UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA

EXPRESSÃO DE microRNAs ENVOLVIDOS COM O CRESCIMENTO MUSCULAR DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*): ANÁLISES *IN VIVO* E *IN VITRO*.

BRUNO OLIVEIRA DA SILVA DURAN

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

Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP
2015

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO DE microRNAs ENVOLVIDOS COM O CRESCIMENTO MUSCULAR DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*): ANÁLISES *IN VIVO* E *IN VITRO*.

BRUNO OLIVEIRA DA SILVA DURAN

MAELI DAL PAI

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

Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP
2015

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

Duran, Bruno Oliveira da Silva.
Expressão de microRNAs envolvidos com o crescimento muscular do pacu (Piaractus mesopotamicus) : análises in vivo e in vitro / Bruno Oliveira da Silva Duran. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maeli Dal Pai
Capes: 20100000

1. Expressão gênica. 2. Regulamento genético. 3. Sistema musculoesquelético. 4. Pacu (Peixe).

Palavras-chave: Fatores de regulação miogênica (MRFs); MicroRNA; Músculo esquelético; Pacu (Piaractus mesopotamicus).

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

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
meu irmão, Lucas Oliveira da Silva Duran
e minha namorada, Luana Campos Soares

Muito obrigado por tudo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Maeli Dal Pai, por todos os ensinamentos, apoio e incentivo durante os últimos seis anos. Obrigado por toda a confiança e reconhecimento, sem os quais eu não chegaria até aqui. Esse trabalho também é mérito seu.

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Robson Francisco Carvalho, Rafael Henrique Nóbrega e Adriane Pinto Wasko, e da banca de defesa, Maeli Dal Pai, Fernanda Losi Alves de Almeida e Fernanda Antunes Alves da Costa, pelos valorosos conselhos e sugestões para a melhoria dessa dissertação e para a elaboração do artigo.

Agradeço a toda minha família, principalmente meus pais, Sueli de Fatima Oliveira e Antonio Francisco da Silva Duran, minha avó, Jacy Rosa de Lima Oliveira, meus tios, Suzana Dolores Duran Lemos e Lair de Lemos, meu irmão, Lucas Oliveira da Silva Duran, minha namorada, Luana Campos Soares, e Lúcia Galvão do Amaral Campos, Luiza Campos Soares, Paulo Barbosa de Campos e Heloisa Galvão do Amaral Campos. Obrigado pelo amparo e por todo o carinho e paciência que vocês dedicaram a mim.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório e de departamento, Airton de Carvalho Junior, Ana Carolina Mieko Omoto, Brenda de Carvalho Minatel, Bruna Tereza Thomazini Zanella, Bruno Martinucci, Carlos Augusto Barnabe Alves, Caroline Bredariol de Oliveira, Edson Assunção Mareco, Fernanda Losi Alves de Almeida, Fernanda Regina Carani, Flavia Regina Borges Fernandes, Francielle Caroline Mosele, Geysson Javier Fernandez Garcia, Grasieli de Oliveira, Ivan José Vechetti Júnior, Jéssica Silvino Valente, Juarez Henrique Ferreira, Leonardo Nazario de Moraes, Lucas Fredini Camora, Paula Aiello Tomé de Souza Castro, Paula Paccielli Freire, Rafaela Nunes da Silva, Raquel Santilone Bertaglia, Rodrigo Wagner Alves de Souza, Rondinelle Artur Simões Salomão, Sarah Santiloni Cury, Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos, Tassiana Gutierrez de Paula e Warlen Pereira Piedade. Obrigado pela convivência, companheirismo e por me apoiarem nos momentos fáceis e difíceis.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2013/01892-2 e Processo nº 2013/10196-0) pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
1. INTRODUÇÃO 10
1.1. *Piaractus mesopotamicus* 10
1.2. *Músculo esquelético* 11
1.3. *Miogênese* 16
1.4. *Crescimento muscular pós-natal* 18
1.5. *MicroRNAs* 23
1.6. *Cultura celular primária de mioblastos* 25
2. HIPÓTESE 27
3. JUSTIFICATIVA 27
4. OBJETIVO 27
4.1. *Objetivo geral* 27
4.2. *Objetivos específicos* 27
5. MATERIAL E MÉTODOS 28
5.1. *Coleta de amostras* 28
5.2. *Cultura de mioblastos* 28
5.3. *Extração, quantificação e análise da integridade do RNA* 29
5.4. *Tratamento com DNAse e transcrição reversa* 30
5.5. *Desenho de primers e RT-PCR* 31
5.6. *PCR em Tempo Real* 32
5.7. *Análises estatísticas* 34
6. REFERÊNCIAS GERAIS 34
7. ARTIGO 40
8. APÊNDICE 62

RESUMO

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe brasileiro que apresenta elevado interesse econômico para a piscicultura, devido a características como rusticidade e rápido crescimento. O crescimento pós-natal do músculo esquelético em peixes ocorre por hiperplasia e/ou hipertrofia, processos dependentes da proliferação e diferenciação de mioblastos. Uma classe de pequenos RNAs não codificantes, conhecidos como microRNAs (miRNAs), reprime a expressão de mRNAs alvo, e muitos estudos mostram que o miR-1, miR-133, miR-206 e miR-499 regulam diferentes processos no músculo esquelético pelo silenciamento da HDAC4, SRF, Pax7 e Sox6, respectivamente. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a expressão dos miRNAs e de seus supostos mRNAs alvo nos músculos esqueléticos de contração rápida e lenta do pacu durante o crescimento. Nossos resultados mostraram uma correlação inversa entre a expressão dos miRNAs e de seus mRNAs alvo, e houve evidências de que o miR-1, miR-133 e miR-206 podem regular a proliferação e diferenciação de mioblastos. Por outro lado, o miR-499 foi altamente expresso no músculo de contração lenta, sugerindo seu envolvimento na especificação e manutenção do fenótipo lento nas fibras musculares. A expressão dos miRNAs mostrou variações entre diferentes estágios de desenvolvimento e entre fenótipos de contração muscular distintos. Esse trabalho forneceu a primeira identificação do perfil de expressão de miRNAs relacionados ao músculo esquelético no pacu e sugere um importante papel dessas moléculas nesse tecido.

ABSTRACT

Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a Brazilian fish with high economic interest for pisciculture due to features such as rusticity and fast growth. Postnatal growth of skeletal muscle in fish occurs by hyperplasia and/or hypertrophy, processes that are dependent on the proliferation and differentiation of myoblasts. A class of small noncoding RNAs, known as microRNAs (miRNAs), represses the expression of target mRNAs, and many studies demonstrate that miR-1, miR-133, miR-206 and miR-499 regulate different processes in skeletal muscle through the mRNA silencing of HDAC4, SRF, Pax7 and Sox6, respectively. The aim of our work was to evaluate the expression of miRNAs and their putative target mRNAs in fast- and slow-twitch skeletal muscle of pacu during growth. Our results revealed an inverse correlation between the expression of miRNAs and their target mRNAs, and there was evidence that miR-1, miR-133 and miR-206 may regulate the proliferation and differentiation of myoblasts. On the other hand, miR-499 was highly expressed in slow-twitch muscle, which suggests its involvement in the specification and maintenance of the slow phenotype in muscle fibres. miRNA expression exhibited variations between different development stages and between distinct muscle twitch phenotypes. This work provided the first identification of miRNA expression profiles related to skeletal muscle in pacu and suggests an important role of these molecules in this tissue.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Piaractus mesopotamicus*

Piaractus mesopotamicus, popularmente conhecido como pacu, é um peixe pertencente à ordem Characiformes e à família Characidae (Figura 1). O pacu é encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, mas sua distribuição está mais concentrada nas planícies alagadas da região Centro-Oeste do Brasil, sendo um dos peixes mais estudados no Sul, Sudeste e Centro-Oeste brasileiros (Urbinati & Gonçalves, 2005).



Figura 1: Exemplar de juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Imagem de autoria própria).

É uma espécie que apresenta diversas características economicamente interessantes, como rusticidade, alta fertilidade, rápido crescimento, adaptação à alimentação artificial e carne saborosa, podendo atingir até 20 kg (Santos *et al*., 2012). O pacu pertence ao grupo de peixes redondos que, juntamente com o tambaqui e tambacu, correspondem à maioria dos peixes nativos cultivados, representando aproximadamente 33.5% da produção nacional e apresentando um alto valor comercial para a pesca e piscicultura brasileiras (MPA, 2013).

Apesar do *zebrafish* (*Danio rerio*) e do *medaka* (*Oryzias latipes*) serem amplamente utilizados como organismos modelo para o entendimento de muitos processos biológicos, existem limitações quanto ao estudo do músculo esquelético durante o crescimento do peixe, uma vez que esses animais atingem pequenos tamanhos (Froehlich *et al*., 2013). O pacu é um excelente modelo experimental para esse tipo de estudo por atingir um grande tamanho corporal, indicando que, além de seu alto interesse econômico, é uma espécie que também apresenta importância para a pesquisa científica.

1.2. *Músculo esquelético*

As células do tecido muscular esquelético são conhecidas como fibras musculares. São células alongadas, cilíndricas e multinucleadas, com um diâmetro que varia de 10 a 100 µm. O citoplasma (sarcoplasma) das fibras é totalmente preenchido por filamentos contráteis denominados miofibrilas, que deslocam os vários núcleos em direção à membrana plasmática (sarcolema), ou seja, para a periferia das células, sendo essa uma característica do tecido muscular esquelético (Junqueira & Carneiro, 2008).

Os músculos são revestidos por uma camada espessa de tecido conjuntivo denominado epimísio, que emite septos para o interior do tecido separando-o em feixes. O tecido conjuntivo que envolve esses feixes de fibras musculares, também conhecidos como fascículos, é conhecido como perimísio. Além disso, cada fibra muscular é revestida por uma delgada camada de tecido conjuntivo denominado endomísio, formado pela lâmina basal em associação com fibras reticulares (revisado por Kjaer, 2004) (Figura 2). O tecido conjuntivo tem grande importância para a fisiologia do tecido muscular, contribuindo para a união das fibras, transmissão das forças de contração e inserção de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Em peixes, a distribuição do tecido conjuntivo no músculo esquelético e a concentração de colágeno variam conforme a espécie, a etologia do animal, a atividade muscular realizada durante os movimentos natatórios e o estágio de desenvolvimento (Michelin *et al*., 2009).

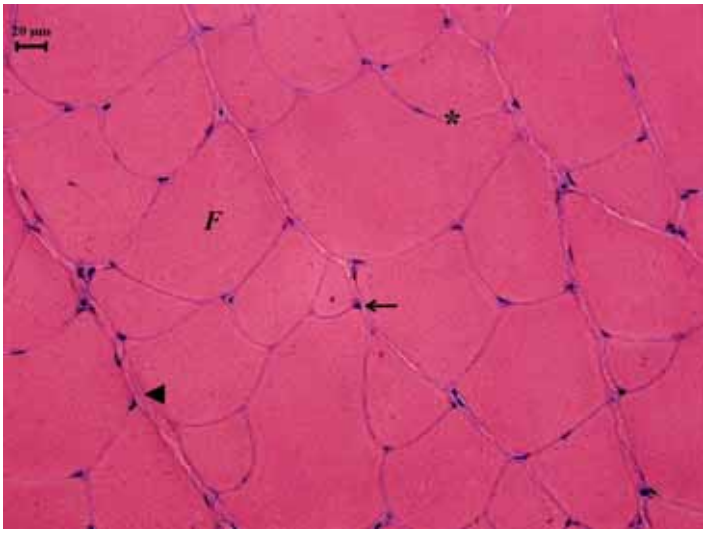


Figura 2: Corte transversal de músculo esquelético de contração rápida de pacu adulto (Imagem de autoria própria). ***F***: fibra muscular; *****: endomísio; ◀: perimísio; ←: mionúcleo. HE (40X). Barra: 20 µm.

As fibras musculares apresentam estriações, devido ao arranjo repetitivo das miofibrilas em unidades conhecidas como sarcômeros, o que proporciona uma alternância de faixas escuras (banda A) e claras (banda I). As miofibrilas são principalmente constituídas de filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina, dispostos longitudinalmente e organizados de maneira simétrica e paralela. A actina apresenta-se sob a forma de polímeros longos (actina F), constituídos por duas cadeias de monômeros globulares (actina G) torcidas em dupla-hélice. Cada monômero possui um sítio ativo, região na qual ocorre a interação com a miosina. A molécula de miosina é um hexâmero formado por quatro cadeias leves de miosina (MyLC) e duas cadeias pesadas de miosina (MyHC), que apresentam uma saliência globular (cabeça). A cabeça da miosina possui locais específicos para a interação com a actina e para a ligação com a molécula de ATP, sendo dotada de atividade ATPásica. Dessa forma, ocorre a hidrólise do ATP na cabeça da miosina, culminando com a liberação de energia utilizada na contração muscular. A contração muscular ocorre devido ao deslizamento das miofibrilas umas sobre as outras, aumentando o tamanho da zona de sobreposição entre os filamentos contráteis e diminuindo o tamanho do sarcômero (Junqueira & Carneiro, 2008) (Figura 3).

