansion in their number of components due to an event of
45 whole genome duplication, culminating with increased complexity and, possibly, a higher
46 biological diversity of these animals. One way to study these signaling pathways and understand
47 the complexity of muscle growth regulation is through primary cell cultures of fish myoblasts.
48 During the myoblast cell culture development, the main stages of myogenesis are recapitulated,
49 such as myoblast proliferation and migration, differentiation and fusion into myotubes, and
50 maturation of muscle fibres. The *in vitro* environment of the myoblast cell cultures has fewer
51 number of variables when compared to the skeletal muscle at a systemic level, allowing the
52 analyses under controlled conditions. Thus, the aim of our work was the use of fish myoblast
53 primary cell cultures as tools to investigate different aspects of skeletal muscle growth. Studies
54 such as ours, which provide new information on the molecular and cellular mechanisms that
55 regulate fish muscle tissue, may contribute to improvements in intensive fish farming, related to
56 increased muscle mass and meat quality.

57
58
59
60
61
62
63
64

65 **1. INTRODUÇÃO**

66

67 **1.1. Peixes**

68 Por conveniência, o termo “peixes” é utilizado para descrever os vertebrados estudados
69 na Ictiologia, animais que de modo geral apresentam brânquias, membros em forma de
70 nadadeiras e tegumento coberto por escamas de origem dérmica. No entanto, os peixes não
71 constituem uma unidade taxonômica já que não compõem um grupo monofilético, ou seja, não
72 possuem um ancestral comum exclusivo. Para isso, seria necessário incluir o ancestral comum
73 mais recente e todos os seus descendentes, que nesse caso abrange também os tetrápodes
74 (Nelson, 2006). Alguns autores restringem o termo “peixes” somente aos peixes ósseos com
75 mandíbula, enquanto muitos outros também incluem tubarões e raias. Alguns poucos estudiosos
76 também incluem vertebrados sem mandíbula, como as lampréias e os peixes-bruxa. De qualquer
77 forma, os peixes são animais de enorme importância, especialmente ecológica e ambiental,
78 atuando como elementos chave em diversas cadeias alimentares e até mesmo como indicadores
79 de poluição em ambientes aquáticos. É o grupo mais diverso dentre os vertebrados,
80 representando pouco mais que a metade do número total de espécies existentes; 27977 espécies
81 de peixes e 26734 espécies de tetrápodes válidas em 2006 (Nelson, 2006). Além disso, os peixes
82 exibem enorme variabilidade em morfologia, hábitos alimentares, comportamento e habitat, de
83 modo que essa riqueza de informações e diversidade, muitas vezes não exploradas, tem atraído
84 cada vez mais o interesse de pesquisadores e direcionado o foco das pesquisas a esses animais.

85 Outro aspecto relevante é a extrema importância econômica que os peixes possuem,
86 devido principalmente à produção de carne destinada à alimentação dos seres humanos. Segundo
87 o relatório “O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2016”, elaborado pela Food and
88 Agriculture Organization of the United Nations (FAO), estima-se que a produção aquícola global
89 deve alcançar cerca de 200 milhões de toneladas em 2025, um aumento de quase 20% em
90 comparação ao período compreendido entre os anos de 2013 a 2015 (FAO, 2016). Nesse
91 contexto, os países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, contribuirão significativamente para
92 esse expressivo crescimento. O Brasil possui inúmeras vantagens para o desenvolvimento da
93 aquicultura e pesca extrativista marinha, como grande extensão litorânea, 5,5 milhões de hectares
94 de reservatórios de água doce, condições ambientais e climatológicas altamente favoráveis, mão
95 de obra relativamente barata, investimentos no setor e crescente mercado interno (Pinheiro,
96 2014). Além de uma considerável contribuição para o PIB nacional (aproximadamente R\$ 5
97 bilhões), a atividade aquícola brasileira alavancou rapidamente nas últimas décadas, com uma

98 transição de quase zero nos anos 80 para mais de meio milhão de toneladas de peixes em 2014
99 (Saint-Paul, 2017), de modo que o consumo brasileiro de peixe per capita aumentou cerca de
100 30% no período compreendido entre os anos de 2000 e 2009, bem mais que o registrado para a
101 carne bovina (10%) (Pinheiro, 2014). Por essas razões, a produção de pesca e aquicultura
102 brasileira deve crescer mais de 100% até 2025 (104%), sendo esse aumento o maior estimado na
103 região da América Latina e Caribe, seguido por México (54,2%) e Argentina (53,9%) (FAO,
104 2016).

105 O boletim estatístico elaborado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura mostra a produção
106 de pescado da aquicultura em 2011, revelando as espécies mais utilizadas na piscicultura
107 brasileira. A maior produção continua sendo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (47%)
108 (MPA, 2013), um dos peixes de água doce mais cultivados do mundo. Apesar de ser uma espécie
109 originária da bacia do rio Nilo, na África, a tilápia do Nilo foi introduzida em diversas regiões
110 subtropicais e temperadas do planeta, devido a sua adaptabilidade a uma ampla gama de
111 ambientes e sistemas de cultivo (El-Sayed, 2006). Outras espécies não-nativas com contribuições
112 menores para a produção nacional são a carpa (*Cyprinus carpio*) (7%) e a truta arco-íris
113 (*Oncorhynchus mykiss*) (0,6%) (MPA, 2013). Apesar do baixo impacto da truta arco-íris no
114 cenário brasileiro, os salmonídeos constituem um dos principais grupos de peixes na aquicultura.
115 Ao longo dos anos, as criações de trutas e do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) se espalharam
116 por todos os continentes (Berthelot et al., 2014), e atualmente tem marcante produção na Europa
117 e em países como Estados Unidos e Chile (FAO, 2016).

118 O Brasil possui cerca de 3 mil espécies de peixes nativos, muitas com potencial para uma
119 produção mais significativa na piscicultura, como o dourado (*Salminus brasiliensis*), jaú
120 (*Zungaro zungaro*), piauí (*Leporinus* spp.), matrinxã (*Brycon amazonicus*), pintado
121 (*Pseudoplatystoma* spp.), pirarucu (*Arapaima gigas*) e jundiá (*Rhamdia quelen*) (MPA, 2013;
122 Pinheiro, 2014; IBGE, 2016). Se compararmos a países asiáticos, em que 95% da produção
123 baseia-se em peixes nativos daquele continente, a participação das espécies nativas na
124 aquicultura brasileira ainda é baixa. Isso devido à relativa falta de conhecimento sobre a
125 biologia, reprodução, nutrição e domesticação desses animais, enquanto existem muito mais
126 informações básicas para a criação de espécies introduzidas (Saint-Paul, 2017). No entanto, esse
127 panorama está mudando, e o foco da aquicultura nacional, que antes se concentrava
128 exclusivamente em espécies exóticas, vem sendo direcionado para os peixes nativos. Os
129 principais responsáveis por isso são membros da família Characidae popularmente conhecidos
130 como pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), tambacu (híbrido

131 entre pacu e tambaqui) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), que correspondem à maioria dos
132 peixes nativos cultivados e representam quase 40% da produção nacional (MPA, 2013; IBGE,
133 2016). O pacu é encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, mas sua distribuição
134 está mais concentrada nas planícies alagadas da região Centro-Oeste do Brasil, sendo um dos
135 peixes mais estudados no Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiros (Urbinati e Gonçalves, 2005).
136 É uma espécie que apresenta diversas características economicamente interessantes, como
137 rusticidade, alta fertilidade, rápido crescimento, adaptação à alimentação artificial e carne
138 saborosa, podendo atingir até 20 kg (Santos et al., 2012).

139 A mudança da produção de pesca e aquicultura para as espécies nativas é o caminho para
140 o desenvolvimento da atividade aquícola, permitindo uma maior acessibilidade da população,
141 estímulo do mercado interno, ampliar a exportação e aumentar o consumo de pescado (Saint-
142 Paul, 2017). Uma vez que a demanda vem crescendo e esses produtos contribuem com uma
143 grande parcela da alimentação da população mundial, é necessária a implementação cada vez
144 maior de políticas públicas na pesca e aquicultura. Esse cenário revela a importância das
145 pesquisas científicas com peixes, contemplando os mais diversos domínios como toxicologia,
146 imunologia, ecologia, genética, fisiologia e nutrição, buscando aumentar o nível de
147 conhecimento para a criação desses animais. Apesar do zebrafish (*Danio rerio*) e do medaka
148 (*Oryzias latipes*) serem amplamente utilizados como organismos modelo para o entendimento de
149 muitos processos biológicos, existem certas limitações devido ao pequeno tamanho que atingem,
150 como o estudo do músculo esquelético durante o crescimento do animal (Froehlich et al., 2013).
151 Peixes como a tilápia do Nilo, a truta arco-íris e o pacu (Figura 1) são excelentes modelos
152 experimentais para esse tipo de estudo e em outras áreas científicas, tanto pelo grande tamanho
153 corporal que atingem quanto pelo alto valor e interesse econômico que possuem.

154



Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)



Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

155
156 **Figura 1:** Exemplos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pacu (*Piaractus*
157 *mesopotamicus*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), peixes de grande importância
158 econômica e científica.

159 (<http://ref.data.fao.org/photo?entryId=2cc8a2e8-5aca-4b5e-9ff3-bfe0731ddcda>

160 <http://isabellpellizzer.com.br/teodoro-sampaio-sp/>

161 <http://www.invasivespeciesinitiative.com/rainbow-trout/>).

162

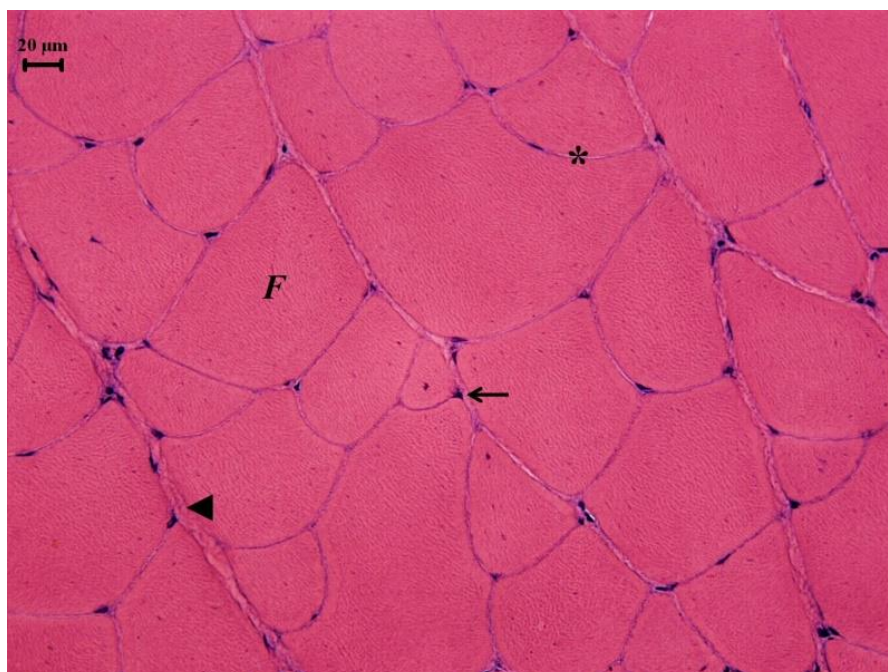
163 1.2. Músculo esquelético

164 O tecido muscular esquelético é considerado um tecido fundamental, assim como o
165 epitelial, conjuntivo e nervoso. A função básica dos músculos é a produção de força e geração de
166 movimento, possíveis através da capacidade de contração e relaxamento de suas células. Isso faz
167 com que o tecido muscular esquelético seja essencial para vários processos fisiológicos de um
168 organismo, como a locomoção, manutenção e mudanças na postura e respiração, além de um
169 importante papel no metabolismo, agindo como fonte energética, e também na produção de calor
170 e manutenção da temperatura corporal (Junqueira e Carneiro, 2013; revisado por Frontera e
171 Ochala, 2015).

172 As células do tecido muscular esquelético são conhecidas como fibras musculares. São
173 células alongadas, podendo chegar até 30 cm de comprimento, cilíndricas, com um diâmetro que
174 varia de 10 a 100 μm , e multinucleadas (Junqueira e Carneiro, 2013). O citoplasma
175 (sarcoplasma) das fibras é totalmente preenchido por estruturas cilíndricas denominadas

176 miofibrilas, que são formadas por filamentos de proteínas contráteis. As miofibrilas deslocam os
177 vários núcleos em direção à membrana plasmática (sarcolema), ou seja, para a periferia das
178 células, sendo essa uma característica exclusiva do músculo esquelético (revisado por Frontera e
179 Ochala, 2015). O músculo esquelético está sujeito a variações no diâmetro de suas fibras
180 musculares, que depende de fatores como o próprio músculo considerado, idade e sexo do
181 organismo, estado de nutrição, exercício físico e diversas patologias.

182 Os músculos são revestidos por uma camada espessa de tecido conjuntivo denominado
183 epimísio, que emite septos para o interior do tecido separando-o em feixes. O tecido conjuntivo
184 que envolve esses feixes de fibras musculares, também conhecidos como fascículos, é conhecido
185 como perimísio. Além do epimísio e perimísio, uma delgada camada de tecido conjuntivo
186 envolve cada uma das fibras musculares, e recebe o nome de endomísio, formado pela lâmina
187 basal em associação com fibras reticulares (revisado por Kjaer, 2004) (Figura 2). O tecido
188 conjuntivo tem grande importância para a fisiologia do tecido muscular, contribuindo para a
189 união das fibras musculares e permitindo que a força de contração gerada por cada fibra seja
190 transmitida não somente ao músculo inteiro, mas também a outras estruturas, como os ossos e
191 tendões. Além disso, o tecido conjuntivo também permite a inserção de vasos sanguíneos,
192 linfáticos e nervos. Em peixes, a distribuição do tecido conjuntivo no músculo esquelético e a
193 concentração de colágeno variam conforme a espécie, a etologia do animal, a atividade muscular
194 realizada durante os movimentos natatórios e o estágio de desenvolvimento (Michelin et al.,
195 2009).

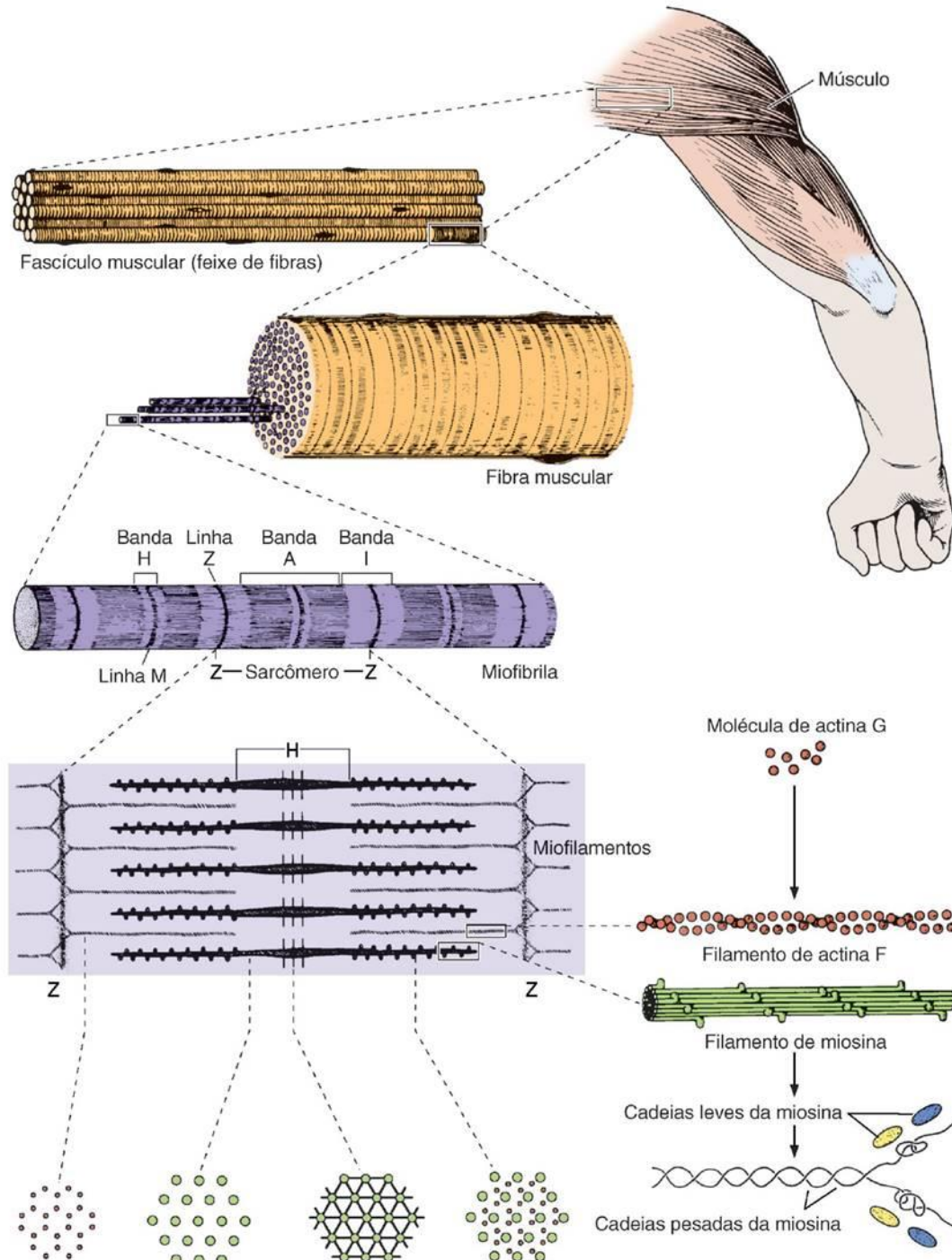


197 **Figura 2:** Corte transversal de músculo esquelético de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) adulto
198 (imagem de autoria própria). F: fibra muscular; *: endomísio; ◀: perimísio; ←: mionúcleo.
199 Coloração por hematoxilina-eosina (Aumento: 40X; Barra: 20 µm).