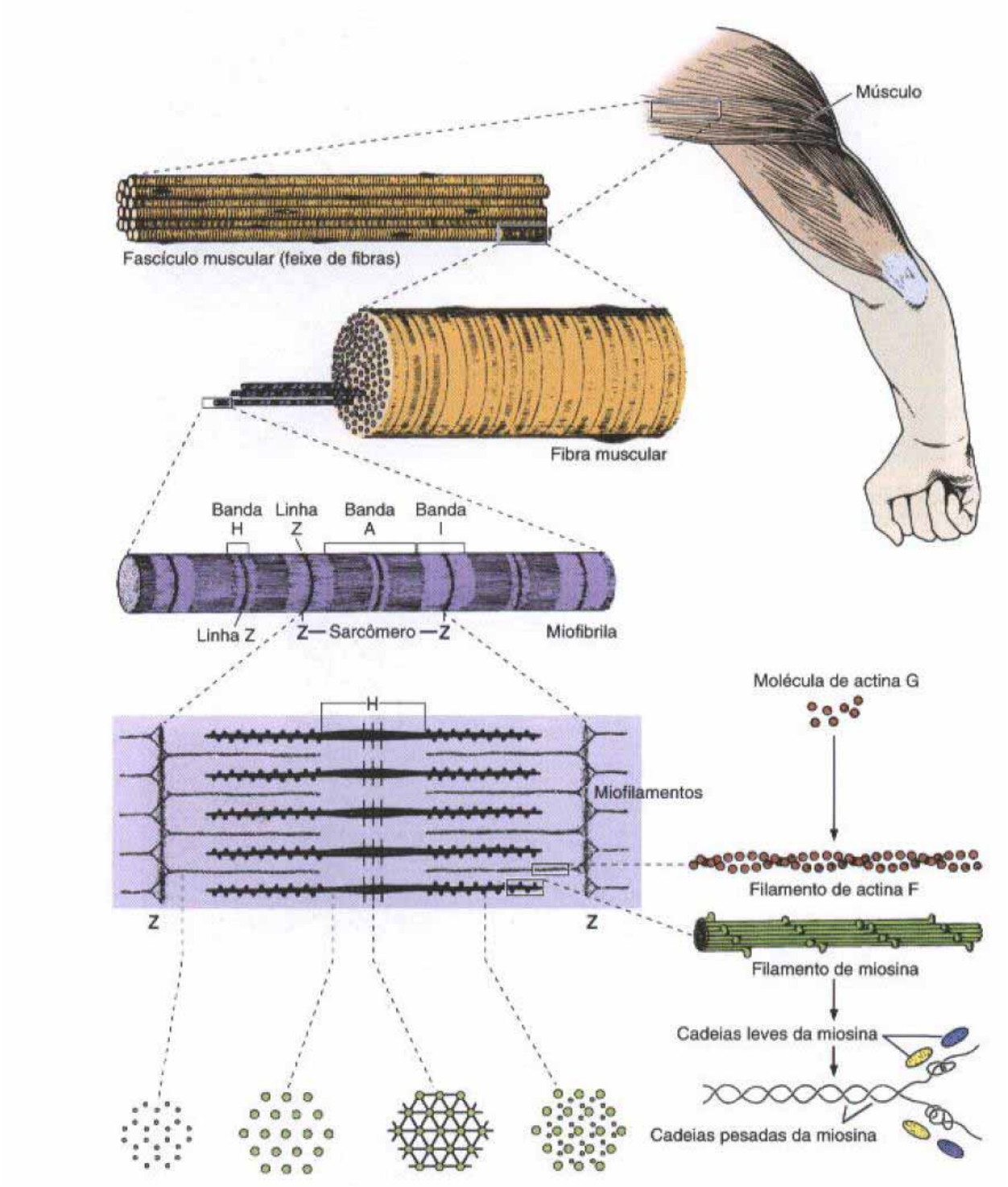


Figura 3: Esquema ilustrando a estrutura do sarcômero (Junqueira & Carneiro, 2008).

As fibras musculares podem expressar diferentes isoformas de MyHC, que determinam a velocidade de hidrólise do ATP e, consequentemente, a velocidade de contração muscular. Em mamíferos, as fibras que expressam somente uma isoforma são denominadas puras e são

classificadas em tipo I (MyHC I), IIA (MyHC IIA), IIB (MyHC IIB) e IID (MyHC IID). Entretanto, uma mesma fibra muscular pode apresentar diferentes isoformas de MyHC, sendo estas denominadas fibras híbridas e classificadas conforme a MyHC predominante: tipo IC (MyHC I > MyHC IIA), IIC (MyHC IIA > MyHC I), IIAD (MyHC IIA > MyHC IID), IIDA (MyHC IID > MyHC IIA), IIDB (MyHC IID > MyHC IIB) e IIBD (MyHC IIB > MyHC IID). As fibras de tipo II hidrolisam o ATP mais rapidamente, possuindo contração rápida, enquanto as fibras de tipo I apresentam baixa atividade ATPásica, possuindo contração lenta (revisado por Schiaffino & Reggiani, 2011).

Na maioria dos peixes o músculo esquelético constitui cerca de 60% da massa corporal. Essa musculatura está intimamente relacionada à fisiologia desses animais, possibilitando a adaptação ao meio aquático e sendo uma importante fonte de proteínas, muito utilizada na alimentação dos seres humanos (Almeida *et al*., 2010).

Geralmente, a organização anatômica do músculo esquelético nos peixes constitui-se em unidades idênticas chamadas miômeros, estruturas envoltas por camadas de tecido conjuntivo denominadas miosseptos. Os miômeros se repetem ao longo de todo o comprimento corporal do peixe e possuem um formato em W, que permite um encaixe intrincado dessas unidades e diferentes flexões corporais durante o nado (Van Leeuwen, 1999). O miossepto vertical divide os músculos em antímeros direito e esquerdo e, na região em que se encontra o nervo da linha lateral, um miossepto horizontal (septo transverso) divide a musculatura em epaxial e hipaxial (Currie & Ingham, 2001) (Figura 4).

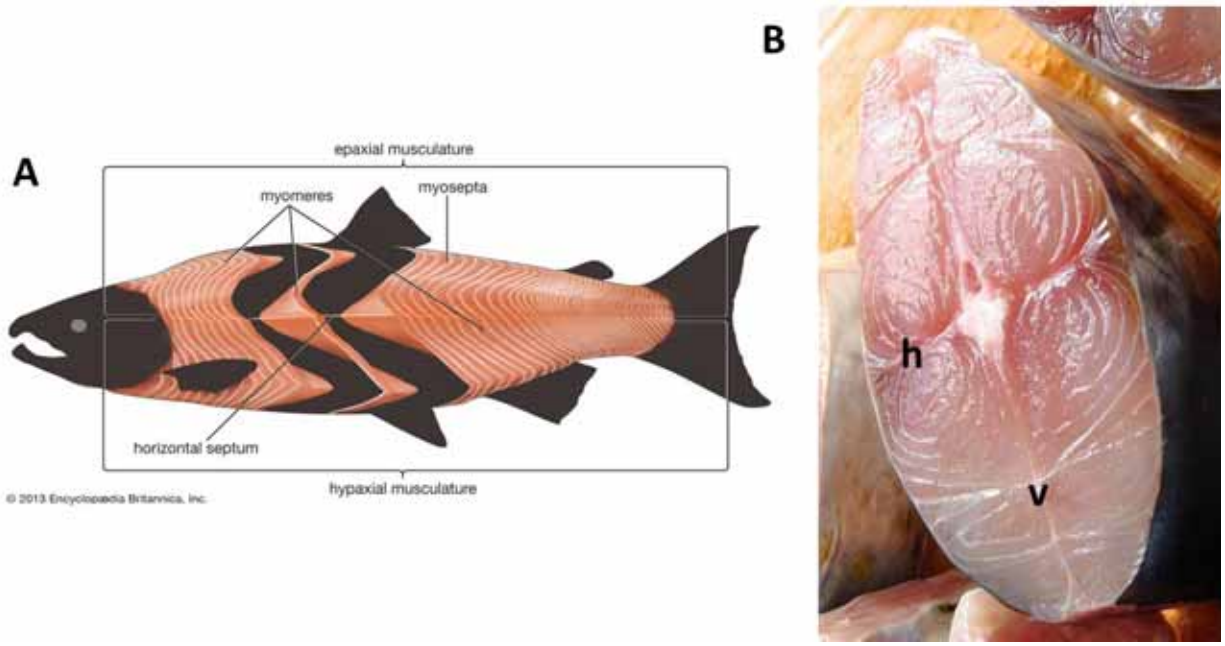


Figura 4: Organização anatômica do músculo esquelético nos peixes. (A) Estrutura dos miômeros e miosspetos e as musculaturas epaxial e hipaxial (Encyclopaedia Britannica Online, 2010). (B) Miossepto vertical (v) e miossepto horizontal (h) (Imagem do site Google).

Em peixes, normalmente, as fibras musculares são classificadas em fibras de contração rápida (músculo branco) e fibras de contração lenta (músculo vermelho), e encontram-se distribuídas em compartimentos distintos, diferentemente do padrão em mosaico encontrado nos músculos dos mamíferos (Johnston *et al*., 2004) (Figura 5). A musculatura de contração rápida compõe cerca de 70% da massa muscular e compreende a porção comestível do peixe. Suas fibras musculares apresentam diâmetro de 50 a 100 µm, metabolismo anaeróbico e baixa concentração de mioglobina, mitocôndrias e lipídeos. As fibras de contração rápida são mobilizadas durante os movimentos bruscos de natação, como captura de alimento e fuga de predadores. A musculatura de contração lenta compreende menos de 30% do músculo esquelético e localiza-se numa região mais superficial do corpo do peixe. Suas fibras apresentam diâmetro de 25 a 45 µm, metabolismo aeróbico e elevada concentração de mioglobina, mitocôndrias e lipídeos, além de um alto suprimento sanguíneo, que confere o aspecto avermelhado ao músculo. As fibras de contração lenta são utilizadas durante os movimentos lentos e de sustentação, como àqueles exigidos durante a natação migratória. Entre os compartimentos rápido e lento encontra-se o músculo esquelético intermediário, cujas fibras

apresentam propriedades contráteis e metabólicas intermediárias entre essas duas musculaturas (Sänger & Stoiber, 2001).

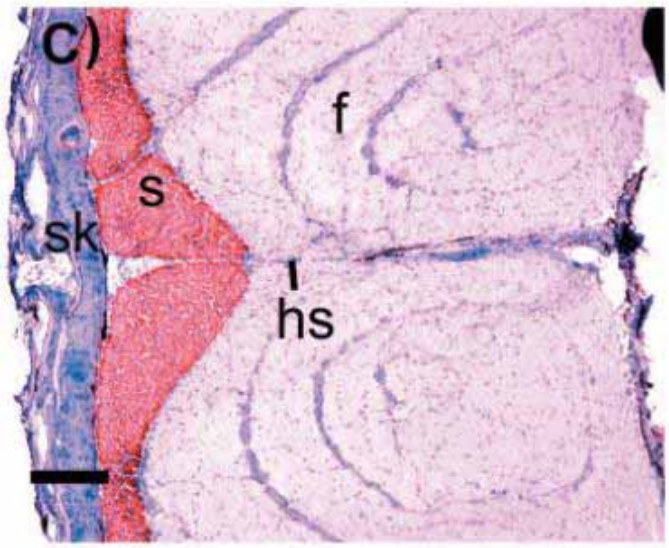


Figura 5: Tipos de fibras musculares em corte transversal de juvenil de salvelino ártico (*Salvelinus alpinus* L). As fibras foram marcadas com um anticorpo anti-miosina lenta e contra coradas com HE. **s**: fibras musculares de contração lenta (compartimento vermelho); **f**: fibras musculares de contração rápida (compartimento branco); **hs**: miossepto horizontal; **sk**: pele (Johnston *et al*., 2004).

1.3. *Miogênese*

A formação de fibras musculares nos peixes, ou miogênese, ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. A mesoderme paraxial, que flanqueia o tubo neural e a notocorda, sofre uma segmentação da região anterior para a posterior, formando estruturas denominadas somitos. Nos mamíferos, os somitos subdividem-se em uma porção ventral denominada esclerótomo, que originará a coluna vertebral e as costelas, e uma porção dorsal denominada dermomiótomo, responsável pela formação dos músculos do tronco e dos membros, da derme dorsal, de células endoteliais e musculares lisas, e dos vasos sanguíneos (revisado por Buckingham & Rigby, 2014). O dermomiótomo é fonte de populações de células precursoras miogênicas, que expressam os fatores transcricionais Pax3 e Pax7. Essas células delaminam e migram para a formação de uma camada subjacente conhecida como miótomo, cuja porção dorsomedial originará os músculos intrínsecos das costas, enquanto a porção ventrolateral originará os músculos das paredes ventrais e laterais do corpo. Além disso, células do dermomiótomo também migram para locais mais distantes, formando os músculos dos membros, e posteriormente para o interior do miótomo já formado, fornecendo uma população de células

progenitoras de reserva, conhecidas como células satélite (revisado por Yusuf & Brand-Saberi, 2012).

Nos peixes a classificação de um dermomiótomo ainda é controversa, sendo que a maioria dos trabalhos divide os somitos em esclerótomo e miótomo. Sttelabotte *et al*. (2007) mostraram que a borda anterior dos somitos fornece uma população de células progenitoras miogênicas equivalentes às células satélite, que serão necessárias para o crescimento muscular do peixe adulto. Diferentemente dos mamíferos, o miótomo é relativamente maior que o esclerótomo nos peixes, pois a necessidade de um esqueleto robusto é reduzida devido à flutuabilidade da água e à bexiga natatória, ao passo que a viscosidade do ambiente aquático exige maior massa muscular para a locomoção (revisado por Stickney *et al*., 2000).

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

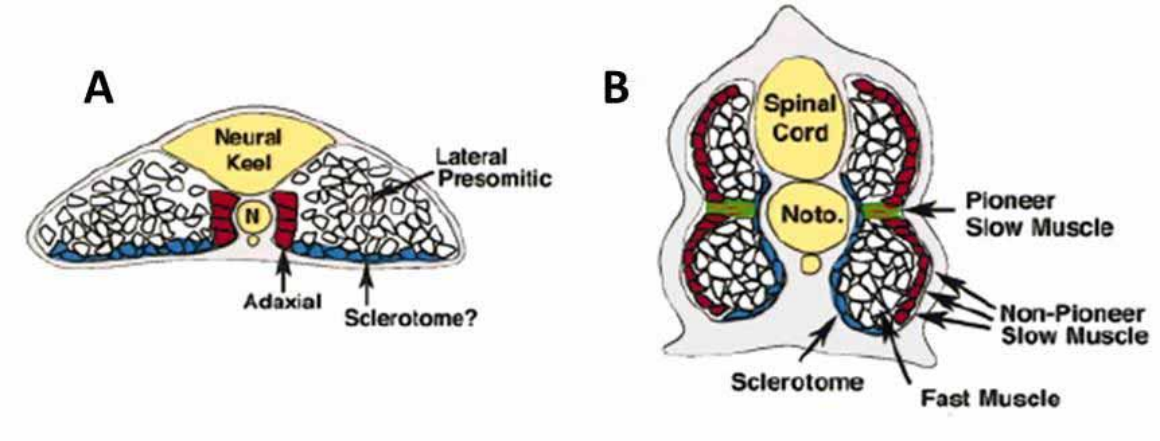


Figura 6: Formação dos tipos de fibras musculares em peixes. (A) Esquema de um corte transversal de embrião de *zebrafish* (*Danio rerio*) com 13 horas, destacando a posição das células adaxiais e células laterais pré-somíticas. (B) Esquema de um corte transversal de embrião de *zebrafish* (*Danio rerio*) com 24 horas, destacando a posição das fibras musculares de contração lenta, fibras musculares pioneiras e fibras musculares de contração rápida (revisado por Stickney *et al*., 2000).

1.4. *Crescimento muscular pós-natal*

O crescimento pós-natal do músculo esquelético nos peixes envolve uma população de células precursoras miogênicas ou mioblastos indiferenciados, similares às células satélite dos mamíferos. Essas são as células-tronco do tecido muscular e estão localizadas na periferia das fibras, entre a lâmina basal e o sarcolema, sendo ativadas durante o crescimento pós-natal e a regeneração do músculo esquelético (Figura 7). Uma vez ativadas, as células satélite originam os mioblastos, cuja proliferação e diferenciação são os mecanismos que promovem a hiperplasia (aumento do número de fibras musculares) e hipertrofia (aumento do tamanho das fibras) (Rowlerson & Veggetti, 2001; revisado por Johnston *et al*., 2011).

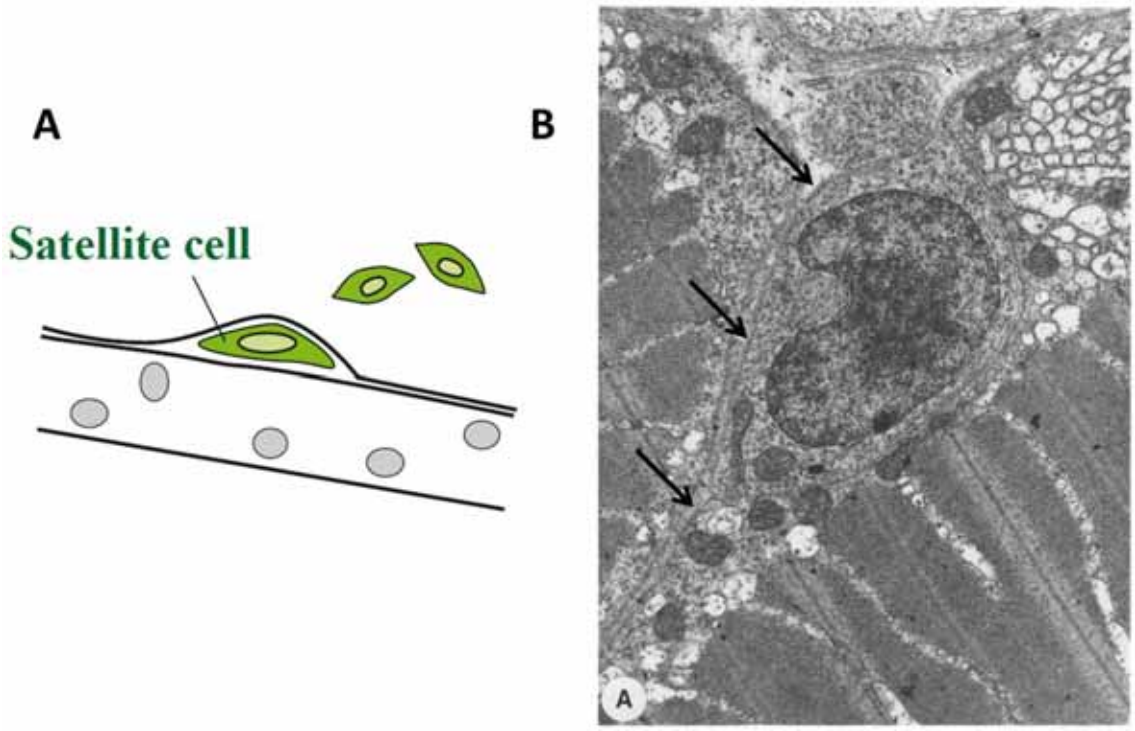


Figura 7: Célula satélite do músculo esquelético. (A) Esquema mostrando a posição da célula satélite, entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular (revisado por Buckingham & Rigby, 2014). (B) Microscopia eletrônica de transmissão do músculo esquelético de carpa (*Cyprinus carpio*). ←: lâmina basal envolvendo ambas a célula satélite e a fibra muscular (adaptado de Koumans *et al*., 1990).

Durante o crescimento hiperplásico, os mioblastos proliferam, agregam-se na superfície de fibras musculares pré-existentes, fundem-se e entram num processo de diferenciação, para que ocorra a geração de miotubos no tecido muscular, os quais se separam e originam novas fibras musculares. No crescimento hipertrófico, ocorre a proliferação e diferenciação dos mioblastos para que haja a internalização de seus núcleos nas fibras musculares em crescimento, promovendo uma maior síntese de miofibrilas e, consequentemente, aumentando a área e o diâmetro de fibras pré-existentes (revisado por Johnston *et al*., 2011) (Figura 8).

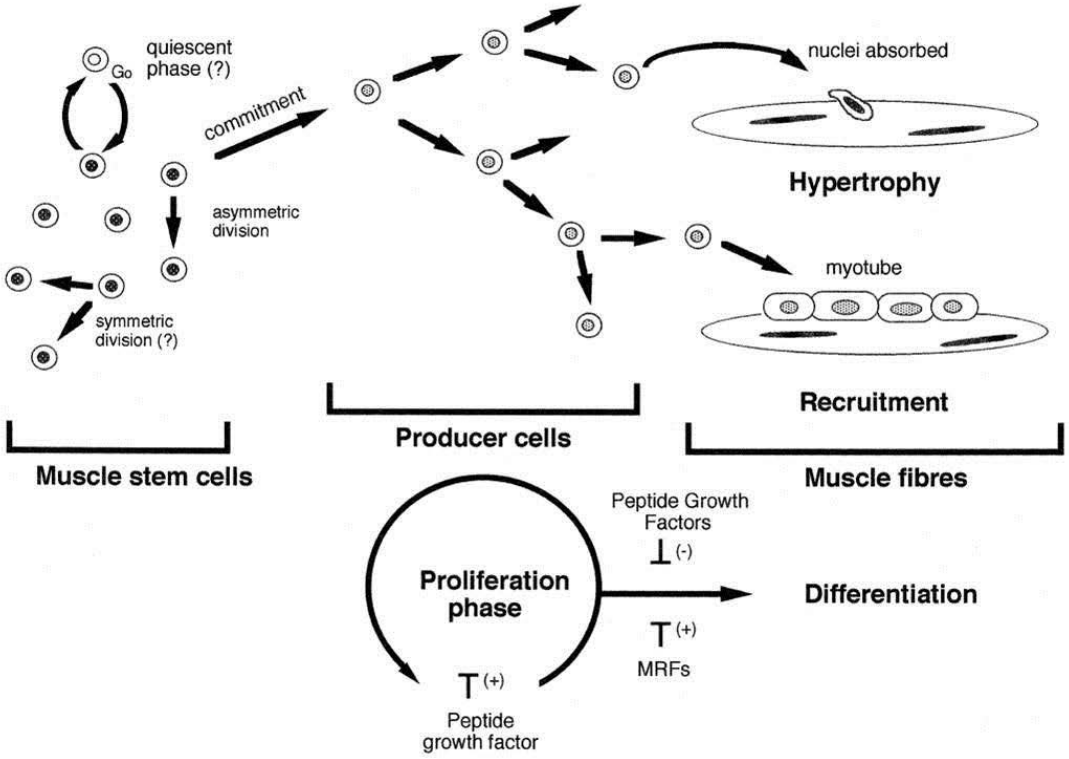


Figura 8: Crescimento pós-natal do músculo esquelético em peixes, com destaque para os mecanismos de proliferação e diferenciação de mioblastos, que irão culminar com os processos de recrutamento (hiperplasia) e hipertrofia muscular (Johnston, 1999).

Estudos mostraram que em muitos peixes teleósteos existem duas "ondas" de intenso crescimento hiperplásico (Rowlerson & Veggetti, 2001; Johnston *et al*., 2003). A primeira é conhecida como hiperplasia estratificada, uma continuidade da miogênese embrionária, que promove a formação de novas fibras musculares em camadas. Essa hiperplasia ocorre a partir de zonas germinativas e é responsável pelo espessamento da musculatura nos estágios iniciais do desenvolvimento. A segunda é denominada hiperplasia em mosaico, que promove a formação de novas fibras em toda a musculatura do peixe, a qual também apresenta fibras musculares num estágio de maturação mais avançado (Almeida *et al*., 2010). Dessa forma, o músculo esquelético apresenta fibras musculares com diâmetro pequeno entre fibras de maior diâmetro, como um mosaico (Figura 9). A hiperplasia em mosaico permite que haja maior desenvolvimento da massa muscular, e ocorre somente em peixes que atingem um grande tamanho corporal, sendo um fator de grande importância para espécies de interesse econômico (Rowlerson & Veggetti, 2001).

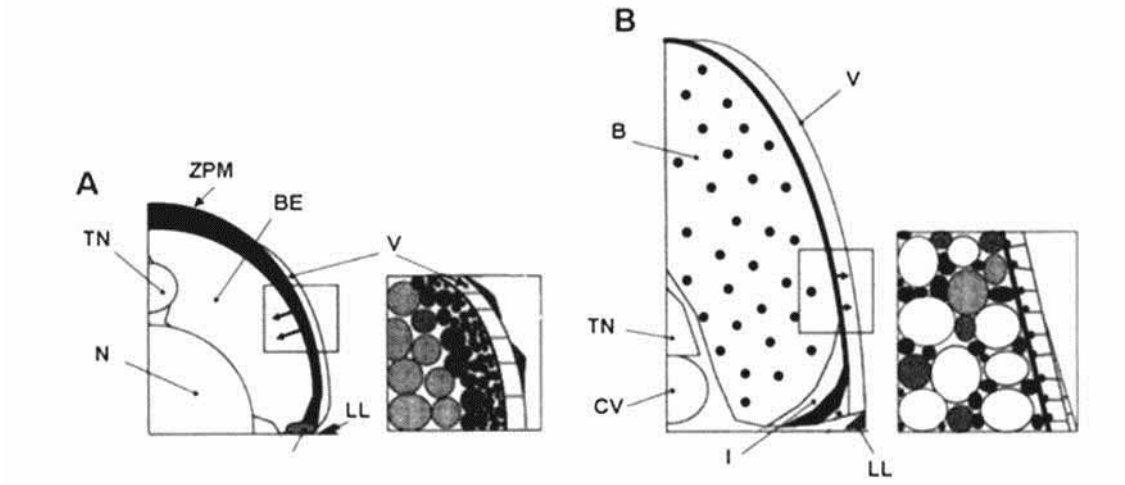


Figura 9: Crescimento hiperplásico do músculo esquelético de peixes. (A) Hiperplasia estratificada. (B) Hiperplasia em mosaico. BE: fibras musculares brancas embrionárias; V: fibras musculares vermelhas; ZPM: zona de proliferação de mioblastos; TN: tubo neural; N: notocorda; LL: linha lateral; CV: coluna vertebral; B: fibras musculares brancas; I: fibras musculares intermediárias (adaptado de Rowlerson & Veggetti, 2001).