200
201 As fibras musculares esqueléticas apresentam estriações, devido ao arranjo repetitivo das
202 miofibrilas em unidades conhecidas como sarcômeros (revisado por Frontera e Ochala, 2015). O
203 sarcômero é a unidade funcional básica e contrátil do músculo, e sua repetição ao longo da fibra
204 proporciona uma alternância de faixas escuras (banda A) e claras (banda I), resultando nas
205 estriações transversais características. As miofibrilas são principalmente constituídas de
206 filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina, dispostos longitudinalmente e
207 organizados de maneira simétrica e paralela (Junqueira e Carneiro, 2013). Além disso, existe um
208 conjunto de proteínas regulatórias, como tropomiosina e troponina, e estruturais, como titina,
209 nebulina, alfa actinina, desmina e distrofina. A actina apresenta-se sob a forma de polímeros
210 longos (actina F), constituídos por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) torcidas em
211 dupla-hélice. Cada monômero possui um sítio ativo, região na qual ocorre a interação com a
212 miosina. A molécula de miosina é um hexâmero formado por quatro cadeias leves de miosina
213 (MyLC) e duas cadeias pesadas de miosina (MyHC) (revisado por Geeves, 1999; Junqueira e
214 Carneiro, 2013). Apresenta uma dupla hélice, que constitui uma região conhecida como cauda, e
215 uma saliência globular conhecida como cabeça. A cabeça da miosina possui locais específicos
216 para a interação com a actina e para a ligação com a molécula de ATP, que será hidrolisada para
217 a liberação de energia utilizada na contração (revisado por Geeves, 1999). Com relação às
218 proteínas regulatórias, a tropomiosina é composta por duas cadeias em alfa hélice e a troponina
219 apresenta 3 subunidades: TnT, que se liga à tropomiosina; TnC, que tem afinidade pelos íons
220 cálcio; e TnI, que cobre o sítio ativo da actina, local em que ocorre a ligação da actina com a
221 miosina (revisado por Geeves, 1999; Junqueira e Carneiro, 2013).

222 A contração tem início com a ligação de íons cálcio à subunidade TnC da troponina. Essa
223 ligação promove uma alteração conformacional da troponina que acaba deslocando a
224 tropomiosina. Por sua vez, o deslocamento libera o sítio ativo da actina e permite sua interação
225 com a miosina. A cabeça da miosina apresenta atividade ATPásica, de modo que a hidrólise do
226 ATP em ADP, Pi (fosfato inorgânico) e energia promove uma alteração conformacional que
227 aumenta a curvatura da cabeça (revisado por Geeves, 1999; revisado por Frontera e Ochala,
228 2015). O movimento da cabeça da miosina empurra o filamento de actina, promovendo o
229 deslizamento dos filamentos contráteis uns sobre os outros. Esse processo se repete várias vezes

230 durante uma contração, aumentando o tamanho da zona de sobreposição entre os filamentos, o
231 que diminui o tamanho do sarcômero e leva ao encurtamento da fibra muscular (Junqueira e
232 Carneiro, 2013) (Figura 3).



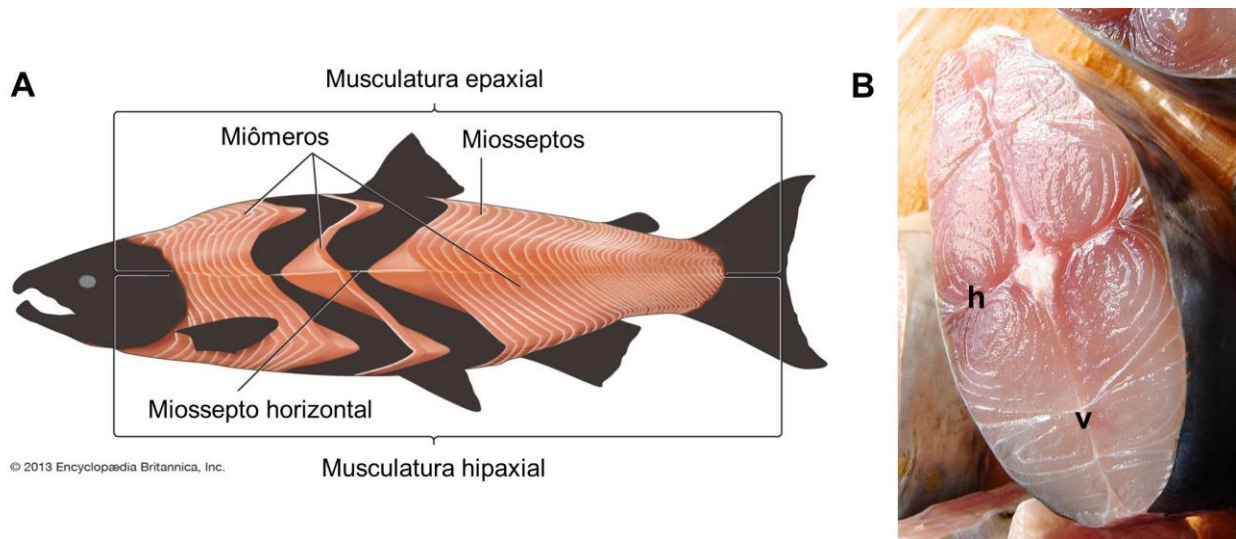
233
234 **Figura 3:** Esquema ilustrando a estrutura do sarcômero. As fibras musculares contêm estruturas
235 denominadas miofibrilas, que são formadas por filamentos de proteínas contráteis organizados

236 em sarcômeros. Os principais componentes dos sarcômeros são os filamentos de actina e
237 miosina, que interagem e promovem a contração muscular (Junqueira e Carneiro, 2008).

238
239 As propriedades do músculo esquelético são determinadas pelo número, tamanho e
240 composição das fibras musculares, e variações na estrutura e função dos componentes das fibras
241 resultam em adaptações a diferentes demandas (plasticidade muscular) (revisado por Blauuw et
242 al., 2013). De modo geral, a classificação dos tipos de fibras musculares é baseada nas
243 características contráteis e metabólicas dessas células. As fibras musculares podem expressar
244 diferentes isoformas de MyHC, que determinam a velocidade de hidrólise do ATP e,
245 consequentemente, a velocidade de contração muscular (revisado por Blauuw et al., 2013). Em
246 mamíferos, as fibras que expressam somente uma isoforma são denominadas puras e são
247 classificadas em tipo 1 (MyHC- β), 2A (MyHC-2A), 2X (MyHC-2X) e 2B (MyHC-2B).
248 Entretanto, uma mesma fibra muscular pode apresentar diferentes isoformas de MyHC, sendo
249 estas denominadas fibras híbridas e classificadas conforme a MyHC predominante, de acordo
250 com o seguinte esquema: $1 \leftrightarrow 1/2A \leftrightarrow 2A \leftrightarrow 2A/2X \leftrightarrow 2X \leftrightarrow 2X/2B \leftrightarrow 2B$ (Staron et al.,
251 1999). No entanto, esse padrão de expressão das isoformas não é obrigatório; por exemplo,
252 estudos já mostraram fibras musculares co-expressando MyHC do tipo 1 e 2X, mas não a
253 isoforma 2A (Caiozzo et al., 2003). As fibras do tipo 1 apresentam baixa atividade ATPásica,
254 possuindo contração lenta, enquanto as fibras do tipo 2 hidrolisam o ATP mais rapidamente,
255 possuindo contração rápida (revisado por Schiaffino e Reggiani, 2011). Além disso, esses tipos
256 de fibras musculares possuem propriedades metabólicas distintas: as fibras do tipo 1 são
257 caracterizadas por metabolismo aeróbico ou oxidativo, resistência à fadiga e geração reduzida de
258 força mecânica; as fibras do tipo 2B são caracterizadas por metabolismo anaeróbico ou
259 glicolítico, muito suscetíveis à fadiga e geração elevada de força mecânica; e as fibras do tipo 2A
260 e 2X combinam um metabolismo glicolítico e grande geração de força mecânica com a
261 resistência à fadiga (revisado por Blauuw et al., 2013).

262 Na maioria dos peixes o músculo esquelético constitui cerca de 60% da massa corporal
263 (Johnston, 2001). Essa musculatura está intimamente relacionada à fisiologia desses animais, de
264 modo que possibilita os movimentos natatórios e a adaptação ao meio aquático, representa a
265 principal reserva proteica e compreende a maior porção do filé, a parte mais valiosa do peixe
266 para a indústria da aquicultura (Johnston, 2001; Sängner e Stoiber, 2001). Geralmente, a
267 organização anatômica do músculo esquelético nos peixes se baseia em unidades idênticas
268 chamadas miômeros, estruturas envoltas por camadas de tecido conjuntivo denominadas

269 miosseptos. Os miômeros se repetem ao longo de todo o comprimento corporal do peixe e
270 possuem um formato em W, que permite um encaixe intrincado dessas unidades e diferentes
271 flexões corporais durante o nado (Van Leeuwen, 1999). O miossepto vertical divide os músculos
272 em antímeros direito e esquerdo e, na região em que se encontra o nervo da linha lateral, um
273 miossepto horizontal (septo transverso) divide a musculatura em epaxial e hipaxial (Currie e
274 Ingham, 2001) (Figura 4).

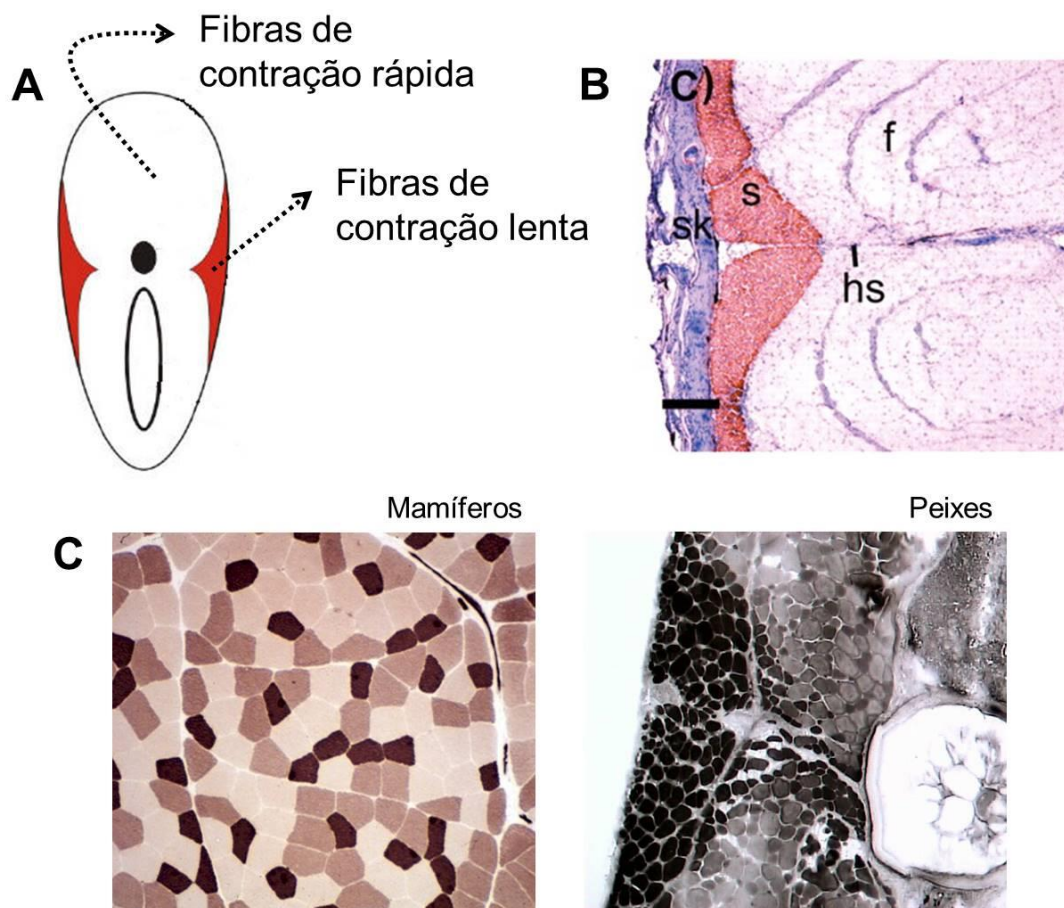


275
276 **Figura 4:** Organização anatômica do músculo esquelético nos peixes. (A) Estrutura dos
277 miômeros e miosseptos e as musculaturas epaxial e hipaxial (adaptado de Encyclopaedia
278 Britannica Online, 2010). (B) Miossepto vertical (v) e miossepto horizontal (h).

279 (<https://brunaquaglio.com/2015/12/20/peixes-magro-e-peixes-gordurosos-lista/>).

280
281 Em peixes, os tipos de fibras musculares encontram-se distribuídos em compartimentos
282 distintos, diferentemente do padrão em mosaico encontrado nos músculos dos mamíferos, em
283 que as diferentes fibras encontram-se entremeadas umas às outras (Barets, 1961; Johnston et al.,
284 1977; Sãnger e Stoiber, 2001; Johnston et al., 2004) (Figura 5). Essa é uma das principais
285 diferenças entre os músculos esqueléticos desses animais, tornando os peixes modelos
286 experimentais únicos em pesquisas envolvendo fibras musculares. Três tipos principais de fibras
287 podem ser identificados em peixes: rápidas, lentas e intermediárias. As fibras rápidas (*fast*)
288 compõem cerca de 70% da massa muscular, apresentam diâmetro de 50 a 100 μm e são
289 caracterizadas por velocidade de contração rápida, metabolismo glicolítico e baixas
290 concentrações de mitocôndrias e lipídeos (Sãnger e Stoiber, 2001). Além disso, essas fibras
291 possuem pouca mioglobina e menor suprimento sanguíneo, e por isso são também denominadas
292 fibras brancas (músculo esquelético branco). As fibras rápidas são mobilizadas durante os

293 movimentos bruscos de natação, associados à captura de alimentos e fuga de predadores (Sänger
294 e Stoiber, 2001). As fibras musculares lentas (*slow*) compreendem 10-20% da massa muscular e
295 localizam-se numa região mais superficial do corpo do peixe, com maior espessura em torno da
296 linha lateral. Elas apresentam diâmetro de 25 a 45 μm e são caracterizadas por velocidade de
297 contração lenta, metabolismo oxidativo e elevadas concentrações de mitocôndrias e lipídeos
298 (Sänger e Stoiber, 2001), além de muita mioglobina e alto suprimento sanguíneo, que conferem o
299 aspecto avermelhado ao músculo e a denominação fibras vermelhas (músculo esquelético
300 vermelho). As fibras lentas são utilizadas durante os movimentos lentos e de sustentação,
301 especialmente àqueles exigidos durante a natação migratória (Sänger e Stoiber, 2001). Entre os
302 compartimentos rápido e lento residem as fibras musculares intermediárias que, conforme seu
303 nome, apresentam propriedades contráteis e metabólicas intermediárias entre as fibras rápidas e
304 lentas (Sänger e Stoiber, 2001).



305
306
307 **Figura 5:** Diferentes tipos de fibras musculares localizados em compartimentos distintos no
308 músculo esquelético de peixes. (A) Esquema indicando a localização das fibras de contração
309 rápida e lenta. (B) Corte transversal do músculo esquelético de juvenil de salvelino ártico

310 (*Salvelinus alpinus*). As fibras foram marcadas com um anticorpo anti-miosina *slow* (S58
311 *antibody*) e contra coradas com hematoxilina-eosina. s: fibras musculares de contração lenta
312 (compartimento vermelho); f: fibras musculares de contração rápida (compartimento branco); hs:
313 miossepto horizontal; sk: pele (Johnston et al., 2004). (C) Indicação das diferenças na
314 distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares entre mamíferos e peixes. À esquerda um
315 corte transversal do músculo esquelético de rato (*Rattus norvegicus*) (imagem de autoria do
316 grupo de pesquisa), que apresenta padrão em mosaico, e à direita um corte transversal do
317 músculo esquelético de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Aguiar et al., 2005), que
318 apresenta compartimentalização. Fibras coradas pela técnica da ATPase ácida (pH=4.6).

319

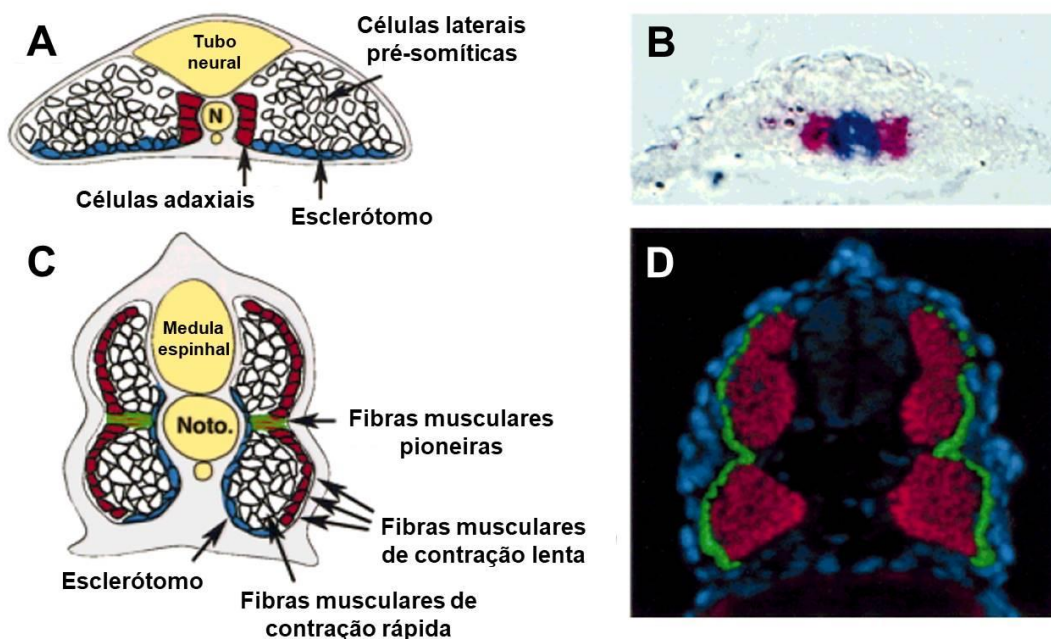
320 1.3. Miogênese

321 A formação de fibras musculares, ou miogênese, ocorre nas fases iniciais do
322 desenvolvimento embrionário. A mesoderme paraxial, que flanqueia o tubo neural e a notocorda,
323 sofre uma segmentação da região anterior para a posterior, formando estruturas denominadas
324 somitos (revisado por Buckingham e Rigby, 2014). Nos mamíferos, os somitos subdividem-se
325 em uma porção ventral denominada esclerótomo, que originará a coluna vertebral e as costelas, e
326 uma porção dorsal denominada dermomiótomo, responsável pela formação dos músculos do
327 tronco e dos membros, da derme dorsal, de células endoteliais e musculares lisas, e dos vasos
328 sanguíneos (revisado por Buckingham e Rigby, 2014). O dermomiótomo é fonte de populações
329 de células precursoras miogênicas, que delaminam e migram para a formação de uma camada
330 subjacente conhecida como miótomo, cuja porção dorsomedial originará os músculos intrínsecos
331 das costas, enquanto a porção ventrolateral originará os músculos das paredes ventrais e laterais
332 do corpo. Além disso, células do dermomiótomo também migram para locais mais distantes,
333 formando os músculos dos membros, e posteriormente para o interior do miótomo já formado,
334 fornecendo uma população de células progenitoras de reserva que originarão as células satélite
335 no músculo maduro (revisado por Yusuf e Brand-Saber, 2012).