A contribuição dos mecanismos de hiperplasia e hipertrofia no crescimento muscular pós-natal tem sido estudada em muitas espécies de peixes. O crescimento hiperplásico das fibras persiste por um período de tempo maior em peixes de crescimento somático indeterminado, que apresentam porte elevado, proporcionando grande aumento da massa muscular e conferindo importância econômica à espécie. Já em peixes de menor tamanho o crescimento somático é determinado, ou seja, atingem um tamanho fixo, sendo que a hiperplasia cessa nos estágio mais iniciais do desenvolvimento, tornando o crescimento hipertrófico das fibras o principal mecanismo de crescimento muscular pós-natal nessas espécies (Biga & Goetz, 2006; Froehlich *et al*., 2013).

Os mecanismos de proliferação e diferenciação de mioblastos e, consequentemente, o crescimento do músculo esquelético, são regulados por diferentes moléculas, como hormônios, fatores de crescimento, citocinas e diversos fatores transcricionais, dentre os quais podemos citar os Fatores de Regulação Miogênica (MRFs) (Johansen & Overturf, 2005). A estrutura molecular de um MRF apresenta um domínio altamente conservado, com cerca de 60 aminoácidos, conhecido como *basic helix-loop-helix*. A região *helix-loop-helix* está envolvida com a ligação entre o MRF e outra molécula idêntica, formando um homodímero, ou entre o MRF e proteínas E (E12 e E47), que são cofatores transcricionais, formando um heterodímero. A região *basic* está envolvida com a ligação do homodímero ou heterodímero a uma sequência específica do DNA

(5´-CANNTG-3´), denominada *E-box*. Essa sequência está presente na região promotora de genes músculo-específicos, que codificam, por exemplo, proteínas contráteis, estruturais e enzimas musculares, de modo que o homodímero ou heterodímero ativam a transcrição desses genes (revisado por Rescan, 2001). Assim, os MRFs controlam o programa miogênico dentro da célula, suprimindo outros destinos celulares.

Dentre os MRFs destacam-se a MyoD, Myf5, Miogenina e MRF4. A MyoD e o Myf5 são conhecidos como fatores primários, sendo responsáveis, principalmente, pela ativação e proliferação dos mioblastos no músculo esquelético. Já a Miogenina e o MRF4 são fatores secundários e estão envolvidos com a diferenciação e fusão dessas células (Johansen & Overturf, 2005; Almeida *et al*., 2010) (Figura 10).

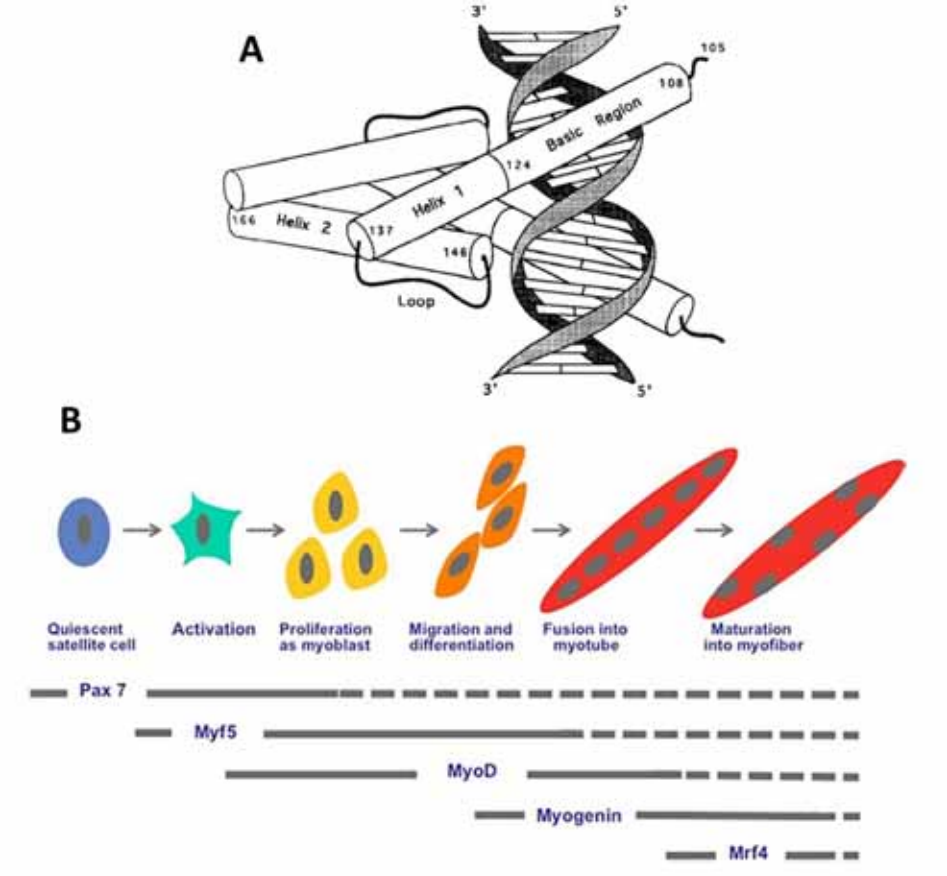


Figura 10: (A) Esquema do complexo formado entre um homodímero de MyoD e o DNA (Ma *et al*., 1994). (B) Regulação realizada pelos MRFs durante o crescimento pós-natal do músculo esquelético e regeneração muscular (revisado por Zanou & Gailly, 2013).

1.5. *MicroRNAs*

Nas décadas de 40 e 50, foi descoberto que o DNA era o portador da informação genética e que continha instruções para a produção de proteínas, moléculas responsáveis pela maioria das funções celulares. Dessa forma, foi definido o dogma central da biologia molecular, no qual o DNA promove a síntese do RNA, que vai ser traduzido em uma proteína. Atualmente, sabemos que a propagação da informação genética é muito mais complexa, existindo diversos outros mecanismos envolvidos no controle do metabolismo celular e definição do fenótipo, como a metilação do DNA, a modificação de histonas e a regulação por RNAs não codificantes (Chuang & Jones, 2007).

Dentre estes destacamos os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs regulatórios não codificantes com cerca de 22 nucleotídeos, que apresentam um importante papel nos mais diversos processos biológicos de um organismo, inclusive no desenvolvimento muscular. Análises filogenéticas revelam a existência de uma alta conservação dos miRNAs entre os vertebrados, e sugerem uma correlação positiva entre o número de genes de miRNAs e a complexidade do organismo (Sempere *et al*., 2006; Lee *et al*., 2007). A função principal dos miRNAs é a regulação pós-transcricional de genes, promovida pela inibição traducional ou degradação de RNAs mensageiro (mRNAs) (revisado por Ge & Chen, 2011). Essa repressão se dá através de complementaridade de bases entre os nucleotídeos 2 a 8 da região 5' do miRNA, conhecidos como sequência *seed*, e a região 3' não traduzida (3'UTR) dos mRNAs alvo (Williams *et al*., 2009).

Com relação à biogênese, os genes de miRNAs são sintetizados como longos transcritos primários, denominados pri-miRNAs, principalmente pela ação da RNA polimerase II. Os pri-miRNAs podem codificar um ou mais miRNAs, e são processados pelas proteínas nucleares RNAse III Drosha e DGCR8, gerando uma sequência de aproximadamente 70 pares de base conhecida como pre-miRNA. Os pre-miRNAs são então transportados ao citoplasma pela Exportina-5, onde serão processados pela RNAse III Dicer para a síntese de um miRNA dupla-fita (*duplex*), com aproximadamente 22 nucleotídeos (revisado por Ge & Chen, 2011). Em seguida, apenas uma única fita do *duplex* de miRNA é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que juntamente com proteínas da família Argonauta (Ago) associam-se com o sítio de complementaridade do mRNA alvo (revisado por Winter *et al*., 2009). A outra fita do *duplex* é degradada ou pode associar-se a um novo RISC, para a regulação de outro mRNA alvo (Figura 11).

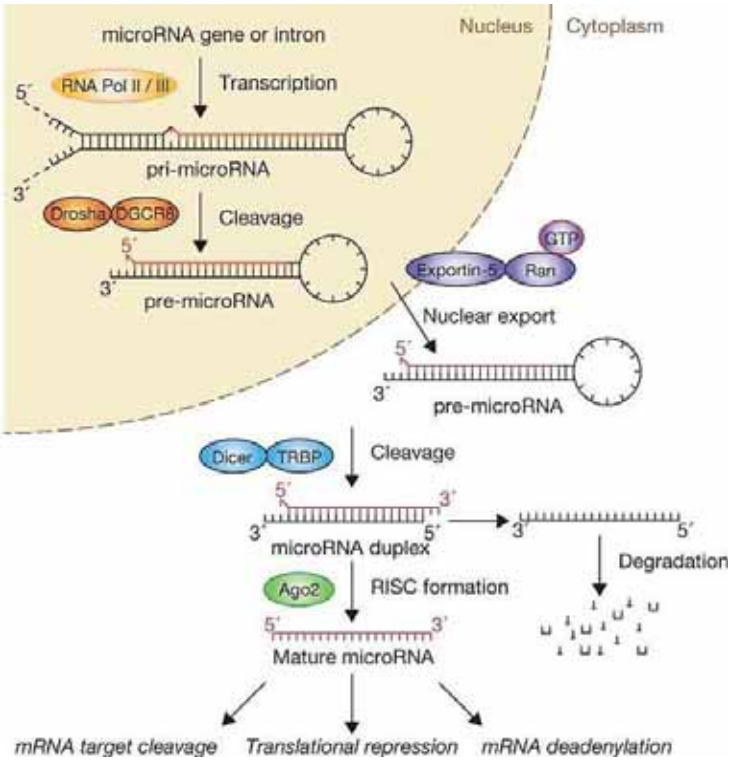


Figura 11: Biogênese dos miRNAs (revisado por Winter *et al*., 2009).

A regulação combinatória é uma característica comum, de modo que um miRNA pode ter diversos mRNAs alvo e, da mesma forma, um único mRNA pode ser regulado por diferentes miRNAs. Assim, os miRNAs promovem uma regulação orquestrada de seus alvos, controlando vias de sinalização e funções biológicas comuns (revisado por van Rooij *et al*., 2008; revisado por Goljanek-Whysall *et al*., 2012). Alguns miRNAs são especificamente ou altamente expressos nos músculos cardíaco e/ou esquelético e, portanto, são chamados músculo-específicos. O miR-1, miR-133, miR-206 e miR-499 estão envolvidos em diversos processos no músculo esquelético, como a miogênese, proliferação e diferenciação de mioblastos, especificação de tipos de fibras e regeneração muscular (Chen *et al*., 2006; van Rooij *et al*., 2009; revisado por Ge & Chen, 2011).

Muitas pesquisas e abordagens bioinformáticas demostraram que o miR-1, miR-133 e miR-206 silenciam genes envolvidos com o crescimento muscular, como a HDAC4 (*histone deacetylase 4*), SRF (*serum response fator*) e Pax7 (*paired box protein 7*), respectivamente (Chen *et al*., 2006; Williams *et al*., 2009; Chen *et al*., 2010; revisado por Goljanek-Whysall *et al*., 2012). Em mamíferos, o miR-1 e miR-206 promovem principalmente a diferenciação de

mioblastos, enquanto o miR-133 estimula a proliferação dessas células. O miR-499 tem como alvo o Sox6 (*SRY-box containing gene 6*), uma molécula que age na definição do fenótipo de contração rápida em fibras musculares (McCarthy *et al*., 2009; van Rooij *et al*., 2009). Wang *et al*. (2011) mostraram que a repressão traducional do Sox6 é mediada pelo miR-499 em fibras de contração lenta em *zebrafish*, revelando a participação desse miRNA na manutenção do fenótipo lento em fibras musculares.

1.6. *Cultura celular primária de mioblastos*

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

A linhagem celular C2C12 é constituída de mioblastos provenientes de camundongo (*Mus musculus*), sendo muito utilizada para a compreensão da regulação do crescimento e desenvolvimento muscular em mamíferos. No entanto, a extrapolação das informações obtidas nessas culturas para espécies de peixes é inadequada e não recomendada, e ainda não foram obtidas linhagens de células musculares provenientes desses animais. Dessa forma, para estudos relacionados ao músculo esquelético de peixes é necessário o estabelecimento de culturas celulares primárias de mioblastos (revisado por Johnston *et al*., 2011). As culturas primárias são aquelas preparadas diretamente do tecido de interesse, possuindo as mesmas características do tecido de origem, de modo que a cultura primária é o procedimento mais semelhante a estudos *in vivo*. No entanto, os ensaios em culturas primárias devem ser realizados com rapidez, pois as células primárias conseguem manter suas características originais apenas por um curto período de tempo, antes de entrarem em apoptose (Alves & Guimarães, 2010).

As culturas de mioblastos de peixes recapitulam as etapas do crescimento muscular pós-natal, no qual ocorre um comprometimento inicial dos mioblastos, proliferação e diferenciação dessas células, culminando com a formação de miotubos (revisado por Chargé & Rudnicki,

2004; Gabillard *et al*., 2010) (Figura 12). A importância das culturas de mioblastos reside no fato de fornecerem um ambiente com um menor número de variáveis daquelas encontradas no músculo esquelético *in vivo*, e permitirem as análises de diversas vias de sinalização sob condições controladas, o que possibilita um estudo mais aprofundado de moléculas regulatórias e o estabelecimento de suas funções nos diferentes estágios da cultura. Da mesma forma, os meios de cultivo dos mioblastos podem ser modificados para o teste de hipóteses relacionadas ao papel de nutrientes, hormônios e fatores transcricionais na regulação do processo de crescimento muscular (revisado por Johnston *et al*., 2011; Garcia de la serrana & Johnston, 2013).