336 Nos peixes a classificação de um dermomiótomo ainda é controversa, sendo que a
337 maioria dos trabalhos divide os somitos em esclerótomo e miótomo. Sttelabotte et al. (2007)
338 mostraram que a borda anterior dos somitos fornece uma população de células progenitoras
339 miogênicas equivalentes às células satélite, que serão necessárias para o crescimento muscular
340 do peixe após o nascimento (Sttelabotte et al., 2007). Diferentemente dos mamíferos, o miótomo
341 é relativamente maior que o esclerótomo nos peixes, pois a necessidade de um esqueleto robusto
342 é reduzida devido à flutuabilidade da água e à bexiga natatória, ao passo que a viscosidade do

343 ambiente aquático exige maior massa muscular para a locomoção (revisado por Stickney et al.,
344 2000).

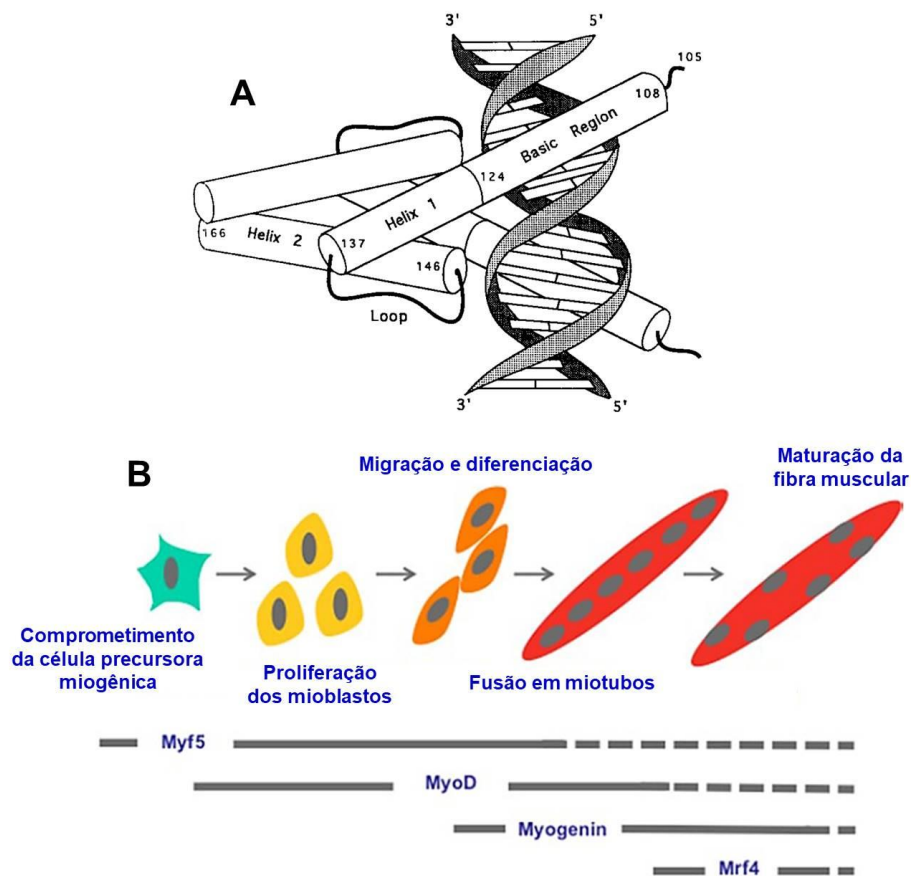
345 Durante a somitogênese dos peixes, diferentes tipos celulares formarão e constituirão o
346 miótomo, sendo eles, principalmente, as células adaxiais e as células laterais pré-somíticas
347 (revisado por Stickney et al., 2000). As células adaxiais localizam-se ao redor da notocorda e,
348 sob o estímulo de glicoproteínas secretadas pela notocorda e pelo tubo neural, migram em
349 direção à região superficial do miótomo, formando uma camada única abaixo da epiderme.
350 Nessa região, as células adaxiais fundem-se e originam as fibras musculares lentas, ou seja, a
351 musculatura vermelha do peixe (revisado por Stickney et al., 2000). Um determinado conjunto
352 de células adaxiais não migra para a superfície do miótomo, permanecendo acopladas à
353 notocorda e se diferenciando nas chamadas fibras musculares pioneiras. Essas fibras atravessam
354 toda a extensão do miótomo e orientam a migração das demais células adaxiais à região
355 superficial. Além disso, as fibras musculares pioneiras concentram-se no nível de formação do
356 miossepto horizontal, podendo ter algum papel no desenvolvimento desta estrutura (Halpern et
357 al., 1993). Após migração das células adaxiais, as células laterais pré-somíticas iniciam sua fusão
358 e diferenciação em fibras musculares rápidas, localizadas numa porção mais profunda do
359 miótomo (revisado por Stickney et al., 2000) (Figura 6).



360
361 **Figura 6:** Miogênese embrionária e formação dos tipos de fibras musculares no miótomo de
362 peixes. (A) Esquema de um corte transversal de embrião de zebrafish (*Danio rerio*) com 13
363 horas, destacando a posição das células adaxiais e células laterais pré-somíticas. (B) As células

364 adaxiais expressam *myod* (vermelho) enquanto ainda adjacentes à notocorda (azul). (C) Esquema
365 de um corte transversal de embrião de zebrafish (*Danio rerio*) com 24 horas, destacando a
366 posição das fibras musculares de contração lenta, fibras musculares pioneiras e fibras musculares
367 de contração rápida. (D) Fibras musculares de contração lenta (verde - S58 *antibody*) formam
368 uma camada superficial, enquanto as fibras musculares de contração rápida (vermelho - zm4
369 *antibody*) permanecem numa região mais profunda do miótomo (adaptado de Stickney et al.,
370 2000).

371
372 Existe uma “hierarquia genética” (expressão sequencial) de componentes moleculares
373 que regulam o processo miogênico, desde o comprometimento (determinação ou especificação)
374 das células precursoras miogênicas até sua diferenciação em fibras musculares. Os principais
375 deles são os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) (Olson, 1990; revisado por Weintraub,
376 1993; Johansen e Overturf, 2005), uma família de fatores transcricionais que ativam genes
377 músculo-específicos. A estrutura molecular de um MRF apresenta um domínio altamente
378 conservado, com cerca de 60 aminoácidos, conhecido como *basic helix-loop-helix*. A região
379 *helix-loop-helix* está envolvida com a ligação entre o MRF e outra molécula idêntica, formando
380 um homodímero, ou entre o MRF e os cofatores transcricionais E12 e E47, formando um
381 heterodímero. A região *basic* está envolvida com a ligação do homodímero ou heterodímero a
382 uma sequência específica do DNA (5'-CANNTG-3'), denominada *E-box* (Ma et al., 1994). Essa
383 sequência está presente na região promotora de genes músculo-específicos, que codificam, por
384 exemplo, proteínas contráteis, estruturais e enzimas musculares, de modo que o homodímero ou
385 heterodímero ativam a transcrição desses genes (revisado por Rescan, 2001). Assim, os MRFs
386 controlam o programa miogênico dentro da célula, suprimindo outros possíveis destinos
387 celulares. Dentre os MRFs destacam-se o Myf5 (*myogenic factor 5*), Myod1 (*myogenic*
388 *differentiation 1*), Myog (*myogenin*) e Mrf4 (*muscle-specific regulatory factor 4*) (Olson, 1990;
389 revisado por Weintraub, 1993). O Myf5 e a Myod1 são conhecidos como MRFs primários, sendo
390 responsáveis principalmente pelo comprometimento das células precursoras à linhagem
391 miogênica e pela proliferação e migração dos mioblastos (célula precursora miogênica já
392 comprometida) no músculo esquelético. A Myog e o Mrf4 são considerados MRFs secundários e
393 estão envolvidos com a diferenciação e fusão dos mioblastos em miotubos, e sua posterior
394 maturação em uma fibra muscular (Johansen e Overturf, 2005; Almeida et al., 2010) (Figura 7).



395
396 **Figura 7:** Miogênese e fatores de regulação miogênica (MRFs). (A) Esquema do complexo
397 formado entre um homodímero de Myod e o DNA (Ma et al., 1994). (B) Expressão sequencial e
398 regulação realizada pelos MRFs durante a miogênese do músculo esquelético (adaptado de
399 Zanou e Gailly, 2013).

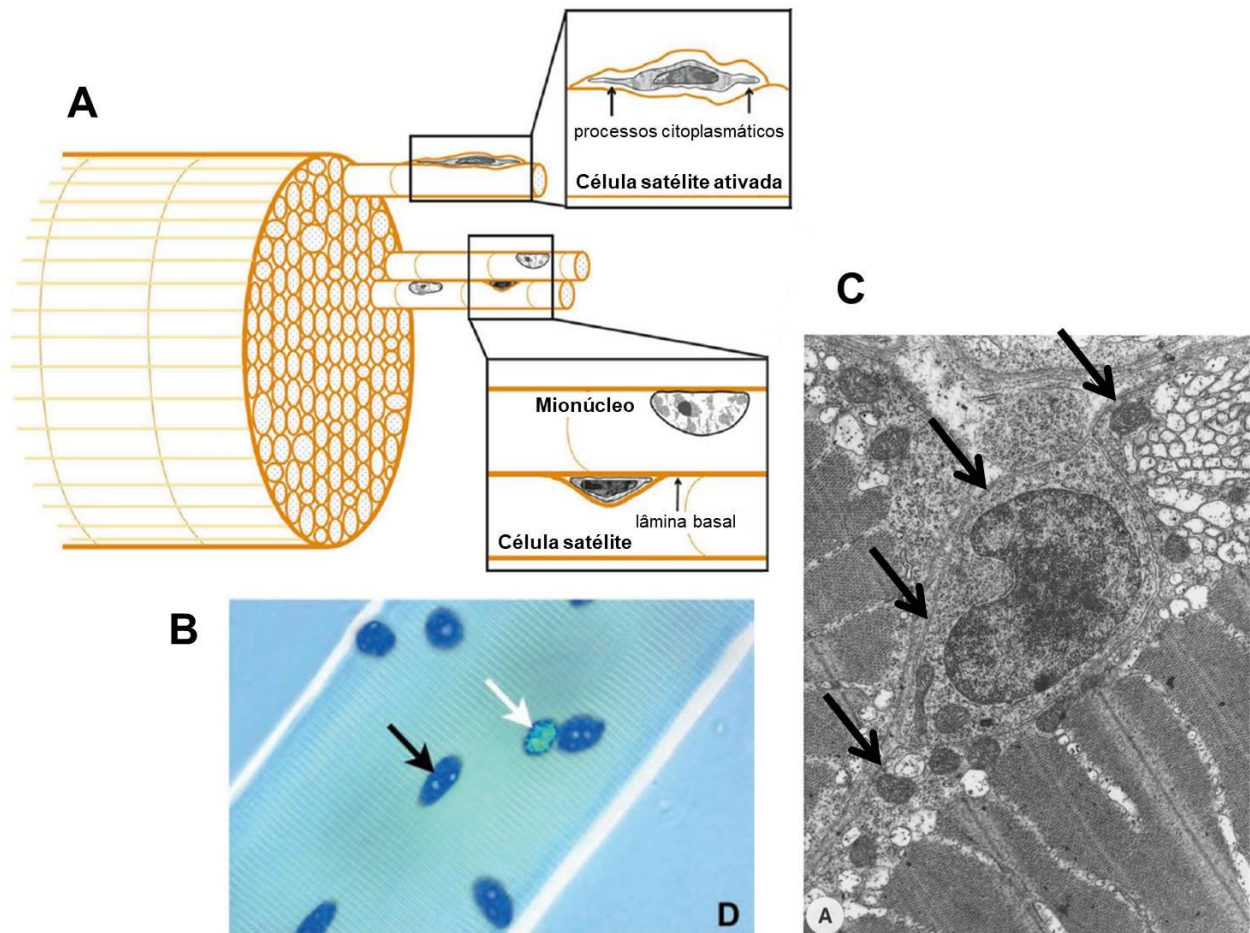
400
401 No entanto, outros fatores expressos anteriormente são necessários para a ativação dos
402 MRFs e direcionamento da célula à miogênese. As células mesodermis são dependentes de
403 moléculas provenientes de tecidos adjacentes para indução da miogênese no somito inicial.
404 Diversas glicoproteínas da família das Wnts, secretadas pelo tubo neural (Wnt1 e Wnt3a) e
405 ectoderme (Wnt6 e Wnt7a), e a molécula sinalizadora Shh (*sonic hedgehog*), secretada pela
406 notocorda, subdividem os somitos em esclerótomo e dermomiótomo, além de induzir a
407 expressão do Myf5 e Myod1 nas células do miótomo (revisado por Hernández-Hernández et al.,
408 2017). Por sua vez, a proteína Bmp4 (*bone morphogenetic protein 4*), secretada pela mesoderme
409 lateral, promove uma regulação negativa desses MRFs (revisado por Hernández-Hernández et
410 al., 2017). Outros componentes importantes da hierarquia miogênica são os fatores
411 transcricionais Pax3 (*paired box 3*) e Pax7 (*paired box 7*). Em mamíferos, o Pax3 é expresso em

412 todo o dermomiótomo e constitui um marcador de células progenitoras miogênicas migrantes
413 que ainda não ativaram Myf5 e Myod1, ou seja, células que ainda não se comprometeram com a
414 linhagem miogênica (revisado por Buckingham e Rigby, 2014). Altos níveis de Pax3 direcionam
415 as células do dermomiótomo para o destino miogênico, enquanto baixos níveis podem dar
416 origem a células da derme, endoteliais, musculares lisas e adipócitos. Além disso, O Pax3 regula
417 genes envolvidos no equilíbrio que deve ser mantido entre auto-renovação celular e miogênese,
418 como Fgfr4 (*fibroblast growth factor receptor 4*), Spry2 (*sprouty rtk signaling antagonist 2*) e
419 Myf5 (revisado por Buckingham e Rigby, 2014). Progressivamente ocorre uma redução na
420 expressão do Pax3 e um aumento na expressão do Pax7. A expressão do Pax7 fica mais restrita à
421 porção central do dermomiótomo, local em que células Pax3/Pax7-positivas migram e fornecem
422 uma população celular de reserva no miótomo (revisado por Buckingham e Rigby, 2014). Dessa
423 forma, o Pax7 se torna um marcador molecular das células satélite, necessárias para a miogênese
424 pós-natal e regeneração do músculo adulto. Após a expressão de Pax3 e Pax7, as células que
425 definitivamente irão contribuir para a formação de fibras musculares passam a expressar
426 sequencialmente Myf5, Myod1, Myog e Mrf4 (revisado por Buckingham e Rigby, 2014). A
427 hierarquia miogênica prevalece no músculo esquelético dos vertebrados, mas os peixes possuem
428 uma particularidade. Enquanto as células precursoras miogênicas dos mamíferos somente
429 expressam MRFs após migrarem para os locais em que definitivamente irão se diferenciar em
430 fibras musculares maduras, as células adaxiais já são Myf5/MyoD-positivas antes mesmo do
431 início da formação dos somitos, ainda adjacentes à notocorda (Figura 6B) (revisado por Stickney
432 et al., 2000; Stellabotte et al., 2007; revisado por Buckingham e Rigby, 2014). Apesar de as
433 células laterais pré-somíticas somente expressarem esses fatores após a somitogênese, esse
434 comprometimento precoce das células adaxiais demonstra uma identidade miogênica antecipada
435 no músculo esquelético dos peixes (revisado por Stickney et al., 2000).