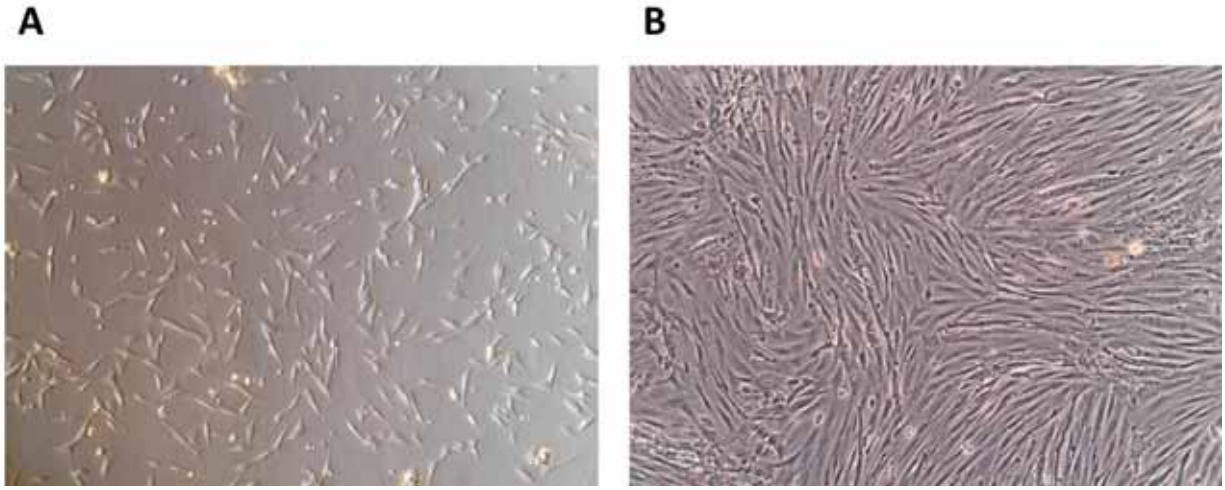


Figura 12: Culturas celulares primárias de mioblastos isolados de pacu, em período de proliferação (A) e diferenciação (B) (Imagens de autoria própria).

Além disso, a compartimentalização da musculatura esquelética de peixes permite o estabelecimento de culturas individuais de mioblastos provenientes dos músculos de contração rápida, que apresentam interesse econômico e valor comercial. O padrão em mosaico do músculo esquelético de mamíferos, com fibras de contração rápida localizadas entre fibras de contração lenta (revisado por Schiaffino & Reggiani, 2011), torna praticamente impossível o estudo separado dos tipos de músculo esquelético, abordando diferenças em processos como o desenvolvimento, crescimento, metabolismo e especificação de fenótipos, algo que é viável nos peixes e os tornam modelos ideais para este tipo de pesquisa.

2. HIPÓTESE

Considerando as informações descritas, nossa hipótese é de que os miRNAs miR-1, miR-133, miR-206 e miR-499 estão envolvidos na regulação do crescimento e dos fenótipos de contração do músculo esquelético no pacu.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos que visem esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos com o crescimento muscular do pacu podem contribuir para a elaboração de novas estratégias de criação e para a obtenção de melhorias em sua piscicultura intensiva, uma vez que estes mecanismos contribuem para alterações na celularidade do músculo esquelético e, consequentemente, estão diretamente relacionados ao aumento de massa muscular e qualidade de carne.

4. OBJETIVO

4.1. *Objetivo geral*

O objetivo de nosso trabalho foi avaliar a expressão do miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-499 e de seus supostos alvos, HDAC4, SRF, Pax7 e Sox6, nos músculos esqueléticos de contração rápida e lenta do pacu durante o crescimento, para fornecer novas informações quanto aos mecanismos moleculares que regulam o tecido muscular nessa espécie.

4.2. *Objetivos específicos*

- Avaliar a expressão dos miRNAs e de seus mRNAs alvo nos músculos esqueléticos de contração rápida e lenta de pacus em diferentes estágios de desenvolvimento;

- Avaliar a expressão do miRNA miR-499 e de seu mRNA alvo Sox6 entre os músculos esqueléticos de contração rápida e lenta dos pacus;

- Avaliar a expressão dos MRFs MyoD e Miogenina nos músculos esqueléticos de contração rápida e lenta de pacus em diferentes estágios de desenvolvimento, para a verificação dos mecanismos de proliferação e diferenciação de mioblastos.

- Avaliar a expressão *in vitro* dos miRNAs e de seus mRNAs alvo em culturas celulares primárias de mioblastos de pacus.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. *Coleta de amostras*

Nosso estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME), localizado no Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Os pacus foram obtidos da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), no Polo Regional da Alta Sorocabana, com sede em Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. Nós avaliamos três estágios de desenvolvimento: larval (30 dias), juvenil (90 dias; 150 dias) e adulto (2 anos). Os peixes foram cultivados à temperatura de 28ºC, em caixas d'água de 0,5 m^3 dotadas de sistemas distintos de recirculação de água. Os pacus foram eutanasiados com excesso de benzocaína, em uma concentração acima de 250 mg/L, anteriormente à mensuração do peso corporal (g), comprimento total (cm) e coleta das amostras musculares (n=6 por grupo). As amostras de músculo de contração rápida foram coletadas da região epaxial, próximo à cabeça, e as amostras de músculo de contração lenta foram coletadas próximo à linha lateral. Nós não coletamos a musculatura de contração lenta de pacus de 30 e 90 dias dada a dificuldade de isolamento desse tecido nesses animais. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80ºC. Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – número de protocolo 506) do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil (Anexo 1).

5.2. *Cultura de mioblastos*

Foram utilizados pacus juvenis com 31.75 ± 2.53 g (média ± DP; n=10 por cultura) para o estabelecimento das culturas primárias de mioblastos. Os resultados foram obtidos a partir de 6 culturas celulares independentes.

O protocolo para isolamento e cultura de mioblastos foi realizado conforme descrição de Bower & Johnston (2009). Inicialmente, os pacus foram imersos em álcool 70% para esterilização das superfícies externas. Amostras de músculo de contração rápida foram coletadas da região epaxial e colocadas em meio de extração (DMEM, 9 mM $NaHCO_3$, 20 mM HEPES, 15% soro de cavalo e 1% antibióticos; Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, os músculos passaram por um processo de dissociação mecânica utilizando-se bisturis e os fragmentos foram lavados duas vezes em meio de lavagem (DMEM, 9 mM $NaHCO_3$, 20 mM HEPES e 1% antibióticos; Sigma-Aldrich, USA), sendo posteriormente centrifugados (1200 rpm; 5 min; 4ºC). Foi realizada

a digestão enzimática das amostras pela adição de 0,2% de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, USA) em DMEM, durante 1 hora e 10 minutos à temperatura ambiente e sob agitação. Os fragmentos foram centrifugados (1200 rpm; 20 min; 4ºC) e os pellets resultantes foram lavados duas vezes em meio de lavagem, sendo em seguida centrifugados novamente (1200 rpm; 10 min; 4ºC). Para a quebra dos contatos célula-célula foi adicionado 0,1% de tripsina (Sigma-Aldrich, USA) em meio de lavagem, durante 20 min à temperatura ambiente e sob agitação. A suspensão de células foi centrifugada (1200 rpm; 1 min; 4ºC) e o sobrenadante foi coletado e misturado ao meio de extração. Os pellets passaram por uma segunda digestão com tripsina, semelhante à primeira. Os sobrenadantes foram centrifugados (1200 rpm; 20 min; 4ºC) e o pellet resultante foi ressuspendido em meio completo (DMEM, 9 mM $NaHCO_3$, 20 mM HEPES, 10% soro fetal bovino e 1% antibióticos; Sigma-Aldrich, USA). A suspensão de células foi filtrada em *cell strainers* de 100 e 40 µm (Corning, USA). Após centrifugação (1200 rpm; 20 min; 4ºC), as células foram ressuspendidas novamente em meio completo, colocadas em câmara de Neubauer para a contagem celular e diluídas na concentração de 1×10^6 células/mL. As células suspensas em meio completo foram colocadas em placas previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina, e foram incubadas em estufa a 22ºC durante, aproximadamente, 12 dias. Os mioblastos foram estudados em três fases das culturas primárias: comprometimento e proliferação inicial (2-4 dias), proliferação final e fusão inicial (5-8 dias), e fusão final e formação de miotubos (9-12 dias). O meio completo foi trocado a cada dois dias e a morfologia dos mioblastos foi monitorada regularmente.

5.3. *Extração, quantificação e análise da integridade do RNA*

O RNA total foi extraído das amostras musculares e culturas de mioblastos através do reagente *TRIzol*® (Life Technologies, USA), seguindo as orientações do fabricante. As amostras congeladas foram trituradas com o homogeneizador de tecidos *IKA® T-25 Digital Ultra-Turrax*® (IKA, Germany) em 1 mL de *TRIzol*®/50-100 mg de tecido muscular, enquanto que os mioblastos em cultura foram homogeneizados com *cell scrapers* em 1 mL de *TRIzol*®/*well*. O homogeneizado foi transferido para um tubo de 1,5 mL e incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente. Foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio e, posteriormente, os tubos foram agitados vigorosamente e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4ºC. A fase aquosa formada após a centrifugação foi coletada e o RNA foi precipitado através da incubação com 0,5 mL de álcool

isopropílico, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4ºC, e o pellet de RNA resultante foi lavado com 1 mL de etanol 75%. O material foi centrifugado a 7500 rpm por 5 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Após secagem, o pellet de RNA foi dissolvido em *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA) e armazenado a -80ºC.

Para a quantificação do RNA foi utilizado o espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare, USA), que forneceu a medida de absorbância a 260 nm. Também foi realizada a medida de absorbância a 280 nm, que identifica a quantidade de proteínas e permite uma análise da pureza do RNA extraído, garantida pela obtenção de uma razão 260/280 nm superior a 1.8. Nós utilizamos somente amostras com razão igual ou superior a 1.8.

A integridade do RNA total extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. A agarose foi dissolvida em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 nM EDTA). Uma alíquota de 1 µL do RNA total foi adicionada a 5 µL de uma solução contendo o tampão de corrida OrangeG e o corante *GelRed*® (Biotium, USA). Essa mistura foi aplicada no gel e submetida à corrida eletroforética a 120 V por cerca de 1 hora e 30 minutos. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta e a integridade do RNA total extraído foi confirmada pela presença das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S. Além disso, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar no sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent, USA), que fornece um número de integridade do RNA (RIN) baseado nas bandas do 28S e 18S. A amostra de RNA é classificada num sistema numérico de 1 a 10, sendo 1 o perfil de maior degradação e 10 o perfil de maior integridade. Nós utilizamos somente amostras com um RIN igual ou superior a 7.0.

5.4. *Tratamento com DNAse e transcrição reversa*

Durante os procedimentos de extração do RNA, pode ser que ocorra contaminação das amostras por DNA genômico. Esse DNA contaminante pode, eventualmente, servir de molde durante a amplificação pela PCR, gerando um produto que não corresponde ao fragmento de interesse. Dessa forma, o RNA total extraído foi submetido ao tratamento com o kit *DNase I Amplification Grade* (Life Technologies, USA), a fim de eliminar qualquer possível resíduo de DNA genômico contaminante das amostras. Conforme as instruções do protocolo, 2 µL de 10X *DNase I Reaction Buffer*, 2 µL de *DNase I Amplification Grade* (1 U/µL) e *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA), na quantidade suficiente para completar 20 µL de solução, foram adicionados a 2 µg do RNA total de cada amostra. Essa

solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 2 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65ºC por 10 minutos, para a total inativação da enzima *DNase I*.

Para as análises de expressão dos miRNAs foi realizada a transcrição reversa do RNA pelo *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies, USA) combinado com o kit *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life Technologies, USA), conforme instruções do protocolo. As amostras foram diluídas com *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA) para uma concentração de 2 ng/µL. Foram adicionados 1,5 µL de *10X RT Buffer*, 0,15 µL de *dNTPs* (100mM), 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL), 0,19 µL de *RNase Inhibitor* (20 U/µL) e 3 µL de *RT Primer*, específicos para cada miRNA. Cada amostra foi incubada a 16ºC por 30 minutos, a 42ºC por 30 minutos e a 85ºC por 5 minutos. Para as análises de expressão dos mRNAs foi realizada a transcrição reversa do RNA pelo *High Capacity cDNA archive kit* (Life Technologies, USA), em que 2 µg do RNA total tratado com *DNase I* (22 µL de solução) foram acrescidos de 10 µL de *10X RT Buffer*, 4 µL de *25X dNTP Mix* (100mM), 5 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µL), 10 µL de *10X RT Random Primers* e 5 µL de *RNase Inhibitor* (20 U/µL). O volume final da reação foi ajustado para 100 µL com *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA). Cada amostra foi incubada a 25ºC por 10 minutos, a 37ºC por 120 minutos e a 85ºC por 5 minutos. Os produtos da reação de transcrição reversa foram armazenados a -20ºC e utilizados nas reações de PCR.