436

437 **1.4. Crescimento muscular pós-natal**

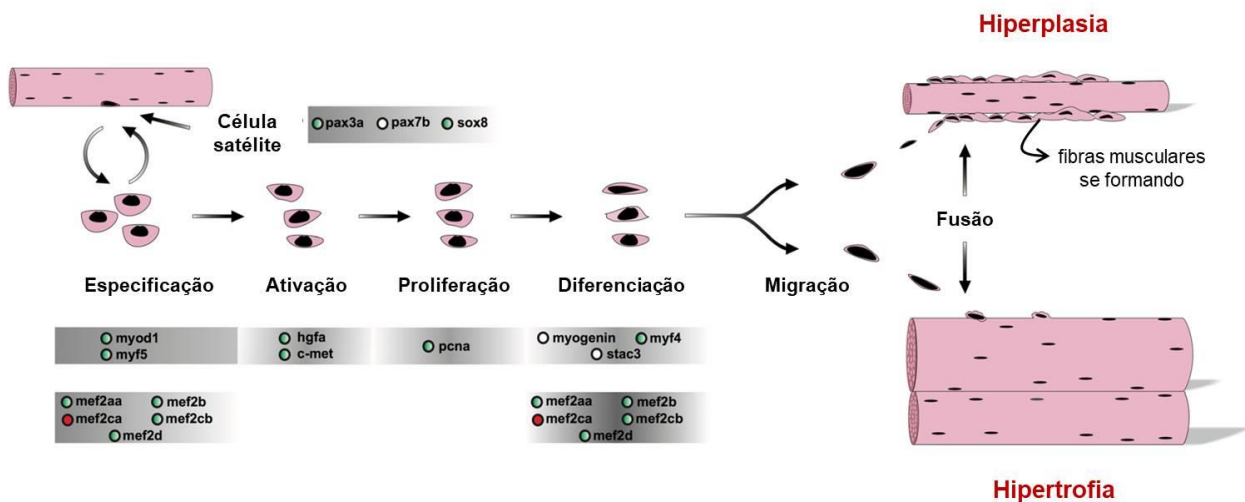
438 O crescimento pós-natal do músculo esquelético nos peixes envolve uma população de
439 células precursoras miogênicas que, após estímulos, reativam o programa miogênico
440 embrionário e originam mioblastos capazes de fusão (revisado por Johnston et al., 2011). Essas
441 são as células-tronco do tecido muscular e também são conhecidas como mioblastos
442 indiferenciados ou células satélite, devido à localização na periferia das fibras musculares, entre
443 a lâmina basal e o sarcolema (Mauro, 1961; Koumans et al., 1990) (Figura 8).



444
445 **Figura 8:** Célula satélite do músculo esquelético. (A) Esquema mostrando a posição da célula
446 satélite, entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular (adaptado de Hawke e Garry,
447 2001). (B) Imunocitoquímica de fibra muscular de mamífero, indicando alta expressão de Pax7
448 pela célula satélite (flecha branca) em comparação ao mionúcleo (flecha preta). (C) Microscopia
449 eletrônica de transmissão do músculo esquelético de carpa comum (*Cyprinus carpio*). ↘: lâmina
450 basal envolvendo ambas a célula satélite e a fibra muscular (Koumans et al., 1990).

451
452 Os núcleos de células satélite constituem de 2 a 7% dos núcleos musculares em
453 indivíduos saudáveis, e são relativamente grandes e com cromatina muito condensada, ou seja,
454 permanecem funcionalmente inativos ou num estado quiescente. Essa quiescência é mantida pelo
455 Pax7, que reprime genes envolvidos com a diferenciação dos mioblastos (revisado por
456 Buckingham e Rigby, 2014). Durante a ativação, as células satélite reduzem a expressão de Pax7
457 e aumentam a expressão dos MRFs, originando os mioblastos, cuja proliferação e diferenciação
458 são os mecanismos que promovem a hiperplasia (aumento do número de fibras musculares) e
459 hipertrofia (aumento do tamanho das fibras) (Rowlerson e Veggetti, 2001; revisado por Johnston

460 et al., 2011). Durante o crescimento hiperplásico, os mioblastos proliferam, migram e agregam-
461 se na superfície de fibras musculares pré-existentes, iniciando os processos de diferenciação e
462 fusão e originando os miotubos, que posteriormente formam fibras musculares maduras. No
463 crescimento hipertrófico, após a proliferação, migração e diferenciação, os núcleos dos
464 mioblastos são internalizados nas fibras musculares em crescimento, de modo que promovem
465 uma maior síntese de miofibrilas e, conseqüentemente, aumentam a área e o diâmetro de fibras
466 pré-existentes (revisado por Johnston et al., 2011) (Figura 9).



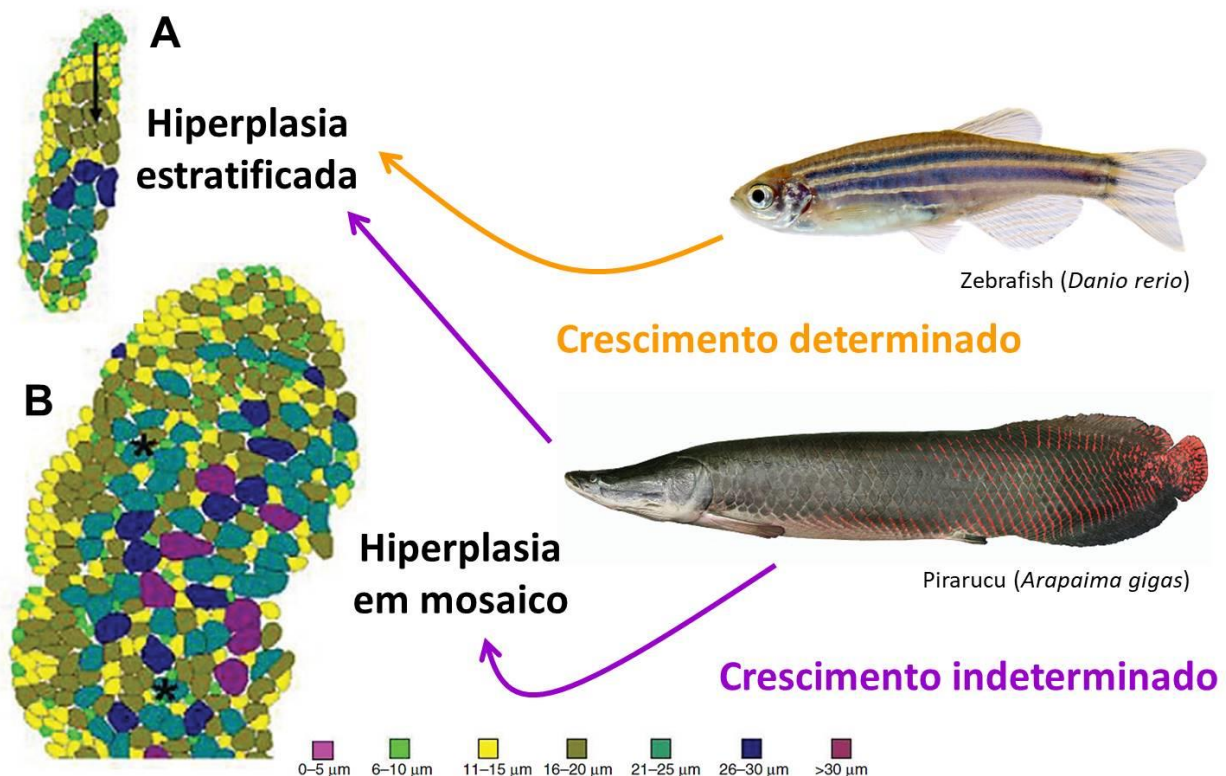
467 **Figura 9:** Crescimento pós-natal do músculo esquelético em peixes. Ocorre a retomada dos
468 eventos da miogênese, especialmente proliferação e diferenciação de mioblastos, que irão
469 culminar com os processos de recrutamento ou hiperplasia muscular, aumentando o número de
470 fibras, e hipertrofia muscular, aumentando o tamanho das fibras. Esferas brancas indicam
471 componentes com maior expressão nas fibras musculares de contração rápida; esferas vermelhas
472 indicam componentes com maior expressão nas fibras musculares de contração lenta; esferas
473 verdes indicam componentes que não apresentam diferenças de expressão entre os tipos de fibras
474 musculares (adaptado de Mareco et al., 2015).

475

476

477 A contribuição dos mecanismos de hiperplasia e hipertrofia no crescimento muscular pós-
478 natal tem sido estudada em muitas espécies de peixes. Estudos mostraram que em muitos desses
479 animais existem duas “ondas” de intenso crescimento hiperplásico (Rowlerson e Veggetti, 2001;
480 Johnston et al., 2003). A primeira é conhecida como hiperplasia estratificada, uma continuidade
481 da miogênese embrionária, que promove a formação de novas fibras musculares em camadas.
482 Essa hiperplasia ocorre a partir de zonas germinativas e é responsável pelo espessamento da
483 musculatura nos estágios iniciais do desenvolvimento (Rowlerson e Veggetti, 2001). A segunda

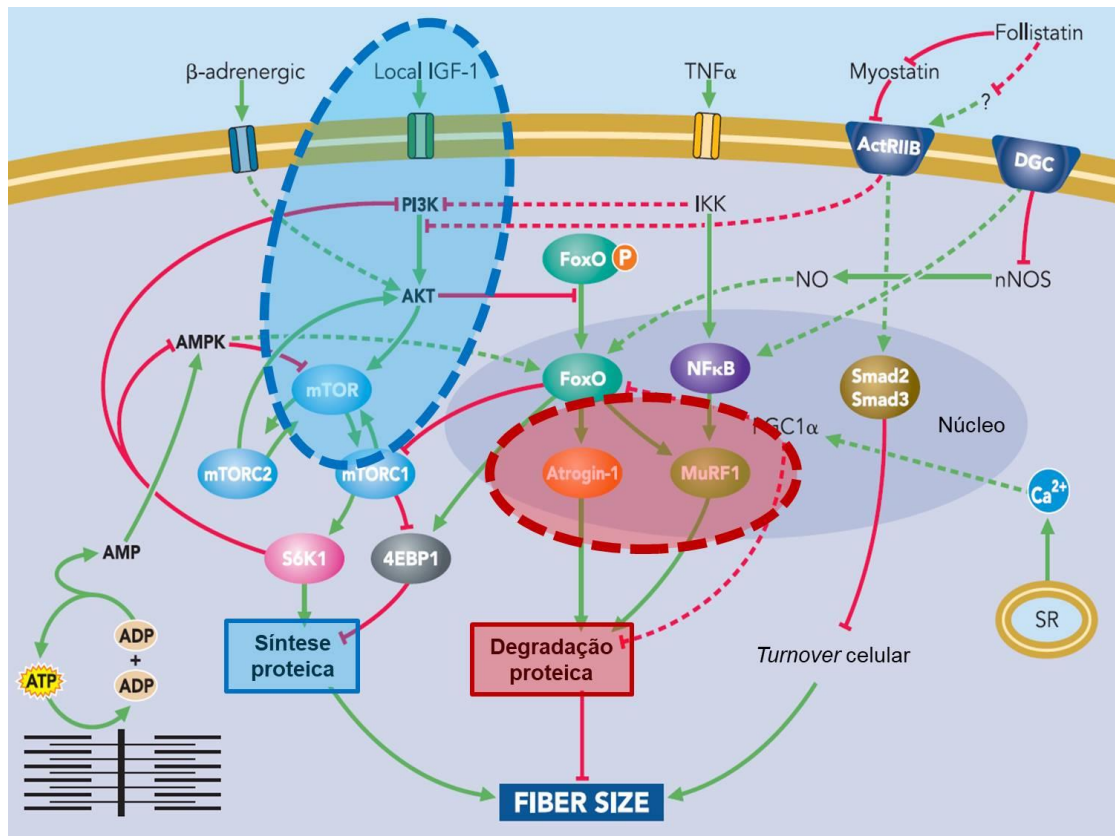
484 é denominada hiperplasia em mosaico, que promove a formação de novas fibras em toda a
485 musculatura do peixe, a qual também apresenta fibras musculares num estágio de maturação
486 mais avançado (Rowlerson e Veggetti, 2001; Almeida et al., 2010). Dessa forma, o músculo
487 esquelético apresenta fibras musculares com diâmetro pequeno entre fibras de maior diâmetro,
488 como um mosaico, permitindo um maior desenvolvimento da massa muscular (Figura 10). Os
489 peixes que apresentam ambos os tipos de crescimento hiperplásico são denominados peixes de
490 crescimento somático indeterminado, nos quais o grande aumento da massa muscular
491 proporcionado pela hiperplasia em mosaico permite atingirem um grande tamanho corporal e
492 também confere importância econômica à espécie (Rowlerson e Veggetti, 2001). Por outro lado,
493 os peixes que apresentam somente a hiperplasia estratificada são denominados peixes de
494 crescimento somático determinado, que atingem um tamanho fixo uma vez que a hiperplasia
495 cessa nos estágios mais iniciais do desenvolvimento, tornando o crescimento hipertrófico das
496 fibras o principal mecanismo de crescimento muscular pós-natal nessas espécies (Biga e Goetz,
497 2006; Froehlich et al., 2013).



498
499
500 **Figura 10:** Crescimento hiperplásico do músculo esquelético de peixes. (A) Hiperplasia
501 estratificada, em que a formação das fibras ocorre em camadas. A flecha preta ilustra o sentido
502 do crescimento conforme o diâmetro das fibras musculares. (B) Hiperplasia em mosaico, em que

503 novas fibras são formadas entre fibras musculares já maduras, de maior tamanho. Os asteriscos
504 ilustram fibras musculares cercadas por fibras “jovens” (adaptado de Johnston et al., 2009).
505 Peixes que apresentam somente a hiperplasia estratificada, como o zebrafish, são denominados
506 peixes de crescimento somático determinado, enquanto peixes que apresentam ambas as
507 hiperplasias estratificada e em mosaico, como o pirarucu, são denominados peixes de
508 crescimento somático indeterminado.

509
510 O crescimento muscular é um processo multifatorial que integra sinais extrínsecos e
511 intrínsecos em sua regulação. Dentre os fatores extrínsecos se destacam a temperatura,
512 salinidade, oxigenação, intensidade e duração de luz, pH e fluxo de água (revisado por Johnston,
513 2006). Com relação aos sinais intrínsecos, além da regulação pelos MRFs e outros fatores
514 transcricionais, nós podemos citar hormônios, citocinas e fatores de crescimento. Esses
515 componentes influenciam diretamente o tamanho da fibra muscular, através de um delicado
516 balanço entre a síntese e a degradação proteica, cujas vias de sinalização se inter-relacionam e
517 modulam uma a outra (Sandri, 2008). Para que ocorra um aumento de massa muscular, o balanço
518 deve ser favorável à síntese proteica, fortemente influenciada pela via Igf/Pi3k/Mtor. Por outro
519 lado, a atrofia muscular (redução no tamanho das fibras musculares) é decorrente de um balanço
520 favorável à degradação de proteínas, mediada principalmente pelo Mafbx e Murf1 (atrogenes)
521 (revisado por Glass, 2005) (Figura 11).



522

523

524 **Figura 11:** Vias de sinalização da síntese e degradação proteica regulando o crescimento do
 525 músculo esquelético de peixes. A síntese proteica tem início com a ligação do IGF1 em seu
 526 receptor de membrana, desencadeando uma cascata que ativa o Pi3k e Mtor (círculo azul). A
 527 degradação proteica é desencadeada por diversas formas, mas culmina geralmente com a
 528 ativação do Mafbx (Atrogin-1) e Murf1 (círculo vermelho), que quebram proteínas sarcoméricas
 529 e outros componentes musculares (adaptado de Sandri, 2008).

530

531 Os principais fatores que regulam a síntese proteica são o IGF1 e IGF2 (*insulin like growth*
 532 *factor*), juntamente com seus próprios receptores (IGFR - *insulin like growth factor receptor*) e
 533 proteínas ligantes (IGFBP - *insulin like growth factor binding protein*) (revisado por Johnston et
 534 al., 2011). O IGF1 é um dos mais estudados e caracterizados fatores promotores de crescimento
 535 muscular. Em vertebrados o IGF1 é sintetizado principalmente pelo fígado, em resposta a
 536 nutrientes e ao hormônio de crescimento (GH - *growth hormone*). O IGF1 produzido no fígado é
 537 secretado para o sistema circulatório para gerar um efeito endócrino, mas outros tecidos também
 538 apresentam uma produção local de IGF1, incluindo o músculo esquelético, gerando efeitos
 539 parácrinos e autócrinos (revisado por Johnston et al., 2011). Quando o IGF1 se liga ao seu

540 receptor de membrana (Igf1r) desencadeia uma cascata de fosforilação ao promover a ativação
541 do Pi3k (*phosphatidylinositol-3-kinase*), necessário para a produção do *phosphatidylinositol-*
542 *3,4,5-triphosphate*. Esse componente recruta o Akt (*protein kinase B*), responsável pela ativação
543 do Mtor (*mechanistic target of rapamycin kinase*) (Sandri, 2008). O Mtor processa e integra
544 sinais nutricionais, energéticos e de crescimento, regulando o ciclo celular, transcrição gênica,
545 organização do citoesqueleto e síntese de proteínas. Essa quinase forma dois complexos
546 multiméricos conhecidos como TORC1 e TORC2 (Sandri, 2008). O TORC1 contém a proteína
547 Rptor (*regulatory associated protein of mtor complex 1*) e estimula a síntese proteica pela
548 ativação do Rps6k (*ribosomal protein s6 kinase*) e inibição do Eif4ebp1 (*eukaryotic translation*
549 *initiation factor 4e-binding protein 1*). O TORC2 contém a proteína Rictor (*rptor independent*
550 *companion of mtor complex 2*) e estimula a fosforilação e ativação do Akt, gerando um *feedback*
551 positivo (Vélez et al., 2014). Estudos vêm demonstrando que, além da integração de sinais
552 endócrinos, a ativação da síntese proteica também envolve outros caminhos. Alguns trabalhos
553 mostraram efeitos estimulatórios dos aminoácidos, seja pela ativação da via do Mtor (Seiliez et
554 al., 2008; Vélez et al., 2014) ou de membros do sistema de Igfs (Bower e Johnston, 2010b;
555 Garcia de la serrana e Johnston, 2013). Esses estudos suportam a existência de estímulos
556 nutricionais no crescimento do músculo esquelético de peixes e reforçam a necessidade de
557 experimentos com aminoácidos, uma vez que essas moléculas são comumente administradas na
558 dieta desses animais visando atender ou exceder os requisitos dietéticos para um crescimento
559 ideal e eficiente conversão alimentar. Os aminoácidos essenciais, também denominados
560 indispensáveis, representam nutrientes de grande importância para o desenvolvimento e
561 crescimento de peixes, uma vez que esses animais não são capazes de sintetizá-los. Dentre os
562 aminoácidos essenciais mais comumente utilizados em dietas para peixes temos a lisina,
563 metionina, treonina, triptofano e leucina (revisado por Li et al., 2008). Os aminoácidos não-
564 essenciais são também chamados de dispensáveis, ou seja, são sintetizados pelo organismo.
565 Dentre os aminoácidos não-essenciais, destacam-se a alanina e glutamina (revisado por Li et al.,
566 2008). Os aminoácidos possuem inúmeros papéis nos organismos, servindo amplamente como
567 “blocos” para a construção de proteínas e como substratos energéticos, mas também possuem
568 funções que variam dependendo do aminoácido. Cleveland e Radler (2019) mostraram que a
569 leucina e fenilalanina reduzem as taxas de degradação proteica em culturas de células musculares
570 de trutas arco-íris, enquanto a valina e lisina aumentam a proteólise quando em excesso perante
571 outros aminoácidos essenciais (Cleveland e Radler, 2019). Além de inibir a degradação de
572 proteínas, a leucina tem um importante papel como ativador da síntese proteica em mamíferos

573 (Garlick, 2005; Duan et al., 2016). Recentemente, o mecanismo através do qual os aminoácidos
574 estimulam a síntese de proteínas tem sido descrito em mamíferos, com a identificação dos
575 complexos Rrag GTPases (*ras related gtp binding*) e Lamtor (*late endosomal/lysosomal adaptor,*
576 *mapk and mtor activator*) como sensores de aminoácidos e promotores da ativação do Mtor
577 (Sancak et al., 2010; Demetriades et al., 2014). Visto o papel do sistema de Igfs e dos
578 aminoácidos no aumento da síntese de proteínas, a aplicação dessas moléculas em peixes
579 apresenta-se como um potencial tratamento para a obtenção de crescimento muscular, com
580 possíveis intervenções na piscicultura.

581 Além do papel na síntese de proteínas, o Akt previne a expressão de genes relacionados à
582 degradação proteica e atrofia muscular, através da fosforilação do Foxo (*forkhead box o*)
583 (revisado por Bonaldo e Sandri, 2013). A fosforilação do Foxo promove sua translocação do
584 núcleo para o sarcoplasma, impedindo que desempenhe seu papel como fator transcricional. No
585 entanto, a baixa atividade do Akt aumenta os níveis de Foxo nuclear (defosforilado), que
586 promove a ativação do Murf (*muscle-specific ring finger protein*) e Mafbx (*muscle atrophy f-box*
587 *protein*) (revisado por Bonaldo e Sandri, 2013), também denominados Trim63 (*tripartite motif*
588 *containing 63*) e Fbxo32 (*f-box protein 32*), respectivamente. O Murf e o Mafbx são enzimas
589 ubiquitina ligases cuja função é a transferência de ubiquitinas a determinado substrato proteico.
590 Esse substrato, uma vez poliubiquitinado, é ancorado ao complexo proteassoma, para que seja
591 realizada sua degradação. Ambos Murf e Mafbx regulam a degradação de diversos componentes
592 presentes no músculo esquelético; o Murf controla a degradação de proteínas sarcoméricas,
593 como a troponina e as cadeias pesadas e leves de miosinas, enquanto o Mafbx promove a
594 degradação da Myod e do Eif3j (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit j*), crucial para
595 a síntese proteica (revisado por Bonaldo e Sandri, 2013). Além da sinalização por Akt-Foxo,
596 outras vias estimulam a degradação de proteínas no músculo esquelético, como a resposta
597 inflamatória mediada principalmente pelo Nfkb (*nuclear factor kappa b*) e a ação da miostatina
598 (Mstn - *myostatin*), que também culminam com a ativação do Murf e Mafbx (revisado por
599 Bonaldo e Sandri, 2013).

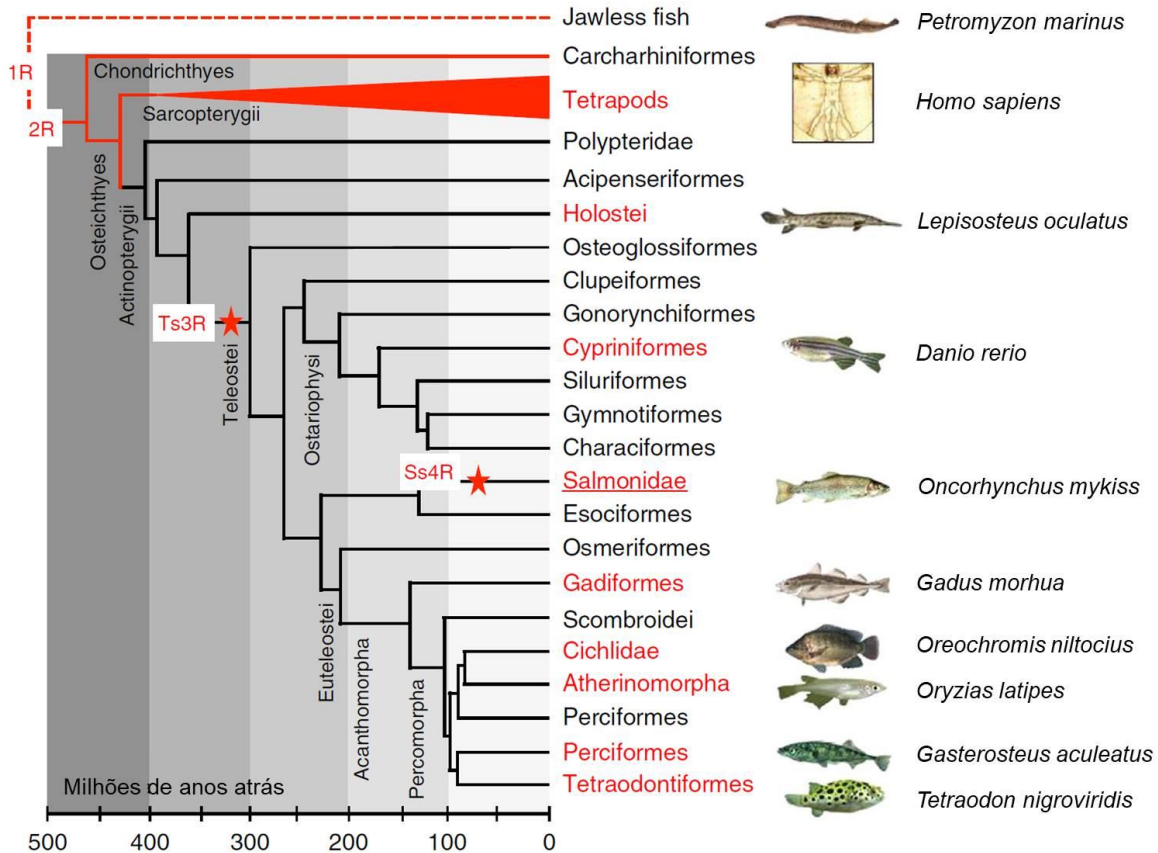
600 Ainda dentro desse contexto, um modelo experimental muito utilizado para o estudo do
601 crescimento muscular em peixes é o de jejum e realimentação (*fasting-refeeding*) (Johnston et
602 al., 2011). Após esses tratamentos o crescimento do animal ocorre com mais rapidez em
603 comparação a peixes que são continuamente alimentados, um fenômeno conhecido por
604 crescimento compensatório (Nikki et al., 2004). Dessa forma, os experimentos de jejum e
605 realimentação são comumente utilizados para manipular a taxa de crescimento dos peixes, um

606 parâmetro cujas variações são decorrentes, principalmente, de alterações no crescimento e
607 fenótipo do músculo esquelético. O período de jejum está diretamente relacionado a uma maior
608 degradação de proteínas musculares, enquanto que a realimentação desencadeia uma síntese
609 proteica mais exacerbada (Bower et al., 2009).

610

611 **1.5. Duplicação do genoma**

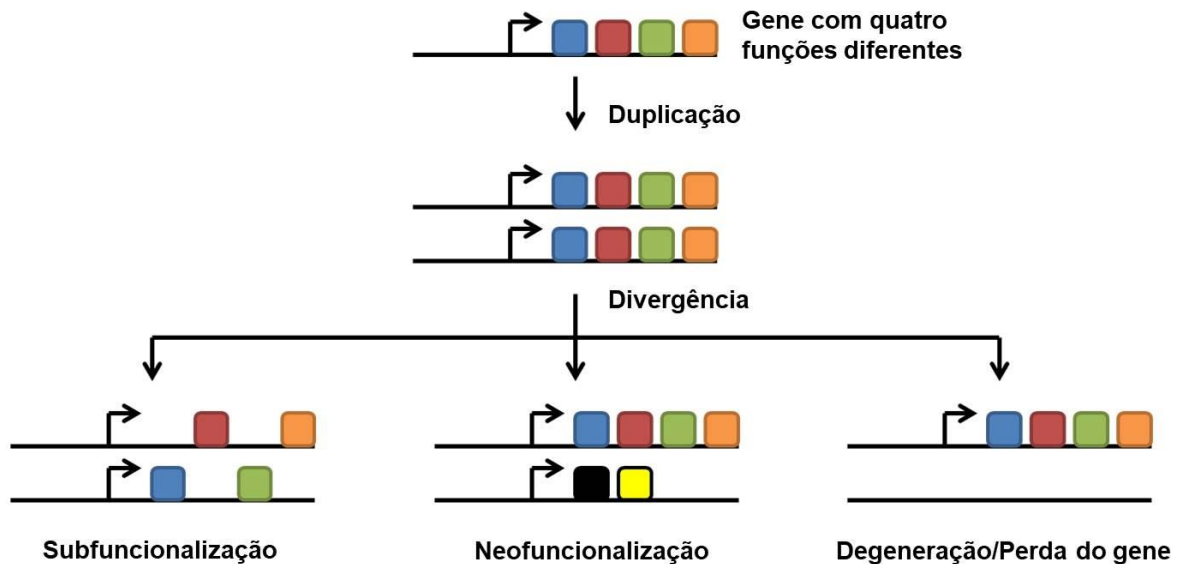
612 Em peixes, as vias de sinalização que regulam o crescimento do músculo esquelético
613 tiveram uma expansão de seu número de componentes moleculares quando comparada a outros
614 vertebrados, devido a um evento de duplicação total do genoma (WGD - *whole genome*
615 *duplication*). As WGDs apesar de raras são eventos dramáticos que resultam na duplicação
616 súbita da sequência completa do genoma, que moldaram profundamente a evolução dos
617 vertebrados e representam marcos evolutivos a partir dos quais algumas linhagens se
618 diversificaram (Berthelot et al., 2014; revisado por Glasauer e Neuhauss, 2014). Dessa forma, a
619 WGD tem uma importância crucial para os genomas dos vertebrados, pois fornece matérias-
620 primas nas quais a seleção natural pode agir para promover radiações adaptativas e inovações
621 evolutivas (Taylor et al., 2003). Estima-se que há 333-225 milhões de anos, o genoma ancestral
622 de todos os peixes teleósteos sofreu um evento de WGD específico, denominado *teleost-specific*
623 *3rd WGD* (Ts3R), precedido de outros dois eventos de WGD mais antigos comuns a todos
624 vertebrados (Jaillon et al., 2004; Dehal e Boore, 2005). Nesse contexto, os salmonídeos possuem
625 um interesse particular devido a um evento adicional e relativamente recente de WGD, estimado
626 há 100-25 milhões de anos, denominado *salmonid-specific 4th WGD* (Ss4R) (Berthelot et al.,
627 2014) (Figura 12). Vários trabalhos avaliaram os efeitos da Ss4R no músculo esquelético,
628 descrevendo a expansão de diversas famílias de genes (Macqueen et al., 2010; Garcia de la
629 serrana e Johnston, 2013; Macqueen et al., 2013) e como eles são diferencialmente regulados
630 durante o desenvolvimento das células musculares (Bower e Johnston, 2010a; Bower e Johnston,
631 2010b; Garcia de la serrana e Johnston, 2013; García de la serrana et al., 2014a).



632
633 **Figura 12:** História evolutiva e duplicação total do genoma em peixes. As estrelas vermelhas
634 indicam a posição evolutiva da duplicação do genoma específica de teleósteos (Ts3R) e
635 específica dos salmonídeos (Ss4R), que expandiram o número de componentes moleculares que
636 regulam o crescimento do músculo esquelético (adaptado de Berthelot et al., 2014).

637
638 Após a WGD ocorre a perda de muitas cópias de genes redundantes, num processo
639 conhecido como fracionamento gênico. Entretanto, cerca de 15 a 21% dos genes duplicados
640 (genes parálogos) derivados do Ts3R foram retidos através de mecanismos de
641 subfuncionalização e/ou neofuncionalização (Garcia de la serrana et al., 2014b). Durante a
642 subfuncionalização cada gene parálogo adquire parte da função original do gene ancestral,
643 culminando muitas vezes em uma regulação compartilhada de determinado processo biológico.
644 Na neofuncionalização os parálogos adquirem uma função diferente do gene ancestral, o que
645 pode conferir uma vantagem adaptativa (Maere e Van de Peer, 2010) (Figura 13). Essas funções
646 divergentes têm sido investigadas em diversas famílias de proteínas, como Igfbps e Akirins, que
647 sofreram uma expansão após retenção diferencial decorrente da Ts3R e Ss4R (Macqueen et al.,
648 2010; Macqueen et al., 2013). Através dos mecanismos de subfuncionalização e

649 neofuncionalização, a WGD promove um aumento da complexidade dos organismos, podendo
650 contribuir para uma maior diversidade biológica.



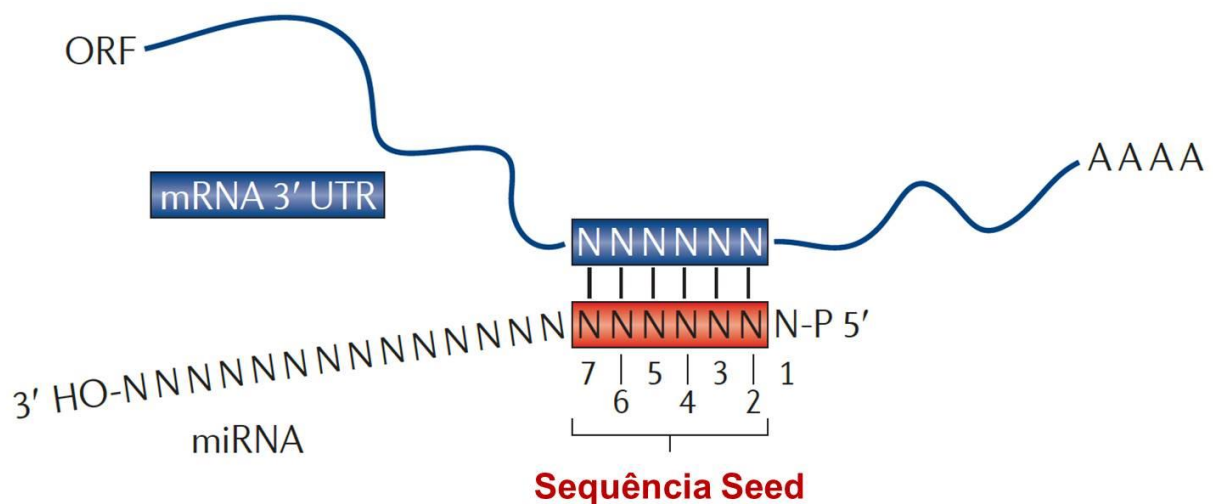
651 **Figura 13:** Esquema indicando os mecanismos que sucedem um evento de duplicação do
652 genoma; subfuncionalização (cópias com função compartilhada), neofuncionalização (cópia com
653 nova função) ou perda do gene.
654 (adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_redundancy).

655
656
657 Além disso, estudos recentes mostraram diferenças na retenção de genes parálogos entre
658 as superordens de teleósteos Ostariophysi, a qual pertencem o zebrafish e o pacu, e
659 Acanthopterygii, a qual pertence a tilápia do Nilo. Garcia de la serrana et al. (2014b) mostraram
660 que 510 e 418 parálogos, que surgiram após o Ts3R, foram diferencialmente retidos nas
661 superordens Ostariophysi e Acanthopterygii, respectivamente, indicando a existência de
662 parálogos linhagem-específicos (LSPs - *lineage specific paralogues*) (Garcia de la serrana et al.,
663 2014b). Essa retenção diferencial sugere que os LSPs possam ter sofrido diferentes mecanismos
664 de subfuncionalização e/ou neofuncionalização durante o processo evolutivo das superordens.
665 Muitos deles são componentes essenciais nas vias de miogênese, síntese e degradação proteica
666 no músculo esquelético (Garcia de la serrana et al., 2014b), e alguns trabalhos sugerem que esses
667 genes parálogos apresentam diferentes padrões de expressão (Mareco et al., 2015). No entanto,
668 apesar dos avanços realizados na identificação dos LSPs, os seus papéis fisiológicos
669 permanecem desconhecidos na maioria dos casos e muitos pesquisadores não abordam essa
670 temática em suas investigações.