5.5. *Desenho de primers e RT-PCR*

Primers para os mRNAs referentes ao HDAC4, SRF, Pax7 e Sox6 foram desenhados a partir de sequências de *Danio rerio* publicadas no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) (números de acesso: HDAC4 – NM_001039358.2; SRF – NM_001110526.1; Pax7 – AF014367.1; Sox6 – NM_001123009.1). Esses primers foram utilizados para amplificação dos cDNAs obtidos do músculo esquelético do pacu, pela técnica de RT-PCR (PCR tradicional). A cada 1 µL de cDNA foram adicionados 0,5 µL de *Primer Forward* (10 µM), 0,5 µL de *Primer Reverse* (10 µM), 0,5 µL de *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA) e 22,5 µL de *Platinum® PCR Supermix* (Life Technologies, USA), em um volume final de 25 µL de solução. Os produtos da reação foram sequenciados no *ABI 3500 Genetic Analyzer®* (Life Technologies, USA), utilizando-se os

procedimentos do *BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* (Life Technologies, USA). Cada sequência nucleotídica parcial obtida foi analisada através da ferramenta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), para confirmar o fragmento amplificado com aqueles já publicados provenientes de outros peixes teleósteos. Primers para os mRNAs referentes à MyoD, Miogenina e 18S foram desenhados a partir de sequências de *Piaractus mesopotamicus* publicadas no NCBI (números de acesso: MyoD – FJ686692.1; Miogenina – FJ810421.1; 18S – GQ337002.1). As sequências parciais dos mRNAs HDAC4, SRF, Pax7, Sox6, MyoD, Miogenina e 18S provenientes do pacu foram utilizadas para o desenho de primers específicos para a PCR em Tempo Real, através do software *Primer Express 3.0.1.*® (Life Technologies, USA).

5.6. *PCR em Tempo Real*

Os níveis de expressão dos miRNAs e mRNAs foram detectados por PCR em Tempo Real, através da plataforma *QuantStudio™12K Flex Real-Time PCR System* (Life Technologies, USA). Os níveis de expressão foram normalizados pelo RNA ribossomal 18S, cuja expressão foi constante entre todas as amostras, e a quantificação relativa da expressão foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para que esse método de quantificação relativa pudesse ser utilizado, foi necessário fazer sua validação, determinando se a eficiência de amplificação dos genes alvo é similar à eficiência de amplificação do gene endógeno. A análise dessas eficiências de amplificação foi feita através da Curva-Padrão (CP), composta por uma série de 7 diluições (1:10) a partir de uma solução inicial que continha cDNA das amostras musculares de todos os animais. O gráfico da CP apresentou 7 pontos e o grau de sua inclinação forneceu uma estimativa da eficiência de amplificação dos primers. A eficiência da reação de cada gene foi calculada pela seguinte fórmula: $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$, em que E = eficiência da reação expressa em %, e *slope* = valor do ângulo de inclinação da reta no gráfico. Um *slope* de -3.32 indica que a reação de amplificação teve 100% de eficiência, ou seja, a cada ciclo de PCR foi gerado o dobro do número de moléculas do ciclo anterior. Como os valores de *slope* foram aceitáveis (entre -3.8 e -3.3) (Patruno *et al*., 2008), as eficiências de amplificação para os genes alvo e endógeno foram adequadas e o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pôde ser aplicado.

Cada amostra de cDNA correspondente aos miRNAs foi amplificada através dos ensaios *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Life Technologies, USA) e *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life Technologies, USA), que contém primers e sondas de hidrólise específicos para o miR-1,

miR-133a, miR-133b, miR-206 e miR-499 (Tabela 2). Seguindo as orientações do protocolo, foram utilizados 1,3 µL de cDNA, 1 µL de *TaqMan® MicroRNA Assays*, 10 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* e 7,7 µL de *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA), totalizando um volume final de 20 µL de solução. Com relação aos mRNAs HDAC4, SRF, Pax7, Sox6, MyoD, Miogenina e 18S, as amostras de cDNA foram amplificadas utilizando-se o *Fast SYBR® Green Master Mix* (Life Technologies, USA) e primers sintetizados pela Life Technologies (USA), que foram desenhados através do software *Primer Express 3.0.1.*® (Life Technologies, USA) (Tabela 3). Os primers foram diluídos em *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA) e suas concentrações ajustada para 5 µM. Conforme instruções do fabricante, foram utilizados 2 µL de cDNA, 2 µL de *Primer Forward*, 2 µL de *Primer Reverse*, 12,5 µL de *Fast SYBR® Green Master Mix* (Life Technologies, USA) e 6,5 µL de *UltraPure™ Distilled Water DNAse, RNAse Free* (Life Technologies, USA), totalizando um volume final de 25 µL de solução.

As reações foram realizadas em duplicata, nas seguintes condições: 95ºC por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95ºC por 15 segundos e anelamento/extensão a 60ºC por 1 minuto. Para cada amostra foi gerado um gráfico de amplificação, que mostra o aumento da fluorescência (ΔRn) ao longo de cada ciclo da PCR. Para as amostras amplificadas com o *Fast SYBR® Green Master Mix* (Life Technologies, USA), foi feita a análise da Curva de Dissociação dos fragmentos ao término de cada PCR, um passo de 20 minutos em que a temperatura da reação aumenta gradualmente de 60 para 95ºC. O gráfico resultante permite detectar a presença de um ou mais produtos amplificados, pois produtos com diferentes tamanhos desnaturam em diferentes temperaturas, gerando mais de um pico de fluorescência. Dessa forma, a Curva de Dissociação possibilitou a avaliação da especificidade de amplificação de cada conjunto de primers, confirmada pela presença de um único pico de fluorescência.

Ao término de uma reação de PCR são necessários ajustes do *baseline* e *threshold* sobre os gráficos de amplificação, para uma análise exata dos dados de expressão. *Baseline* é o parâmetro correspondente ao nível basal de fluorescência emitida nos primeiros ciclos da PCR, antes do surgimento das curvas de amplificação. Deve-se estabelecer a faixa de ciclos correta do *baseline*, pois seu valor será subtraído do sinal fluorescente das curvas de amplificação. *Threshold* é o limiar de detecção de fluorescência, fixado para a obtenção de um valor de Ct para cada animal e posicionado na região exponencial da curva de amplificação, local onde a eficiência da PCR é maior. Foi adicionado um controle negativo para cada gene nas placas de

reação e, após ajuste dos parâmetros, foram obtidos valores de Ct para cada animal, tanto referentes aos genes alvo quanto ao gene endógeno. Após obtenção do Ct médio das duplicatas, foi calculado o valor de ΔCt ($Ct_{gene\ alvo} - Ct_{gene\ endógeno}$) e de ΔΔCt ($\Delta Ct_{amostra} - \Delta C_{amostra\ calibradora}$). A amostra calibradora corresponde a um animal controle ou um estágio particular do desenvolvimento, sendo utilizada como base para comparação dos resultados. Para os dados de peso e comprimento e durante o crescimento do músculo de contração rápida, nós utilizamos a amostra com menor valor de expressão do grupo 30 dias como calibradora. A amostra com menor valor de expressão do grupo 150 dias foi utilizada como calibradora para os dados durante o crescimento do músculo de contração lenta e entre as musculaturas de contração rápida e lenta. Para os dados das culturas de mioblastos, nós utilizamos a amostra com menor valor de expressão do grupo 2-4 dias como calibradora. A quantificação relativa dos dados de expressão foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), expressa em *fold-change*.

5.7. *Análises estatísticas*

As análises estatísticas do peso e comprimento dos pacus, dos dados de expressão durante o crescimento do músculo de contração rápida e dos dados das culturas de mioblastos foram realizadas pelo teste paramétrico one-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. O teste t não pareado foi utilizado para os dados de expressão durante o crescimento do músculo de contração lenta e entre as musculaturas de contração rápida e lenta dos pacus de 150 dias e 2 anos. O nível de significância adotado foi de 5% (*GraphPad Prism 5 Software*, USA).

6. REFERÊNCIAS GERAIS

Alves, E.A. e Guimarães, A.C.R. Cultivo celular. In: Molinaro, E.M., Caputo, L.F.G. e Amendoeira, M.R.R. (Ed) *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora da EPSJV - Fiocruz, 2010. 254p.

Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal, D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C. Portella, M.C. e Dal Pai-Silva, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*. v. 41(8), p. 997-1004, 2010.

Biga, P.R. e Goetz, F.W. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. v. 291(5), p. R1327-R1337, 2006.

Bower, N.I. e Johnston, I.A. Selection of reference genes for expression studies with fish myogenic cell cultures. *BMC Molecular Biology*. v. 10(80), p. 1-11, 2009.

Buckingham, M. e Rigby, P.W.J. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Developmental Cell*. v. 28(3), p. 225-238, 2014.

Chargé, S.B.P. e Rudnicki, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*. v. 84(1), p. 209-238, 2004.

Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L. e Wang, D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*. v. 38(2), p. 228-233, 2006.

Chen, J.F., Tao, Y., Li. J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X. e Wang, D.Z. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *The Journal of Cell Biology*. v. 190(5), p. 867-879, 2010.

Chuang, J.C. e Jones, P.A. Epigenetics and microRNAs. Pediatric Research. v. 61(Pt.2), p. 24R-29R, 2007.

Currie, P.D. e Ingham, P.W. Induction and patterning of embryonic skeletal muscle cells in the zebrafish. In: Johnston, I.A. (Ed) *Muscle development and growth. Fish Physiology 18*. San Diego: Academic Press, 2001. 327p.

Encyclopaedia Britannica Online, trunk musculature: salmon, 2010. Disponível em: <http://global.britannica.com/EBchecked/media/147092/Lateral-view-of-the-trunk-muscles-of-a-salmon>. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

Froehlich, J.M., Galt, N.J., Charging, M.J., Meyer, B.M. e Biga, P.R. In vitro indeterminate teleost myogenesis appears to be dependent on Pax3. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. v. 49(5), p. 371-385, 2013.

Gabillard, J.C., Sabin, N. e Paboeuf, G. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell and Tissue Research*. v. 342, p. 471-477, 2010.

Garcia de la serrana, D. e Johnston, I.A. Expression of heat shock protein (Hsp90) paralogues is regulated by amino acids in skeletal muscle of atlantic salmon. *PLoS ONE*. v. 8(9), e74295, 2013.

Ge, Y. e Chen, J. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*. v. 10(3), p. 441-448, 2011.

Goljanek-Whysall, K., Sweetman, D. e Münsterberg, A.E. microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clinical Science*. v. 123(11), p. 611-625, 2012.

Halpern, M.E., Ho, R.K., Walker, C. e Kimmel, C.B. Induction of muscle pioneers and floor plate is distinguished by the zebrafish *no tail* mutation. *Cell*. v. 75(1), p. 99-111, 1993.

Johansen, K.A. e Overturf, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*. v. 7(6), p. 576-587, 2005.

Johnston, I.A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture*. v. 177, p. 99-115, 1999.

Johnston, I.A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Robertson, B., Paxton, C.G.M. e Burt, M.L. Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *The Journal of Experimental Biology*. v. 206(Pt 8), p. 1337-1351, 2003.

Johnston, I.A., Abercromby, M., Vieira, V.L.A., Sigursteindóttir, R.J., Kristjánsson, B.K., Sibthorpe, D. e Skúlason, S. Rapid evolution of muscle fibre number in post-glacial populations of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *The Journal of Experimental Biology*. v. 207, p. 4343-4360, 2004.

Johnston, I.A., Bower, N.I. e Macqueen, D.J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*. v. 214(Pt 10), p. 1617-1628, 2011.

Junqueira, L.C. e Carneiro, J. *Histologia Básica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

Kjaer, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews*. v. 84, p. 649-698, 2004.

Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Dulos, G.J. e Osse, J.W.M. Myosatellite cells of *Cyprinus carpio* (Teleostei) in vitro: isolation, recognition and differentiation. *Cell and Tissue Research*. v. 261, p. 173-181, 1990.

Lee, C.T., Risom, T., Strauss e W.M. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA and Cell Biology*. v. 26(4), p. 209-218, 2007.

Livak, K.J. e Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. v. 25(4), p. 402-408. 2001.

Ma, P.C.M., Rould, M.A., Weintraub, H. e Pabo, C.O. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*. v. 77, p. 451-459, 1994.

McCarthy, J.J., Esser, K.A., Peterson, C.A. e Dupont-Versteegden, E.E. Evidence of myomiR network regulation of β-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiological Genomics*. v. 39(3), p. 219–226, 2009.

Michelin, A.C., Justulin, L.A., Delella, F.K., Padovani, C.R., Felisbino, S.L. e Dal-Pai-Silva, M. Differential MMP-2 and MMP-9 activity and collagen distribution in skeletal muscle from pacu (*Piaractus mesopotamicus*) during juvenile and adult growth phases. *The Anatomical Record*. v. 292, p. 387-395, 2009.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2011*. 2013. 60p.

Patruno, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B. e Radaelli, G. Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell and Tissue Research*. v. 331, p. 643-658, 2008.

Rescan, P.Y. Regulation and fucntions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. v. 130, p. 1-12, 2001.

Rowlerson, A. e Veggetti, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. (Ed) *Muscle development and growth. Fish Physiology 18*. San Diego: Academic Press, 2001. 327p.

Sänger, A.M. e Stoiber, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: Johnston, I.A. (Ed) *Muscle development and growth. Fish Physiology 18*. San Diego: Academic Press, 2001. 327p.

Santos, V.B., Santos, R.S., Salomão, R.A.S. e Silva, R.M. Reprodução induzida de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com o uso de diferentes hormônios comerciais. *Pesquisa & Tecnologia*. v. 9(1), p. 1-6, 2012.

Schiaffino, S. e Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal msucles. *Physiological Reviews*. v. 91, p. 1447-1531, 2011.