671

672 **1.6. microRNAs**

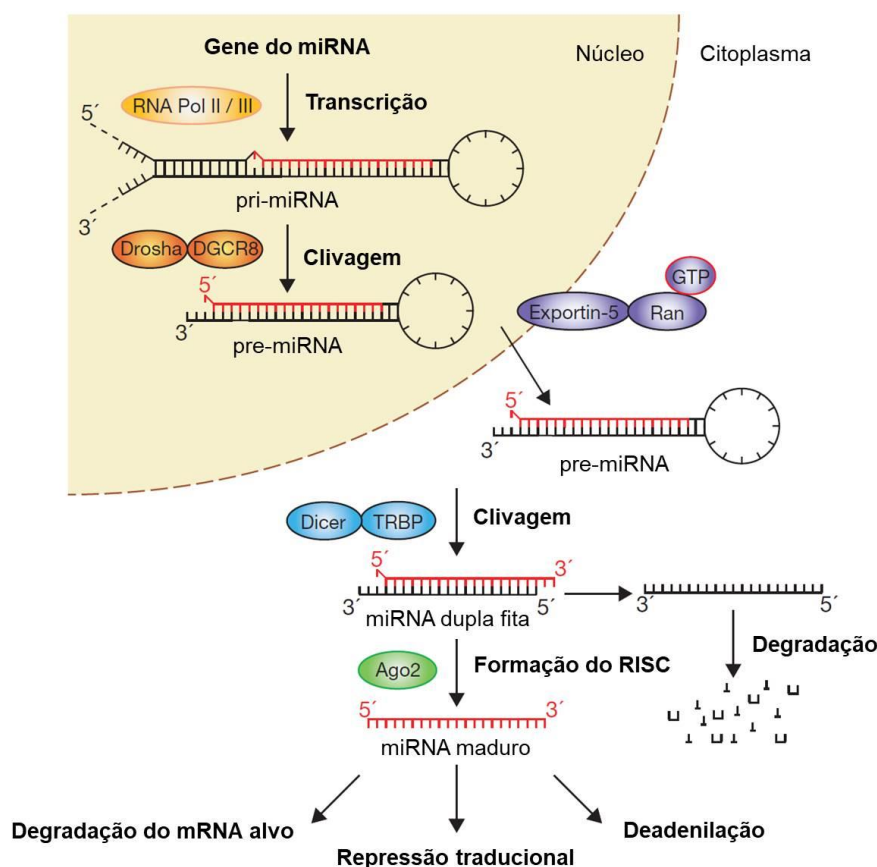
673 Atualmente é consenso que a propagação da informação genética é muito mais complexa
674 que aquela definida pelo dogma central da biologia molecular, no qual o DNA promove a síntese
675 do RNA que vai ser traduzido em uma proteína. Existem diversos outros mecanismos envolvidos
676 no controle do metabolismo celular e definição do fenótipo, como a metilação do DNA, a
677 modificação de histonas e a regulação por RNAs não codificantes (Chuang e Jones, 2007).
678 Dentre os RNAs não codificantes destacam-se os microRNAs (miRNAs), uma classe de
679 pequenos RNAs regulatórios que apresentam um importante papel nos mais diversos processos
680 biológicos de um organismo, inclusive no desenvolvimento e crescimento muscular (revisado
681 por Ge e Chen, 2011; revisado por Bizuayehu e Babiak, 2014). A função principal dos miRNAs
682 é a regulação pós-transcricional de genes, promovida pela inibição traducional ou degradação de
683 RNAs mensageiro (mRNAs) (Bartel e Chen, 2004; revisado por Filipowicz et al., 2008; revisado
684 por Ge e Chen, 2011). Na maioria dos casos, essa repressão se dá através de complementaridade
685 de bases entre os nucleotídeos 2 a 7 da região 5' do miRNA, conhecidos como sequência *seed*, e
686 a região 3' não traduzida (3'UTR - 3' untranslated region) dos mRNAs alvo (Williams et al.,
687 2009) (Figura 14).



688 **Figura 14:** Complementaridade de bases entre miRNA e seu mRNA alvo. A complementaridade
689 geralmente ocorre através da ligação entre os nucleotídeos 2 a 7 da região 5' do miRNA
690 (sequência *seed*) e a região 3'UTR do mRNA alvo. Essa ligação é determinante no
691 reconhecimento do alvo e suficiente para desencadear o silenciamento. ORF: open reading
692 frame; 3'UTR (3' untranslated region) (adaptado de Huntzinger e Izaurralde, 2011).
693

694

695 Com relação à biogênese, os genes de miRNAs são sintetizados no núcleo como longos
696 transcritos primários, denominados pri-miRNAs, principalmente pela ação da RNA polimerase
697 II. Os pri-miRNAs podem codificar um ou mais miRNAs, e são posteriormente processados pela
698 enzima nuclear Drosha (*drosha ribonuclease III*) (Lee et al., 2003) gerando uma estrutura em
699 *hairpin* com sequência de aproximadamente 70 nucleotídeos, conhecida como miRNA precursor
700 (pre-miRNA). Os pre-miRNAs são então transportados ao citoplasma pela Exportin-5, onde
701 serão processados pela enzima Dicer (*dicer ribonuclease III*) em um miRNA dupla-fita (*duplex*)
702 com aproximadamente 22 nucleotídeos (revisado por Winter et al., 2009; revisado por Ge e
703 Chen, 2011). Em seguida, apenas uma única fita do duplex de miRNA é incorporada a proteínas
704 da família Ago (*argonaute, risc catalytic component*) para formar um complexo de
705 silenciamento induzido por RNA (RISC - *RNA-induced silencing complex*), que associa-se com
706 o sítio de complementaridade do mRNA alvo e promove sua repressão (revisado por Winter et
707 al., 2009; revisado por Bizuayehu e Babiak, 2014). A outra fita do *duplex* é degradada ou pode
708 associar-se a um novo RISC para a regulação de outro mRNA alvo (Figura 15).
709



710
711 **Figura 15:** Biogênese dos miRNAs. A via de regulação do miRNA tem início com a transcrição
712 do gene em pri-miRNA e seu processamento em pre-miRNA no interior do núcleo. O pre-

713 miRNA é transportado ao citoplasma e clivado para produção de um miRNA de dupla fita. A fita
714 funcional é incorporada num complexo de silenciamento, que vai se ligar ao mRNA alvo e
715 promover sua degradação, repressão traducional ou deadenilação (adaptado de Winter et al.,
716 2009).

717
718 Os miRNAs exercem os efeitos em seus alvos num padrão combinatório, o que aumenta a
719 complexidade e potencial regulatório da expressão gênica. Um único miRNA pode ter diversos
720 mRNAs alvo e, da mesma forma, mRNAs individuais podem ser regulados por diferentes
721 miRNAs (revisado por van Rooij et al., 2008; Guo et al., 2010). Assim, a maioria dos miRNAs
722 promove uma regulação refinada e orquestrada de vias de sinalização e funções biológicas
723 comuns (revisado por van Rooij et al., 2008; revisado por Goljanek-Whysall et al., 2012).

724 Análises filogenéticas revelam a existência de uma alta conservação dos miRNAs entre
725 os vertebrados, e sugerem uma correlação positiva entre o número de genes de miRNAs e a
726 complexidade do organismo (Sempere et al., 2006; Lee et al., 2007). Estudos têm mostrado que
727 em mamíferos mais de 60% dos mRNAs tem sítios conservados de ligação a miRNAs (Friedman
728 et al., 2009; Guo et al., 2010) e, baseado nessa conservação de miRNAs em vertebrados, pode-se
729 prever que um conjunto considerável de mRNAs é modulado por miRNAs também em peixes
730 teleósteos (revisado por Bizuayehu e Babiak, 2014). Além disso, a extensão da participação dos
731 miRNAs regulando vias moleculares nos peixes pode ser ainda maior e mais complexa devido a
732 WGD, e Berthelot et al. (2014) mostrou que os genes de miRNAs foram quase todos retidos
733 como cópias duplicadas em contraste com genes codificantes de proteínas (Berthelot et al.,
734 2014).

735 Os miRNAs em peixes estão envolvidos na embriogênese, desenvolvimento e em
736 diversos processos fisiológicos de diferentes tecidos (Wienholds et al., 2005; Giraldez et al.,
737 2006; Yin et al., 2008; Staton et al., 2011; Biyashev et al., 2012; Flynt et al., 2009; Huang et al.,
738 2012; Yan et al., 2012b; Yin et al., 2012). Tanto a formação quanto o crescimento muscular são
739 profundamente regulados por vários miRNAs, e alguns deles são classificados como músculo-
740 específicos devido à sua expressão específica ou alta nos músculos cardíacos e/ou esqueléticos,
741 especialmente o miR-1, miR-133, miR-206 e miR-499. Esses miRNAs participam em processos
742 como miogênese, proliferação de mioblastos e diferenciação em miotubos, especificação de tipos
743 de fibras e regeneração muscular (Chen et al., 2006; van Rooij et al., 2009; Chen et al., 2010;
744 revisado por Ge e Chen, 2011; McCarthy, 2011), orquestrando o destino e fenótipo das células
745 musculares.

746 Com relação ao envolvimento de miRNAs no crescimento muscular, ambos miR-1 e
747 miR-133 influenciam os padrões de expressão gênica durante a embriogênese muscular no
748 zebrafish, regulando a organização da actina nos sarcômeros (Mishima et al., 2009). Um possível
749 papel do miR-206 estimulando a diferenciação dos mioblastos foi mostrado por Duran et al.
750 (2015) nos músculos de contração rápida e lenta do pacu, devido à correlação inversa entre os
751 níveis de expressão de miR-206 e *pax7* (Duran et al., 2015), e Yan et al. (2013) mostraram na
752 tilápia do Nilo que o miR-203b regula diretamente a *myod* (Yan et al., 2013). De modo similar,
753 análises moleculares revelaram que os níveis de expressão de miR-1, miR-133 e miR-206
754 aumentaram conforme o crescimento muscular em diferentes estágios de desenvolvimento do
755 pacu (Duran et al., 2015), carpa (Yan et al., 2012a) e tilápia do Nilo (Yan et al., 2012c;
756 Nachtigall et al., 2015). Em outro estudo, Huang et al. (2012) identificaram diferenças na
757 expressão de miRNAs envolvidos na sinalização por Gh/Igf1 entre o músculo esquelético de
758 tilápias do Nilo com crescimento rápido e normal, com miRNAs *down* e *upregulated* que podem
759 servir como marcadores moleculares em programas de melhoramento de peixes (Huang et al.,
760 2012). Além disso, foram identificados vários miRNAs que regulam as alterações do fenótipo
761 hiperplásico para o hipertrófico no músculo esquelético de zebrafish, fornecendo evidências para
762 o envolvimento de miRNAs nas transições do crescimento muscular (Johnston et al., 2009).

763 Além do crescimento do músculo, os miRNAs também estão envolvidos com a definição
764 dos tipos de fibras e fenótipo muscular, especialmente o miR-499. Wang et al. (2011) mostraram
765 que o miR-499 é responsável por reprimir a tradução do *sox6* (*sry (sex determining region Y) box*
766 *6*) em fibras de contração lenta no zebrafish (Wang et al., 2011), resultados corroborados por
767 análises também em tilápias do Nilo (Nachtigall et al., 2015). O Sox6 é um ativador
768 transcricional que exerce um papel chave na manutenção do fenótipo *fast* nas fibras musculares,
769 reprimindo genes *slow*-específicos como *smyhc1* (*slow myosin heavy chain 1*) e *stnnc* (*slow-*
770 *specific troponin c*) (von Hofsten et al., 2008). Duran et al. (2015) observaram um aumento na
771 expressão do miR-499 no músculo de contração lenta de juvenis e adultos de pacus, enquanto os
772 transcritos de *sox6* tiveram maior expressão nas fibras de contração rápida, também em ambos os
773 estágios de desenvolvimento. Além disso, o aumento na expressão de *sox6* acompanhou o
774 crescimento do músculo *fast*, como resultado dos menores níveis de miR-499 conforme as fibras
775 se diferenciavam e amadureciam (Duran et al., 2015). Em conjunto, esses estudos indicam o
776 envolvimento do miR-499 na especificação de manutenção do fenótipo *slow* nas fibras
777 musculares, mecanismo conservado entre os vertebrados (Wang et al., 2011).

778

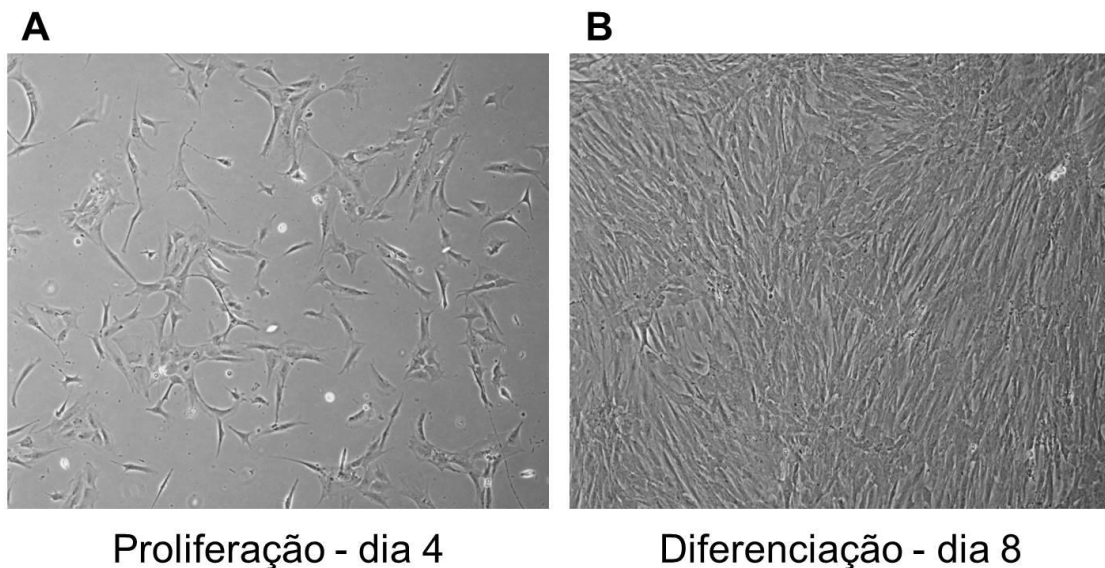
779 1.7. Cultura celular primária de mioblastos

780 A cultura celular é uma técnica *in vitro* que permite a manutenção e estudo de células
781 fora do corpo do organismo original (Junqueira e Carneiro, 2008). As culturas de células
782 permitiram um grande avanço em muitas aplicações médicas, como no desenvolvimento de
783 vacinas, ensaios de drogas e terapias gênicas, e uma expansão muito grande do conhecimento
784 acerca de mecanismos moleculares e vias de sinalização relacionados aos mais diversos
785 processos biológicos (Freshney, 2010). Esses progressos decorrem principalmente da utilização
786 de linhagens celulares, ou seja, células com alterações genéticas ocasionadas por substâncias
787 químicas, vírus ou agentes físicos, cuja proliferação muito acentuada permite que sejam
788 propagadas por longos períodos de tempo (Alves e Guimarães, 2010; Freshney, 2010).

789 A linhagem celular C2C12 é constituída de mioblastos provenientes de camundongo
790 (*Mus musculus*), sendo amplamente utilizada para a compreensão da regulação do crescimento e
791 desenvolvimento muscular (Yaffe e Saxel, 1977). Para peixes, no entanto, é mais recomendada a
792 utilização de culturas celulares provenientes especificamente de espécies de peixes, devido à
793 grande "distância" evolutiva entre mamíferos e estes animais, apesar da enorme quantidade de
794 conhecimento adquirido a partir das células C2C12. Ainda não foram obtidas linhagens de
795 células musculares provenientes de peixes e, portanto, para estudos relacionados ao músculo
796 esquelético desses animais é necessário o estabelecimento de culturas celulares primárias de
797 mioblastos (revisado por Johnston et al., 2011). As culturas primárias são aquelas preparadas
798 diretamente do tecido de interesse, possuindo as mesmas características celulares, de modo que a
799 cultura primária é o procedimento mais semelhante a estudos *in vivo*. No entanto, os ensaios em
800 culturas celulares primárias devem ser realizados com rapidez, pois as células primárias
801 conseguem manter suas características originais apenas por um curto período de tempo, antes de
802 entrarem em apoptose (Freshney, 2010).

803 As culturas de mioblastos de peixes recapitulam as principais etapas da miogênese, com
804 uma fase inicial de células precursoras miogênicas quiescentes e comprometimento dos
805 mioblastos, proliferação e migração dos mioblastos, diferenciação e fusão em miotubos, e
806 maturação das fibras musculares (Gabillard et al., 2010b; Vélez et al., 2016) (Figura 16). Além
807 disso, as culturas de mioblastos fornecem um ambiente com um menor número de variáveis
808 daquelas encontradas no músculo esquelético *in vivo*, permitindo as análises de diversas vias de
809 sinalização sob condições controladas. Isso possibilita um estudo mais aprofundado de
810 moléculas regulatórias e a investigação de seus papéis nos diferentes estágios da cultura,
811 especialmente através de ensaio de ganho (superexpressão, miméticos) e perda (*knockout*,

812 *knockdown*, antagonistas) de função (revisado por Johnston et al., 2011). Da mesma forma, os
813 meios de cultivo dos mioblastos podem ser modificados para o teste de hipóteses relacionadas ao
814 papel de nutrientes, fatores de crescimento, hormônios, drogas e temperatura na regulação do
815 processo de crescimento muscular (Castillo et al., 2004; Bower and Johnston, 2010b; Gabillard
816 et al., 2010a; Seilliez et al., 2012; Garcia de la serrana and Johnston, 2013; Vélez et al., 2014),
817 assim como muitos outros ensaios manipulativos e farmacológicos.



818
819 **Figura 16:** Culturas celulares primárias de mioblastos isolados da musculatura de contração
820 rápida do pacu. (A) Mioblastos no dia 4 de cultura, em período de proliferação. (B) Mioblastos
821 no dia 8 de cultura, em período de diferenciação e fusão em miotubos (imagens de autoria
822 própria).

823
824 Froehlich et al. (2013) avaliaram marcadores moleculares da miogênese *in vivo* de peixes
825 em cultura celular de mioblastos de *giant danio* (*Devario aequipinnatus*). Eles observaram que
826 enquanto Pax7 e Myf5 são mais expressos em células precursoras miogênicas recém-ativadas, e
827 Myog é expressa principalmente em miotubos, a expressão de Pax3, Myod e Mstn ocorre em
828 todos os estágios da cultura celular (Froehlich et al., 2013). Células musculares de salmão do
829 Atlântico foram utilizadas para determinar a expressão gênica de parálogos de *myod* durante o
830 desenvolvimento da cultura celular, com *myod1b* e *myod1c* mais relacionadas à proliferação e
831 *myod1a* mais relacionada à diferenciação, comprovando a existência do mecanismo de
832 subfuncionalização da Myod após o WGD (Bower e Johnston, 2010a). Em um experimento
833 interessante, Gabillard et al. (2010a) produziram trutas arco-íris transgênicas que carregavam

834 *green fluorescent protein* (GFP) sob o controle do promotor de cadeia leve de miosina *fast*, para
835 monitorar a diferenciação de mioblastos *in vitro* (Gabillard et al., 2010a). Os mioblastos
836 extraídos desses peixes transgênicos expressavam GFP assim que os mioblastos iniciavam os
837 mecanismos de fusão e diferenciação, durante a formação de miotubos, consolidando um sistema
838 *in vitro* de monitoramento em tempo real que permite inúmeras aplicações no crescimento
839 muscular de peixes. Além disso, os autores mostraram que a temperatura, um fator ambiental
840 crucial para o crescimento muscular, diretamente influencia a diferenciação e fusão de células
841 miogênicas (Gabillard et al., 2010a).

842 Diferentes estudos usaram culturas celulares de mioblastos de peixes para examinar as
843 vias anabólicas relacionadas ao crescimento muscular, especialmente a sinalização por Ins
844 (*insulin*), Igf e Mtor (Castillo et al., 2006; Díaz et al., 2009; Seiliez et al., 2008; Bower and
845 Johnston, 2010b; Cleveland e Weber, 2010; Vélez et al., 2014). Díaz et al. (2009) detectaram um
846 aumento gradual na expressão de *glut4* (*insulin-responsive glucose transporter type 4*) ao longo
847 da diferenciação de células musculares da truta arco-íris, e ambos mioblastos e miotubos tiveram
848 aumento de *glut4* após o tratamento com Ins e Igf1 (Díaz et al., 2009). Além disso, a
849 suplementação de Igf1 e Ins para miócitos de truta promoveu um aumento da síntese proteica
850 (13% para ambos os fatores de crescimento) e diminuição da proteólise (14% e 17%,
851 respectivamente), enquanto a administração de leucina apenas reduziu a degradação proteica
852 (8%) (Cleveland e Weber, 2010). O efeito sinérgico da combinação de tratamentos com fatores
853 de crescimento também é algo sempre avaliado em estudos de cultura celulares de mioblastos de
854 peixes. De fato, a combinação do tratamento com Igf1 e aminoácidos em células musculares “em
855 jejum” de salmão do Atlântico levou a um enorme aumento de transcritos de *igf1*, indicando um
856 possível mecanismo de feedback positivo na produção de Igf1 (Bower e Johnston, 2010b). Além
857 disso, alguns trabalhos anteriores mostraram que a síntese proteica induzida por Igf ocorre
858 apenas se os aminoácidos também estiverem presentes nos meios de cultivo (Bower e Johnston,
859 2010b; Garcia de la serrana e Johnston, 2013), enquanto os aminoácidos por si só são capazes de
860 estimular as vias de síntese de proteínas em células musculares de peixes (Seiliez et al., 2008;
861 Vélez et al., 2014).

862 A regulação da miogênese e do crescimento muscular por miRNAs músculo-específicos
863 também foram investigadas usando sistemas *in vitro*. Duran et al. (2015) usaram culturas
864 celulares de mioblastos de pacu para complementar análises *in vivo* da expressão de miR-1, miR-
865 133 e miR-206 em ambos músculos de contração rápida e lenta (Duran et al., 2015). Assim como
866 nas amostras de músculo esquelético, as culturas celulares também mostraram uma correlação

867 inversa entre os miRNAs e a expressão de seus alvos, corroborando os papéis do miR-1 e miR-
868 206 na diferenciação dos mioblastos. No entanto, as análises *in vitro* forneceram mais
869 informações sobre como o miR-133a e o miR-133b regulam a proliferação e diferenciação de
870 mioblastos, provando seu uso como uma maneira de expandir nosso conhecimento sobre os
871 mecanismos moleculares que regulam o crescimento muscular (Johnston et al., 2011; Duran et
872 al., 2015).

873 Outro aspecto importante deriva da compartimentalização do músculo esquelético em
874 peixes, que permite o estabelecimento de culturas celulares de mioblastos individuais a partir dos
875 músculos de contração rápida e lenta. Certos processos como o desenvolvimento, metabolismo e
876 determinação dos tipos de fibra são bastante diferentes de acordo com o tipo de músculo, e tais
877 estudos poderiam ser abordados nessas diferentes culturas celulares de mioblastos. Este estudo
878 separado dos tipos musculares é praticamente impossível em mamíferos, devido ao padrão em
879 mosaico do músculo esquelético com fibras rápidas e lentas co-localizadas (revisado por
880 Schiaffino e Reggiani, 2011), tornando os peixes modelos ideais para este tipo de pesquisa. Para
881 isso, é necessário o uso de peixes que apresentem crescimento somático indeterminado e,
882 consequentemente, grande aumento de massa muscular (Rowlerson e Veggetti, 2001), pois em
883 peixes de pequeno tamanho é quase impossível o isolamento de mioblastos suficientes de
884 músculos *fast* e *slow*, restringindo os estudos com culturas celulares de mioblastos (Froehlich et
885 al., 2013). No entanto, os trabalhos publicados até agora apenas desenvolveram culturas
886 celulares de mioblastos de peixes provenientes da musculatura de contração rápida.

887

888 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

889 Estudos que visem esclarecer os mecanismos moleculares e celulares envolvidos com a
890 miogênese e o crescimento muscular de peixes permitem o desenvolvimento de um quadro
891 teórico que pode contribuir para a elaboração de novas estratégias de criação e para a obtenção
892 de melhorias na piscicultura intensiva. As culturas celulares primárias de mioblastos são
893 extremamente importantes nesse contexto, pois configuram ferramentas muito úteis para
894 investigar a regulação da miogênese e alterações na celularidade do músculo esquelético,
895 mecanismos diretamente relacionados ao aumento de massa muscular e qualidade de carne, além
896 de fornecerem informações de referência para a pesquisa em outras espécies de peixes.

897 Além disso, o uso das culturas celulares de mioblastos de peixes possibilita descobertas e
898 uma maior compreensão das particularidades e dos mecanismos que regulam a biologia

899 molecular, celular e fisiologia do músculo esquelético, gerando conhecimento básico sobre esse
900 tecido biológico tão fundamental para um grupo tão diverso e importante como os peixes.

901

902 **3. OBJETIVOS**

903

904 **3.1. Objetivo geral**

905 O objetivo de nosso trabalho foi utilizar culturas celulares primárias de mioblastos de
906 peixes para investigar diferentes aspectos do crescimento do músculo esquelético, fornecendo
907 novas informações quanto aos mecanismos moleculares e celulares que regulam o tecido
908 muscular nesses animais.

909

910 **3.2. Objetivos específicos (separados conforme os capítulos)**

911

912 **Capítulo I: Ascorbic acid stimulates the *in vitro* myoblast proliferation and migration of** 913 ***pacu* (*Piaractus mesopotamicus*).**

914 - Estabelecer culturas celulares primárias de mioblastos provenientes do músculo de
915 contração rápida (mioblastos *fast*) de pacus;

916 - Avaliar os efeitos da suplementação de ácido ascórbico e/ou menadiona (oxidante) na
917 proliferação dos mioblastos;

918 - Avaliar os efeitos da suplementação de ácido ascórbico e/ou menadiona (oxidante) na
919 migração dos mioblastos;

920 - Verificar a atividade de enzimas antioxidantes após suplementação de ácido ascórbico
921 nos mioblastos;

922 - Verificar a expressão gênica de marcadores moleculares de miogênese, síntese e
923 degradação proteica após suplementação de ácido ascórbico nos mioblastos.

924

925 **Capítulo II: Rainbow trout slow myoblast cell culture as a model to study slow skeletal** 926 **muscle and the characterization of mir-133 and mir-499 families as a case study.**

927 - Estabelecer e padronizar culturas celulares primárias de mioblastos provenientes do
928 músculo de contração lenta (mioblastos *slow*) de trutas arco-íris;

929 - Verificar a expressão gênica de marcadores moleculares específicos para confirmação
930 do fenótipo e metabolismo dos mioblastos *slow*;

1213 Os níveis de expressão dos mRNAs foram detectados por PCR em tempo real, através da
1214 plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA).
1215 Todas as análises estavam em conformidade com as diretrizes do *Minimum Information for*
1216 *Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments* (MIQE) (Bustin et al., 2009). As
1217 amostras de cDNA foram amplificadas utilizando-se o *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega,
1218 USA) e primers sintetizados pela Invitrogen (USA). Os primers foram diluídos em *UltraPure™*
1219 *Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific, USA) e suas concentrações
1220 ajustadas para 5 µM. Conforme instruções do fabricante, foram utilizados 8 µL de cDNA diluído
1221 (1:20), 1.5 µL de *Primer Forward*, 1.5 µL de *Primer Reverse* e 4 µL de *GoTaq® qPCR Master*
1222 *Mix* (Promega, USA), totalizando um volume final de 15 µL de solução. As reações foram
1223 realizadas em duplicata, nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de
1224 desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Foi feita a
1225 análise da Curva de Dissociação dos fragmentos ao término de cada reação de PCR, um passo de
1226 20 minutos em que a temperatura da reação aumenta gradualmente de 60 para 95°C,
1227 possibilitando a avaliação da especificidade de amplificação de cada conjunto de primers pela
1228 presença de um único pico de fluorescência. A eficiência de reação foi calculada pelo software
1229 *LinRegPCR* (Ramakers et al., 2003).

1230 A quantificação relativa da expressão foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e
1231 Schmittgen, 2001), utilizando o software *DataAssist™ v3.01* (Thermo Fisher Scientific, USA).
1232 As expressões foram normalizadas pelos genes cujos valores de expressão foram constantes
1233 entre todas as amostras utilizadas.

1234

1235 5. REFERÊNCIAS GERAIS

1236

- 1237 **Aguiar, D. H., Barros, M. M., Padovani, C. R., Pezzato, L. E. and Dal Pai-Silva, M.** (2005). Growth
1238 characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. *J.*
1239 *Fish Biol.* **67**, 1287–1298.
- 1240 **Almeida, F. L. A., Pessotti, N. S., Pinhal, D., Padovani, C. R., Leitão, N. de J., Carvalho, R. F., Martins, C.,**
1241 **Portella, M. C. and Dal Pai-Silva, M.** (2010). Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD
1242 and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron* **41**, 997–1004.
- 1243 **Alves, E. A. and Guimarães, A. C. R.** (2010). Cultivo celular. In *Conceitos e métodos para formação de*
1244 *profissionais em laboratórios de saúde* (ed. Molinaro, E.), Caputo, L.), and Amendoeira, R.), p. 254. Rio de
1245 Janeiro: Editora da EPSJV - Fiocruz.
- 1246 **Barets, A.** (1961). Contributions to the study of "slow" and fast motor systems in the lateral muscle of teleosts.
1247 *Arch. Anat. microsc. Morph. Exp.* **50**(1), 1-187.
- 1248 **Bartel, D. P. and Chen, C.-Z.** (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of
1249 metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 396–400.
- 1250 **Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie,**
1251 **K., Alberti, A., et al.** (2014). The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-

- 1252 genome duplication in vertebrates. *Nat. Commun.* **5**, 3657.
- 1253 **Biga, P. R. and Goetz, F. W.** (2006). Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs.
1254 indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **291**,
1255 R1327–R1337.
- 1256 **Biyashev, D., Veliceasa, D., Topczewski, J., Topczewska, J. M., Mizgirev, I., Vinokour, E., Reddi, A. L., Licht,**
1257 **J. D., Revskoy, S. Y. and Volpert, O. V.** (2012). miR-27b controls venous specification and tip cell fate.
1258 *Blood* **119**, 2679–2687.
- 1259 **Bizuayehu, T. T. and Babiak, I.** (2014). MicroRNA in Teleost Fish. *Genome Biol. Evol.* **6**, 1911–1937.
- 1260 **Blaauw, B., Schiaffino, S. and Reggiani, C.** (2013). Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Phenotype. *Compr.*
1261 *Physiol.* **3**, 1645–1687.
- 1262 **Bonaldo, P. and Sandri, M.** (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* **6**,
1263 25–39.
- 1264 **Bower, N. I., Taylor, R. G. and Johnston, I. A.** (2009). Phasing of muscle gene expression with fasting-induced
1265 recovery growth in Atlantic salmon. *Front. Zool.* **6**, 18.
- 1266 **Bower, N. I. and Johnston, I. A.** (2010a). Paralogs of Atlantic salmon myoblast determination factor genes are
1267 distinctly regulated in proliferating and differentiating myogenic cells. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**,
1268 R1615–R1626.
- 1269 **Bower, N. I. and Johnston, I. A.** (2010b). Transcriptional Regulation of the IGF Signaling Pathway by Amino
1270 Acids and Insulin-Like Growth Factors during Myogenesis in Atlantic Salmon. *PLoS One* **5**, e11100.
- 1271 **Buckingham, M. and Rigby, P. W. J.** (2014). Gene Regulatory Networks and Transcriptional Mechanisms that
1272 Control Myogenesis. *Dev. Cell* **28**, 225–238.
- 1273 **Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl,**
1274 **M. W., Shipley, G. L., et al.** (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of
1275 Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622.
- 1276 **Caiozzo, V. J., Baker, M. J., Huang, K., Chou, H., Wu, Y. Z. and Baldwin, K. M.** (2003). Single-fiber myosin
1277 heavy chain polymorphism: how many patterns and what proportions? *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.*
1278 **285**, R570–R580.
- 1279 **Castillo, J., Codina, M., Martínez, M. L., Navarro, I. and Gutiérrez, J.** (2004). Metabolic and mitogenic effects
1280 of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R935–
1281 R941.
- 1282 **Castillo, J., Ammendrup-Johnsen, I., Codina, M., Navarro, I. and Gutiérrez, J.** (2006). IGF-I and insulin
1283 receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1683–R1690.
- 1284 **Chen, J.-F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L. and Wang,**
1285 **D.-Z.** (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and
1286 differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228–33.
- 1287 **Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X. and Wang, D.-Z.** (2010). microRNA-1 and microRNA-
1288 206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.*
1289 **190**, 867–79.
- 1290 **Chuang, J. C. and Jones, P. A.** (2007). Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatr. Res.* **61**, 24R–29R.
- 1291 **Cleveland, B. M. and Weber, G. M.** (2010). Effects of insulin-like growth factor-I, insulin, and leucine on protein
1292 turnover and ubiquitin ligase expression in rainbow trout primary myocytes. *Am. J. Physiol. Integr. Comp.*
1293 *Physiol.* **298**, R341–R350.
- 1294 **Cleveland, B. M. and Radler, L. M.** (2019). Essential amino acids exhibit variable effects on protein degradation
1295 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*
1296 **229**, 33–39.
- 1297 **Currie, P. and Ingham, P.** (2001). Induction and Patterning of Embryonic Skeletal Muscle Cells in the Zebrafish.
1298 In *Muscle development and growth* (ed. Johnston, I. A.), pp. 1–17. San Diego: Academic Press.
- 1299 **Dehal, P. and Boore, J. L.** (2005). Two Rounds of Whole Genome Duplication in the Ancestral Vertebrate. *PLoS*
1300 *Biol.* **3**, e314.
- 1301 **Demetriades, C., Doumpas, N. and Teleman, A. A.** (2014). Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid
1302 Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2. *Cell* **156**, 786–799.
- 1303 **Díaz, M., Vraskou, Y., Gutiérrez, J. and Planas, J. V.** (2009). Expression of rainbow trout glucose transporters
1304 GLUT1 and GLUT4 during in vitro muscle cell differentiation and regulation by insulin and IGF-I. *Am. J.*
1305 *Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **296**, R794–R800.
- 1306 **Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D. and Rambaut, A.** (2012). Bayesian Phylogenetics with BEAUti and
1307 the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 1969–1973.
- 1308 **Duan, Y. H., Li, F. N., Li, Y. H., Tang, Y. L., Kong, X. F., Feng, Z. M., Anthony, T. G., Watford, M., Hou, Y.**
1309 **Q., Wu, G. Y., et al.** (2016). The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino*
1310 *Acids.* **48**, 41–51.