Sempere, L.F., Cole, C.N., McPeek, M.A. e Peterson, K.J. The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *Journal of Experimental Zoology – Molecular and Developmental Evolution*. v. 306B, p. 575-588, 2006.

Stickney, H.L., Barresi, M.J.F. e Devoto, S.H. Somite development in zebrafish. *Developmental Dynamics*. v. 219, p. 287-303, 2000.

Sttelabotte, F., Dobbs-McAuliffe, B., Fernández, D.A., Feng, X. e Devoto, S.H. Dynamic somite cell rearrangements lead to distinct waves of myotome growth. *Development*. v. 134(7), p. 1253-1257, 2007.

Urbinati, E.C. e Gonçalves, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B and Gomes, L.C. (Ed) *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2005. 470p.

Van Leeuwen, J.L. A mechanical analysis of myomere shape in fish. *The Journal of Experimental Biology*. v. 202, p. 3405-3414, 1999.

van Rooij, E., Liu, N. e Olson, E.N. microRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*. v. 24(4), p. 159-166, 2008.

van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm Jr., R.J. e Olson, E.N. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental Cell*. v. 17(5), p. 662-673, 2009.

Wang, X., Ono, Y., Tan, S.C., Chai, R.J., Parkin, C. e Ingham, P.W. Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development*. v. 138(20), p. 4399-4404, 2011.

Williams, A.H., Liu, N., van Rooij, E. e Olson, E.N. MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology*. v. 21(3), p. 461-469, 2009.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. and Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. v. 11(3), p. 228-234, 2009.

Yusuf, F. e Brand-Saberi, B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochemistry and Cell Biology*. v. 138, p. 187-199, 2012.

Zanou, N e Gailly, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell and Molecular Life Sciences*. v. 70(21), p. 4117-4130, 2013.

7. ARTIGO

Differential microRNA expression in fast- and slow-twitch skeletal muscle of *Piaractus mesopotamicus* during growth.

Bruno Oliveira da Silva Duran and Maeli Dal-Pai-Silva

Abstract

Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a Brazilian fish with high economic interest for pisciculture due to features such as rusticity and fast growth. Postnatal growth of skeletal muscle in fish occurs by hyperplasia and/or hypertrophy, processes that are dependent on the proliferation and differentiation of myoblasts. A class of small noncoding RNAs, known as microRNAs (miRNAs), represses the expression of target mRNAs, and many studies demonstrate that miR-1, miR-133, miR-206 and miR-499 regulate different processes in skeletal muscle through the mRNA silencing of HDAC4, SRF, Pax7 and Sox6, respectively. The aim of our work was to evaluate the expression of miRNAs and their putative target mRNAs in fast- and slow-twitch skeletal muscle of pacu during growth. Our results revealed an inverse correlation between the expression of miRNAs and their target mRNAs, and there was evidence that miR-1, miR-133 and miR-206 may regulate the proliferation and differentiation of myoblasts. On the other hand, miR-499 was highly expressed in slow-twitch muscle, which suggests its involvement in the specification and maintenance of the slow phenotype in muscle fibres. miRNA expression exhibited variations between different development stages and between distinct muscle twitch phenotypes. This work provided the first identification of miRNA expression profiles related to skeletal muscle in pacu and suggests an important role of these molecules in this tissue.

Keywords: Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Skeletal muscle, MicroRNA, Myogenic regulatory factors (MRFs).

Introduction

Piaractus mesopotamicus, popularly known as pacu, is an important economically desirable Brazilian roundfish, characterized by rusticity, high fertility, fast growth and tasty

meat, reaching up to 20 kilograms (Santos *et al*., 2012). Roundfish represent the majority of native fish farmed, accounting for about 33.5% of national production, and have high market value to Brazilian fishery and pisciculture (MPA, 2013). Although zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*) are widely used as model organisms for the understanding of many biological processes, there are limitations in the study of muscle during fish growth, because these animals reach small sizes (Froehlich *et al*., 2013). Pacu is an excellent experimental model for this kind of study because of its large body size, indicating that, in addition to its high economic interest, it also exhibits importance for scientific research.

In most fish, skeletal muscle constitutes ~60% of body mass and comprises two major fibre types: fast-twitch muscle fibres, which comprise the edible part of the fish, and slow-twitch muscle fibres (Sänger & Stoiber, 2001; Almeida *et al*., 2010). Postnatal muscle growth in fish involves cells localized at the periphery of muscle fibres, known as satellite cells. These cells give rise to myoblasts, whose proliferation and differentiation are the mechanisms that promote hyperplasia (increase in muscle fibres number) and hypertrophy (increase in muscle fibre size) (Rowlerson & Veggetti, 2001; Johnston *et al*., 2011), processes regulated by several transcription factors, such as myogenic regulatory factors (MRFs). MRFs include MyoD, which regulates the activation and proliferation of myoblasts, and Myogenin, which is involved in the differentiation and fusion of these cells (Johansen & Overturf, 2005; Almeida *et al*., 2010).

Small noncoding regulatory RNAs, such as microRNAs (miRNAs), also play an important role in vertebrate muscle development. The primary function of miRNAs is the post-transcriptional gene regulation, through the translational inhibition and decay of messenger RNAs (mRNAs) (Ge & Chen, 2011). Combinatorial regulation is a common feature; a miRNA may have several target mRNAs and, similarly, a single mRNA can be targeted by different miRNAs. Thus, miRNAs promote an orchestrated regulation of their targets, controlling signaling pathways and common biological functions (van Rooij *et al*., 2008; Goljanek-Whysall *et al*., 2012). Some miRNAs are specifically or highly expressed in cardiac and/or skeletal muscles and therefore are called muscle-specific. miR-1, miR-133, miR-206 and miR-499 are involved in several processes in skeletal muscle, like myogenesis, proliferation and differentiation of myoblasts, specification of fibre types and muscle regeneration (Chen *et al*., 2006; van Rooij *et al*., 2009; Ge & Chen, 2011).

Many studies and bioinformatics approaches have demonstrated that miR-1, miR-133 and miR-206 silence genes involved in muscle growth, like HDAC4 (histone deacetylase 4), SRF

(serum response factor) and Pax7 (paired box protein 7), respectively (Chen *et al*., 2006; Williams *et al*., 2009; Chen *et al*., 2010; Goljanek-Whysall *et al*., 2012). In mammals, miR-1 and miR-206 mainly promote the differentiation of myoblasts, whereas miR-133 stimulates the proliferation of these cells. miR-499 targets Sox6 (SRY-box containing gene 6), a molecule that acts in the definition of fast-twitch muscle fibres phenotype (McCarthy *et al*., 2009; van Rooij *et al*., 2009). Wang *et al*. (2011) demonstrated in zebrafish that translational repression of Sox6 is mediated by miR-499, revealing the participation of this miRNA in the maintenance of slow-twitch muscle fibres phenotype.

Studies that aim to clarify the molecular mechanisms involved in muscle growth of pacu may contribute to improvements in its intensive farming, because they are directly related to the increase of muscle mass and meat quality. We hypothesized that miRNAs may be involved in the regulation of skeletal muscle growth and twitch phenotypes in pacu. The aim of our work was to evaluate the expression of miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-499 and their putative targets, HDAC4, SRF, Pax7 and Sox6, to provide new information on the molecular mechanisms that regulate pacu muscle.

The fish myoblast culture, an *in vitro* model, is arising as a very useful tool to understand the regulation of muscle growth and development (Johnston *et al*., 2011). Myoblast cell culture recapitulates the steps of postnatal muscle growth (Chargé & Rudnicki, 2004; Gabillard *et al*., 2010) and provides an environment with better variable control, which allows the examination of regulatory molecules under precisely controlled conditions (Bower & Johnston, 2009). Therefore, the pacu myoblast culture is an excellent model to complement our study and understand the regulation of muscle growth performed by miRNAs.

Material and methods

Sample collection

Pacus were obtained from the São Paulo Agency for Agribusiness Technology (APTA), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. We evaluated three development stages: larvae (30 days), juvenile (90 days; 150 days) and adult (2 years). Fish were farmed at 28ºC in storage tanks of 0,5 m^3 equipped with distinct systems of water circulation. Animals were euthanized with an excess of benzocaine at a concentration exceeding 250 mg/L, prior to the measurement of body weight (g) and total length (cm) (Table 1), and the collection of muscle samples (n=6 per group). Fast-twitch muscle was collected from the epaxial region, near the head, and slow-twitch muscle

was collected near the lateral line. We did not collect slow-twitch muscle from 30 and 90-year-old pacus given the difficulty to isolate this tissue in these animals. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80ºC. This work was approved by Ethics Committee on Animal Use (CEUA – protocol number 506) of Biosciences Institute, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Table 1: Body weight (g) and total length (cm) of pacu in different groups. Data are expressed as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

Groups	Body weight (g)	Total lenght (cm)
30 days	$1.87 \pm 0.44^{(a)}$	$3.55 \pm 0.27^{(a)}$
90 days	$36.73 \pm 3.73^{(a)}$	$10.57 \pm 1.39^{(b)}$
150 days	$93.23 \pm 10.21^{(a)}$	$13.32 \pm 0.67^{(c)}$
2 years	$1713.33 \pm 190.96^{(b)}$	$38.97 \pm 1.16^{(d)}$

Myoblast culture

Juvenile pacus with 31.75 ± 2.53 g (mean ± SD; n=10 per culture) were used for the establishment of primary myoblast cultures. The results were obtained from six independent cell cultures.

The protocol for the isolation and culture of myoblasts was performed according to Bower & Johnston (2009). Samples of fast-twitch muscle were collected from the epaxial region and mechanically dissociated with scalpels. The fragments were enzymatically digested with 0.2% collagenase type I (Sigma-Aldrich, USA) and with 5% trypsin (Sigma-Aldrich, USA), allowing the release of muscle cells. The suspension of cells was filtered in cell strainers (Corning, USA) to remove debris and resuspended in media with DMEM, 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (Sigma-Aldrich, USA). After cell counting in a Neubauer chamber, the cells were diluted at a concentration of 1×10^6 cells/mL and plated in wells previously treated with poly-L-lysine e laminin, which have high affinity for the myoblasts. The myoblasts were incubated at 22ºC during 12 days and were studied in three phases of the primary cultures: commitment and early proliferation (2-4 days), late proliferation and early fusion (5-8 days), and late fusion and myotube formation (9-12 days). The media was changed every two days and the morphology of myoblasts was monitored regularly.

miRNAs and mRNAs expression

Total RNA was extracted from muscle samples and myoblast cultures using *TRIzol® Reagent* (Life Technologies, USA), according to the manufacturer's recommendations. We performed RNA quantification and an analysis of RNA purity and integrity. Extracted RNA was submitted to treatment with *DNase I Amplification Grade* (Life Technologies, USA) to eliminate any possible contaminating genomic DNA from the samples. For miRNA expression, RNA reverse transcription was performed by *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies, USA) combined with *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life Technologies, USA), according to the protocol instructions. For mRNA expression, RNA reverse transcription was performed using the *High Capacity cDNA archive kit* (Life Technologies, USA), following the manufacturer's guidelines.

The expression levels of miRNAs and mRNAs were detected by real-time PCR using the *QuantStudio™12K Flex Real-Time PCR System* (Life Technologies, USA). Each cDNA sample corresponding to a miRNA was amplified by *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Life Technologies, USA) and *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life Technologies, USA), which contains primers and specific probes to miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 and miR-499 (Table 2). For the HDAC4, SRF, Pax7, Sox6, MyoD, Myogenin and 18S mRNA, cDNA samples were amplified by *Fast SYBR® Green Master Mix* (Life Technologies, USA) and primers synthesized by Life Technologies (USA), which were designed using the *Primer Express 3.0.1.*® (Life Technologies, USA) (Table 3). Relative quantification of expression was performed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Expression levels were normalized by 18S ribosomal RNA (18S), whose expression was constant among all samples.

Table 2: *TaqMan*® assays used for miRNA amplification by real-time PCR.

miRBase ID	miRBase accession number	Target sequence
dre-miR-1	MIMAT0001768	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
dre-miR-133a-3p	MIMAT0001830	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG
dre-miR-133b-3p	MIMAT0001831	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA
dre-miR-206-3p	MIMAT0001866	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
dre-miR-499	MIMAT0003749	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUUA

Table 3: Primers used for HDAC4, SRF, Pax7, Sox6, MyoD, Myogenin and 18S mRNA amplification by real-time PCR.

Gene	Forward	Reverse
HDAC4	CCAGGACACCATGCTGAAGA	CGATGGCCACAGAGTTGAAA
SRF	TCTGATAGCCAGCGTTCACTGT	TGCTCACCTGCATGGTGGTA
Pax7	GTCGATGCTGTGTTTGGTCTTC	CGAGGATGAGTGCGATAAGAAA
Sox6	TTCCGACGCATCAACAGTTTAA	GCAAATGACACGCCTGCAT
MyoD	CGCCATCAGCTACATCGAG	ATCCAGGACGGGGTAGTAGG
Myogenin	TCCCAGACCAGAGGTTTTATGAA	TCTTGGTATCCTGCTTGGTCAA
18S	CGGAATGAGCGTATCCTAAACC	GCTGCTGGCACCAGACTTG

Statistical analysis

Statistical analysis of weight and length, expression data during growth of fast-twitch muscle and data from myoblast cultures were performed using parametric one-way ANOVA test, followed by Tukey's multiple comparisons test. The unpaired t-test was used for the expression data during growth of slow-twitch muscle and between fast- and slow-twitch of 150-day-old and 2-year-old pacus. Statistical significance was set at 5% ($p<0.05$) (GraphPad Prism 5 Software, USA).