- 1311 **Duran, B. O. da S., Fernandez, G. J., Mareco, E. A., Moraes, L. N., Salomão, R. A. S., Gutierrez de Paula, T.,**
1312 **Santos, V. B., Carvalho, R. F. and Dal-Pai-Silva, M.** (2015). Differential microRNA Expression in Fast-
1313 and Slow-Twitch Skeletal Muscle of *Piaractus mesopotamicus* during Growth. *PLoS One* **10**, e0141967.
1314 **El-Sayed, A.-F. M.** (2006). *Tilapia culture*. CABI Pub.
1315 **FAO** (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*.
1316 **Fauconneau, B. and Paboeuf, G.** (2000). Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in
1317 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell. Tissue Res.* **301**, 459–63.
1318 **Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. and Sonenberg, N.** (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation
1319 by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–114.
1320 **Flynt, A. S., Thatcher, E. J., Burkewitz, K., Li, N., Liu, Y. and Patton, J. G.** (2009). *miR-8* microRNAs regulate
1321 the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *J. Cell Biol.* **185**, 115–127.
1322 **Freshney, R. I.** (2010). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. 6th ed.
1323 732p, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
1324 **Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. and Bartel, D. P.** (2009). Most mammalian mRNAs are conserved
1325 targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105.
1326 **Froehlich, J. M., Galt, N. J., Charging, M. J., Meyer, B. M. and Biga, P. R.** (2013). In vitro indeterminate teleost
1327 myogenesis appears to be dependent on Pax3. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **49**, 371–85.
1328 **Frontera, W. R. and Ochala, J.** (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.*
1329 **96**, 183-195.
1330 **Gabillard, J.-C., Rallièrè, C., Sabin, N. and Rescan, P.-Y.** (2010a). The production of fluorescent transgenic trout
1331 to study in vitro myogenic cell differentiation. *BMC Biotechnol.* **10**, 39.
1332 **Gabillard, J. C., Sabin, N. and Paboeuf, G.** (2010b). In vitro characterization of proliferation and differentiation
1333 of trout satellite cells. *Cell Tissue Res.* **342**, 471–7.
1334 **Garcia de la serrana, D. and Johnston, I. A.** (2013). Expression of Heat Shock Protein (Hsp90) Paralogues Is
1335 Regulated by Amino Acids in Skeletal Muscle of Atlantic Salmon. *PLoS One* **8**, e74295.
1336 **García de la serrana, D., Codina, M., Capilla, E., Jiménez-Amilburu, V., Navarro, I., Du, S.-J., Johnston, I. A.**
1337 **and Gutiérrez, J.** (2014a). Characterisation and expression of myogenesis regulatory factors during in vitro
1338 myoblast development and in vivo fasting in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol.*
1339 *Part A Mol. Integr. Physiol.* **167**, 90–99.
1340 **Garcia de la serrana, D., Mareco, E. A. and Johnston, I. A.** (2014b). Systematic Variation in the Pattern of Gene
1341 Paralog Retention between the Teleost Superorders Ostariophysi and Acanthopterygii. *Genome Biol. Evol.* **6**,
1342 981–987.
1343 **Garlick, P. J.** (2005). The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *J. Nutr.* **135**, 1553s–1556s.
1344 **Ge, Y. and Chen, J.** (2011). MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* **10**, 441–8.
1345 **Geeves, M. A.** (1999). Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687-728.
1346 **Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J. and Schier,**
1347 **A. F.** (2006). Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. *Science (80-)*.
1348 **312**, 75–79.
1349 **Glasauer, S. M. K. and Neuhauss, S. C. F.** (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its
1350 evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics* **289**, 1045–1060.
1351 **Glass, D. J.** (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**,
1352 1974–1984.
1353 **Goljanek-Whysall, K., Sweetman, D. and Münsterberg, A. E.** (2012). microRNAs in skeletal muscle
1354 differentiation and disease. *Clin. Sci.* **123**, 611–625.
1355 **Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. and Bartel, D. P.** (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to
1356 decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–40.
1357 **Halpern, M. E., Ho, R. K., Walker, C. and Kimmel, C. B.** (1993). Induction of muscle pioneers and floor plate is
1358 distinguished by the zebrafish no tail mutation. *Cell* **75**, 99–111.
1359 **Hawke, T. J. and Garry, D. J.** (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.*
1360 **91**, 534–551.
1361 **Hernández-Hernández, J. M., García-González, E. G., Brun, C. E. and Rudnicki, M. A.** (2017). The myogenic
1362 regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.*
1363 **72**, 10–18.
1364 **Huang, C. W., Li, Y. H., Hu, S. Y., Chi, J. R., Lin, G. H., Lin, C. C., Gong, H. Y., Chen, J. Y., Chen, R. H.,**
1365 **Chang, S. J., et al.** (2012). Differential expression patterns of growth-related microRNAs in the skeletal
1366 muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)1. *J. Anim. Sci.* **90**, 4266–4279.
1367 **Huntzinger, E. and Izaurralde, E.** (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression
1368 and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 99–110.
1369 **IBGE** (2016). *Produção da pecuária municipal*. volume 43. Rio de Janeiro: IBGE.

- 1370 **Jaillon, O., Aury, J.-M., Brunet, F., Petit, J.-L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C.,**
1371 **Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., et al.** (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis*
1372 reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**, 946–957.
- 1373 **Johansen, K. A. and Overturf, K.** (2005). Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth
1374 during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol. (NY)*. **7**, 576–87.
- 1375 **Johnston, I. A.** (2001). Genetic and Environmental Determinants of Muscle Growth Patterns. In *Muscle*
1376 *development and growth*, pp. 141–186.
- 1377 **Johnston, I. A.** (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.* **209**, 2249–2264.
- 1378 **Johnston, I. A., Davison, W. and Goldspink, G.** (1977). Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp.*
1379 *Physiol.* **114**, 203–16.
- 1380 **Johnston, I. A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Robertson, B., Paxton, C. G.**
1381 **M. and Burt, M. L.** (2003). Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in
1382 seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Exp. Biol.* **206**, 1337–51.
- 1383 **Johnston, I. A., Abercromby, M., Vieira, V. L. A., Sigursteindóttir, R. J., Kristjánsson, B. K., Sibthorpe, D.**
1384 **and Skúlason, S.** (2004). Rapid evolution of muscle fibre number in post-glacial populations of Arctic charr
1385 *Salvelinus alpinus*. *J. Exp. Biol.* **207**, 4343–4360.
- 1386 **Johnston, I. A., Lee, H.-T., Macqueen, D. J., Paranthaman, K., Kawashima, C., Anwar, A., Kinghorn, J. R.**
1387 **and Dalmay, T.** (2009). Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-
1388 wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to
1389 hypertrophic growth phenotypes. *J. Exp. Biol.* **212**, 1781–1793.
- 1390 **Johnston, I. A., Bower, N. I. and Macqueen, D. J.** (2011). Growth and the regulation of myotomal muscle mass in
1391 teleost fish. *J. Exp. Biol.* **214**, 1617–28.
- 1392 **Junqueira, L. and Carneiro, J.** (2008). *Histologia Básica*. 11th ed. (ed. Guanabara Koogan) Rio de Janeiro.
- 1393 **Junqueira, L. and Carneiro, J.** (2013). *Histologia Básica, Texto & Atlas*. 12th ed. (ed. Guanabara Koogan) Rio de
1394 Janeiro.
- 1395 **Kjaer, M.** (2004). Role of Extracellular Matrix in Adaptation of Tendon and Skeletal Muscle to Mechanical
1396 Loading. *Physiol. Rev.* **84**, 649–698.
- 1397 **Koressaar, T. and Remm, M.** (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3.
1398 *Bioinformatics* **23**, 1289–1291.
- 1399 **Koumans, J. T. M., Akster, H. A., Dulos, G. J. and Osse, J. W. M.** (1990). Myosatellite cells of *Cyprinus carpio*
1400 (*Teleostei*) in vitro: isolation, recognition and differentiation. *Cell Tissue Res.* **261**, 173–181.
- 1401 **Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0
1402 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
- 1403 **Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al.** (2003).
1404 The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419.
- 1405 **Lee, C.-T., Risom, T. and Strauss, W. M.** (2007). Evolutionary Conservation of MicroRNA Regulatory Circuits:
1406 An Examination of MicroRNA Gene Complexity and Conserved MicroRNA-Target Interactions through
1407 Metazoan Phylogeny. *DNA Cell Biol.* **26**, 209–218.
- 1408 **Li, P., Mai, K., Trushenski, J. and Wu, G.** (2008). New developments in fish amino acid nutrition: towards
1409 functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids.* **37(1)**, 43–53.
- 1410 **Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative
1411 PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8.
- 1412 **Ma, P. C. M., Rould, M. A., Weintraub, H. and Pabo, C. O.** (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-
1413 DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell.* **77**, 451-
1414 459.
- 1415 **Macqueen, D. J., Kristjánsson, B. K. and Johnston, I. A.** (2010). Salmonid genomes have a remarkably expanded
1416 akirin family, coexpressed with genes from conserved pathways governing skeletal muscle growth and
1417 catabolism. *Physiol. Genomics* **42**, 134–48.
- 1418 **Macqueen, D. J., Garcia de la serrana, D. and Johnston, I. A.** (2013). Evolution of Ancient Functions in the
1419 Vertebrate Insulin-Like Growth Factor System Uncovered by Study of Duplicated Salmonid Fish Genomes.
1420 *Mol. Biol. Evol.* **30**, 1060–1076.
- 1421 **Maere, S. and Van de Peer, Y.** (2010). Duplicate Retention After Small- and Large-Scale Duplications. In
1422 *Evolution after Gene Duplication* (ed. Dittmar, K. and Liberles, D.), 329p. Hoboken, NJ, USA: John Wiley &
1423 Sons, Inc.
- 1424 **Mareco, E. A., Garcia de la Serrana, D., Johnston, I. A. and Dal-Pai-Silva, M.** (2015). Characterization of the
1425 transcriptome of fast and slow muscle myotomal fibres in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *BMC*
1426 *Genomics* **16**, 182.
- 1427 **Mauro, A.** (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495.
- 1428 **McCarthy, J. J.** (2011). The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **39**, 150–4.

- 1429 **Michelin, A. C., Justulin, L. A., Delella, F. K., Padovani, C. R., Felisbino, S. L. and Dal-Pai-Silva, M.** (2009).
1430 Differential MMP-2 and MMP-9 Activity and Collagen Distribution in Skeletal Muscle from pacu (*Piaractus*
1431 *mesopotamicus*) During Juvenile and Adult Growth Phases. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **292**,
1432 387–395.
- 1433 **Mishima, Y., Abreu-Goodger, C., Staton, A. A., Stahlhut, C., Shou, C., Cheng, C., Gerstein, M., Enright, A. J.**
1434 **and Giraldez, A. J.** (2009). Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate
1435 sarcomeric actin organization. *Genes Dev.* **23**, 619–632.
- 1436 **MPA** (2013). *Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2011*.
- 1437 **Nachtigall, P. G., Dias, M. C., Carvalho, R. F., Martins, C. and Pinhal, D.** (2015). MicroRNA-499 expression
1438 distinctively correlates to target genes *sox6* and *rod1* profiles to resolve the skeletal muscle phenotype in Nile
1439 tilapia. *PLoS One* **10**, e0119804.
- 1440 **Nelson, J. S.** (2006). *Fishes of the world*. 4th ed. John Wiley.
- 1441 **Nikki, J., Pirhonen, J., Jobling, M. and Karjalainen, J.** (2004). Compensatory growth in juvenile rainbow trout,
1442 *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. *Aquaculture*. **235**, 285–296.
- 1443 **Olson, E. N.** (1990). MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev.* **4**, 1454–1461.
- 1444 **Pinheiro, A.** (2014). Futuro Próspero. In *1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura*, p. 133.
- 1445 **Raleigh, R. F., Hickman, T., Solomon, R. C. and Nelson, P. C.** (1984). Habitat suitability information: Rainbow
1446 trout. 64p. U.S. Fish Wildl. Serv.
- 1447 **Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L. and Moorman, A. F. M.** (2003). Assumption-free analysis of
1448 quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**, 62–6.
- 1449 **Rescan, P. Y.** (2001). Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comp.*
1450 *Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **130**, 1–12.
- 1451 **Rowlerson, A. and Veggetti, A.** (2001). Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture
1452 species. In *Muscle development and growth* (ed. Johnston, I. A.), pp. 103–140. San Diego: Academic Press.
- 1453 **Saint-Paul, U.** (1989). Aquaculture in latin America. Indigenous species promise increased fields. *NAGA*. 3-5.
- 1454 **Saint-Paul, U.** (2017). Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta Fish. Aquat. Resour.*
1455 **5**, 1–9.
- 1456 **Samy, J. K. A., Mulugeta, T. D., Nome, T., Sandve, S. R., Grammes, F., Kent, M. P., Lien, S. and Våge, D. I.**
1457 (2017). SalmoBase: an integrated molecular data resource for Salmonid species. *BMC Genomics* **18**, 482.
- 1458 **Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S. and Sabatini, D. M.** (2010). Ragulator-Rag
1459 Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids.
1460 *Cell* **141**, 290–303.
- 1461 **Sandri, M.** (2008). Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* **23**, 160–170.
- 1462 **Sänger, A. M. and Stoiber, W.** (2001). Muscle fiber diversity and plasticity. In *Muscle development and growth*
1463 (ed. Johnston, I. A.), pp. 187–250. San Diego: Academic Press.
- 1464 **Santos, V. B., Santos, R., Salomão, R. and Silva, R.** (2012). Reprodução Induzida de Pacu (*Piaractus*
1465 *mesopotamicus*) com o uso de Diferentes Hormônios Comerciais. *Pesqui. Tecnol. - APTA Reg.* **9**, 1–6.
- 1466 **Schiaffino, S. and Reggiani, C.** (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol. Rev.* **91**, 1447–1531.
- 1467 **Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.
1468 *Nat. Methods.* **9**, 671–5.
- 1469 **Seiliez, I., Gabillard, J.-C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutierrez, J., Kaushik, S., Panserat, S. and**
1470 **Tesseraud, S.** (2008). An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout
1471 (*Oncorhynchus mykiss*). *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R329–R335.
- 1472 **Seiliez, I., Sabin, N. and Gabillard, J.-C.** (2012). Myostatin inhibits proliferation but not differentiation of trout
1473 myoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 220–226.
- 1474 **Sempere, L. F., Cole, C. N., Mcpeek, M. A. and Peterson, K. J.** (2006). The phylogenetic distribution of
1475 metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev.*
1476 *Evol.* **306B**, 575–588.
- 1477 **Staron, R. S., Kraemer, W. J., Hikida, R. S., Fry, A. C., Murray, J. D. and Campos, G. E. R.** (1999). Fiber type
1478 composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. *Histochem. Cell Biol.* **111**, 117–123.
- 1479 **Staton, A. A., Knaut, H. and Giraldez, A. J.** (2011). miRNA regulation of *Sdf1* chemokine signaling provides
1480 genetic robustness to germ cell migration. *Nat. Genet.* **43**, 204–211.
- 1481 **Stellabotte, F., Dobbs-McAuliffe, B., Fernandez, D. A., Feng, X. and Devoto, S. H.** (2007). Dynamic somite cell
1482 rearrangements lead to distinct waves of myotome growth. *Development* **134**, 1253–1257.
- 1483 **Stickney, H. L., Barresi, M. J. F. and Devoto, S. H.** (2000). Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn.* **219**,
1484 287–303.
- 1485 **Taylor, J. S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A. and Van de Peer, Y.** (2003). Genome Duplication, a Trait
1486 Shared by 22,000 Species of Ray-Finned Fish. *Genome Res.* **13**, 382–390.
- 1487 **Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. and Rozen, S. G.** (2012).

- 1488 Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, e115.
- 1489 **Urbinati, E. C. and Gonçalves, F. D.** (2005). Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In *Espécies nativas para*
- 1490 *piscicultura no Brasil* (ed. Baldisserotto, B.) and Gomes, L. de C.), pp. 225–255. Santa Maria: UFSM.
- 1491 **Van Leeuwen, J. L.** (1999). A mechanical analysis of myomere shape in fish. *J. Exp. Biol.* **202**, 3405–14.
- 1492 **van Rooij, E., Liu, N. and Olson, E. N.** (2008). MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* **24**, 159–66.
- 1493 **van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J. and Olson,**
- 1494 **E. N.** (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle
- 1495 performance. *Dev. Cell* **17**, 662–73.
- 1496 **Vélez, E. J., Lutfi, E., Jiménez-Amilburu, V., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I. and Gutiérrez, J.**
- 1497 (2014). IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead
- 1498 sea bream cultured myocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **205**, 296–304.
- 1499 **Vélez, E. J., Lutfi, E., Azizi, S., Montserrat, N., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I. and Gutiérrez, J.**
- 1500 (2016). Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle physiology. *Comp. Biochem.*
- 1501 *Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **199**, 67–73.
- 1502 **von Hofsten, J., Elworthy, S., Gilchrist, M. J., Smith, J. C., Wardle, F. C. and Ingham, P. W.** (2008). Prdm1-
- 1503 and Sox6-mediated transcriptional repression specifies muscle fibre type in the zebrafish embryo. *EMBO Rep.*
- 1504 **9**, 683–9.
- 1505 **Wang, X., Ono, Y., Tan, S. C., Chai, R. J., Parkin, C. and Ingham, P. W.** (2011). Prdm1a and miR-499 act
- 1506 sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development*
- 1507 **138**, 4399–404.
- 1508 **Weintraub, H.** (1993). The myod family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* **75**, 1241-
- 1509 1244.
- 1510 **Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H.**
- 1511 **R., Kauppinen, S. and Plasterk, R. H. A.** (2005). MicroRNA Expression in Zebrafish Embryonic
- 1512 Development. *Science (80-.).* **309**, 310–311.
- 1513 **Williams, A. H., Liu, N., van Rooij, E. and Olson, E. N.** (2009). MicroRNA control of muscle development and
- 1514 disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 461–469.
- 1515 **Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. and Diederichs, S.** (2009). Many roads to maturity: microRNA
- 1516 biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–234.
- 1517 **Yaffe, D. and Saxel, O.** (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic
- 1518 mouse muscle. *Nature* **270**, 725–7.
- 1519 **Yan, X., Ding, L., Li, Y., Zhang, X., Liang, Y., Sun, X. and Teng, C.-B.** (2012a). Identification and profiling of
- 1520 microRNAs from skeletal muscle of the common carp. *PLoS One* **7**, e30925.
- 1521 **Yan, B., Zhao, L.-H., Guo, J.-T. and Zhao, J.-L.** (2012b). miR-429 regulation of osmotic stress transcription
- 1522 factor 1 (OSTF1) in tilapia during osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **426**, 294–298.
- 1523 **Yan, B., Guo, J.-T., Zhao, L.-H. and Zhao, J.-L.** (2012c). microRNA expression signature in skeletal muscle of
- 1524 Nile tilapia. *Aquaculture* **364-365**, 240–246.
- 1525 **Yan, B., Guo, J.-T., Zhu, C. -d., Zhao, L.-H. and Zhao, J.-L.** (2013). miR-203b: a novel regulator of MyoD
- 1526 expression in tilapia skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* **216**, 447–451.
- 1527 **Yin, V. P., Thomson, J. M., Thummel, R., Hyde, D. R., Hammond, S. M. and Poss, K. D.** (2008). Fgf-dependent
- 1528 depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes Dev.* **22**, 728–733.
- 1529 **Yin, V. P., Lepilina, A., Smith, A. and Poss, K. D.** (2012). Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133.
- 1530 *Dev. Biol.* **365**, 319–327.
- 1531 **Yusuf, F. and Brand-Saberi, B.** (2012). Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem. Cell Biol.* **138**, 187–199.
- 1532 **Zanou, N. and Gailly, P.** (2013). Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic
- 1533 regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4117–
- 1534 4130.
- 1535
- 1536
- 1537
- 1538
- 1539
- 1540
- 1541