Results

miRNAs and target expression

The expression of miR-1 in fast-twitch muscle was significantly higher in 2-year-old pacus compared with other groups ($p<0.001$), unlike the expression of HDAC4, which was significantly lower in 2-year-old pacus than in other animals ($p<0.001$). In slow-twitch muscle this variation was also observed, with miR-1 significantly higher in 2-year-old pacus ($p<0.001$) and HDAC4 significantly lower in these animals ($p<0.001$) (Figure 1).

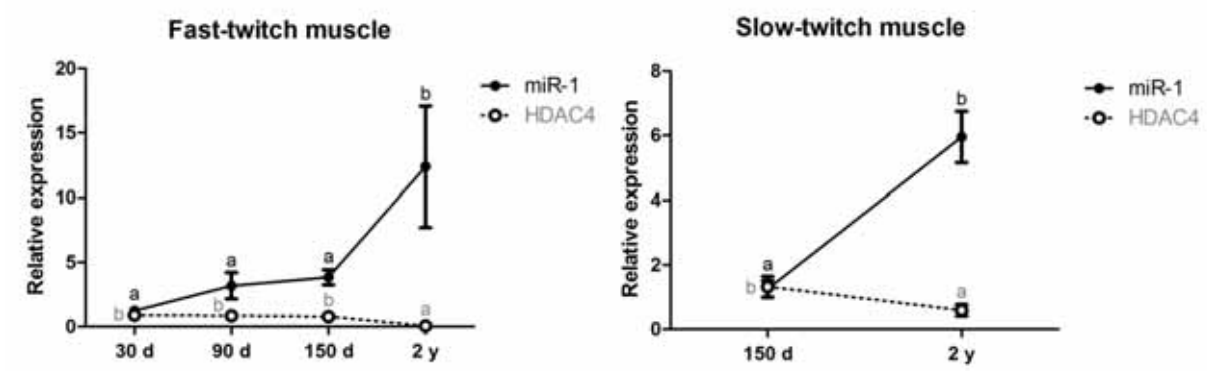


Figure 1: Relative expression of miR-1 and HDAC4 in fast- and slow-twitch muscles of pacu during growth. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

In fast-twitch muscle, miR-133a and miR-133b exhibited a significant increase in 90-day-old, 150-day-old and 2-year-old animals compared with 30-day-old ($p<0.05$), whereas SRF exhibited lower expression in 2-year-old pacus compared with other groups and lower expression at 90 and 150 days compared with 30-day-old animals ($p<0.01$). The expression of miR-133a, miR-133b and SRF in slow-twitch muscle was not statistically different between 150-day-old and 2-year-old pacus ($p>0.05$) (Figure 2).

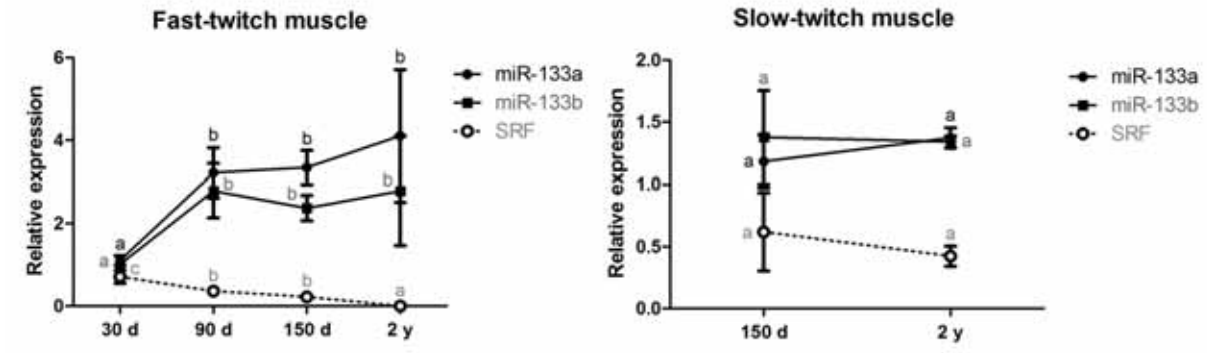


Figure 2: Relative expression of miR-133a, miR-133b and SRF in fast- and slow-twitch muscles of pacu during growth. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

The expression of miR-206 in fast-twitch muscle was higher in 2-year-old pacus ($p<0.05$), in contrast to the expression of Pax7, whose levels were lower in 2-year-old pacus compared with other groups and in 150-day-old animals compared with 30-day-old pacus ($p<0.05$). The same difference was seen in slow-twitch muscle, with higher expression of miR-

206 in 2-year-old pacus ($p<0.001$) and lower expression of Pax7 in these fish ($p<0.01$) (Figure 3).

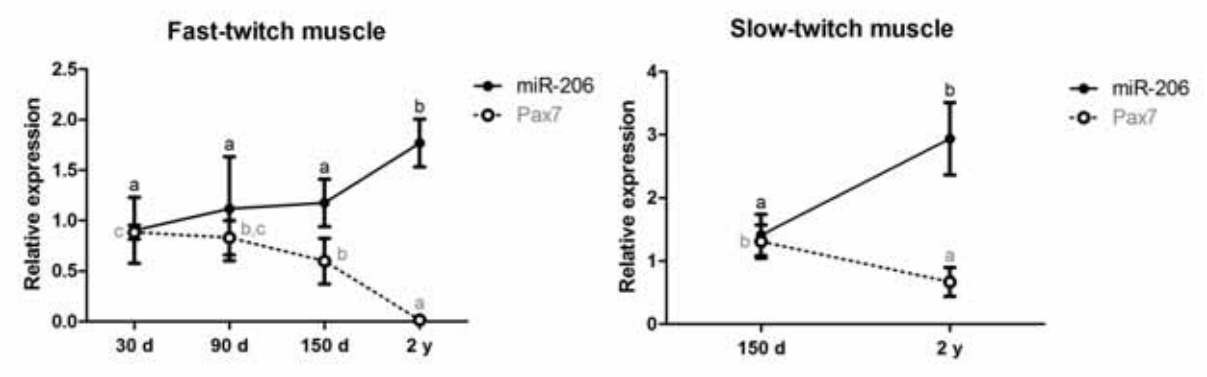


Figure 3: Relative expression of miR-206 and Pax7 in fast- and slow-twitch muscles of pacu during growth. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

In fast-twitch muscle, the expression of miR-499 was significantly lower in 150-day-old and 2-year-old pacus than in other groups, and there was a decrease in 90-day-old pacus compared with 30-day-old animals ($p<0.05$). Sox6 exhibited higher levels in 2-year-old pacus and higher expression at 150 days compared with 30- and 90-day-old pacus ($p<0.001$). In slow-twitch muscle, miR-499 was not statistically different between 150-day-old and 2-year-old pacus ($p=0.059$), whereas expression of Sox6 was significantly lower in 2-year-old pacus ($p<0.001$) (Figure 4).

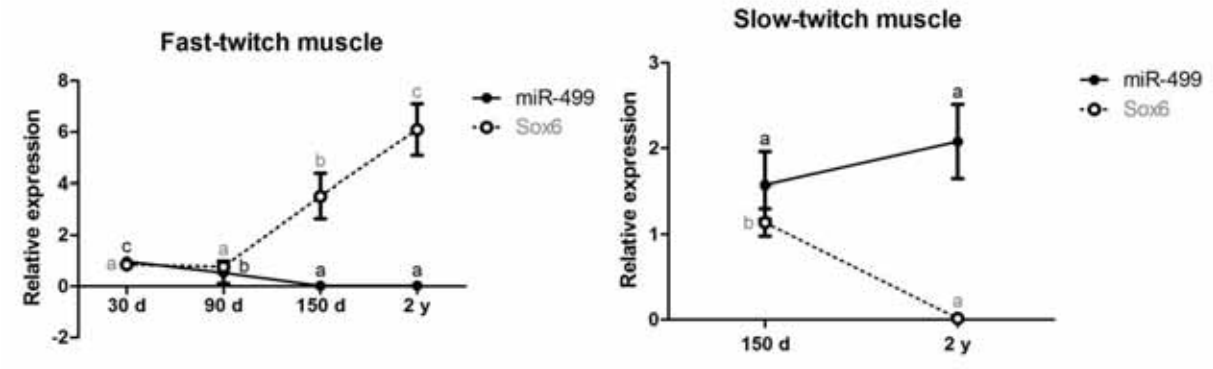


Figure 4: Relative expression of miR-499 and Sox6 in fast- and slow-twitch muscles of pacu during growth. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

Given the involvement of miR-499 in the specification and maintenance of muscle fibre phenotypes, the expression of this miRNA and Sox6 was also compared between fast- and slow-

twitch muscles of pacus. The expression of miR-499 was markedly higher in slow-twitch muscle, both at 150 days ($p<0.001$) and at 2 years ($p<0.001$). Sox6 levels were significantly higher in fast-twitch muscle in 150-day-old pacus ($p<0.05$) and were not statistically different between muscle types in 2-year-old pacus ($p=0.09$) (Figure 5).

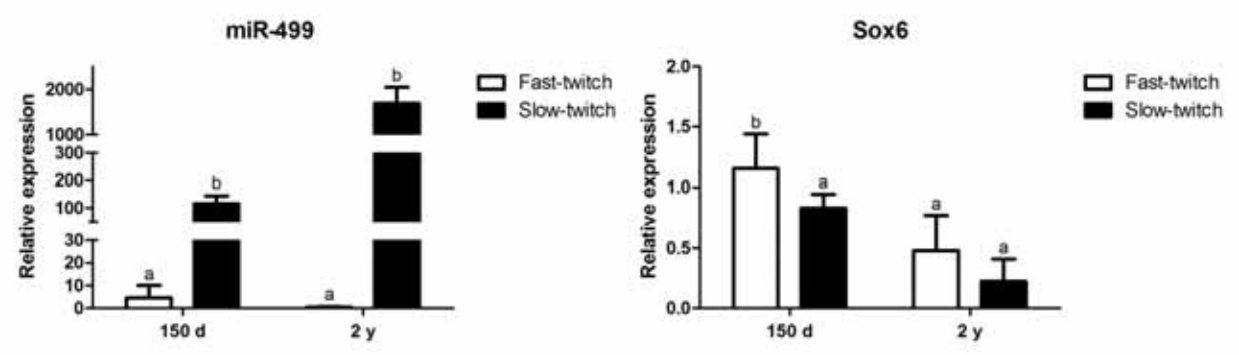


Figure 5: Relative expression of miR-499 and Sox6 between fast- and slow-twitch muscles in 150-day-old and 2-year-old pacus. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

In order to complement our study, we performed a bioinformatic prediction of interactions between miRNAs and their putative target mRNAs using the *RNAhybrid software* (BiBiServ, Germany) (Supplementary data 1).

Myoblast culture

The different phases of pacu myoblast cultures are shown in Figure 6.

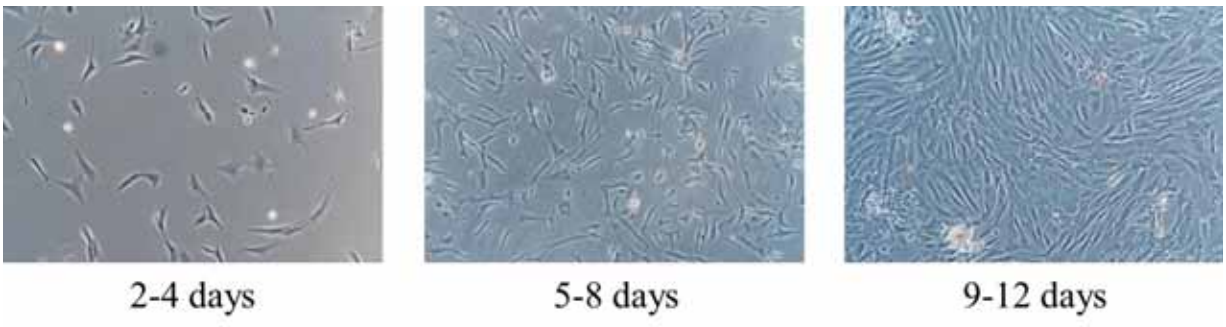


Figure 6: Primary cell cultures of myoblasts isolated from pacus.

The expression of miR-1 was significantly higher at 9-12 days compared with other phases ($p<0.01$), whereas the expression of HDAC4 was the opposite, with lower levels at 9-12

days ($p<0.01$). The expression of miR-133a was significantly higher at 5-8 days compared with other phases ($p<0.05$) and higher at 2-4 days compared with 9-12 days ($p<0.01$). The expression of miR-133b was quite the same, with a significant increase at 2-4 days and 5-8 days compared with 9-12 days ($p<0.01$). On the other hand, the expression of SRF was significantly lower at 5-8 days than in other phases ($p<0.001$). miR-206 exhibited a significant increase at 9-12 days compared with other phases ($p<0.05$) and was higher at 5-8 days compared with 2-4 days ($p<0.001$), whereas the expression of Pax7 was significantly lower at 9-12 days compared with other phases ($p<0.05$). The expression of miR-499 was significantly higher at 5-8 days compared with 2-4 days ($p<0.05$), and Sox6 levels were not statistically different between phases of culture ($p=0.86$) (Figure 7).

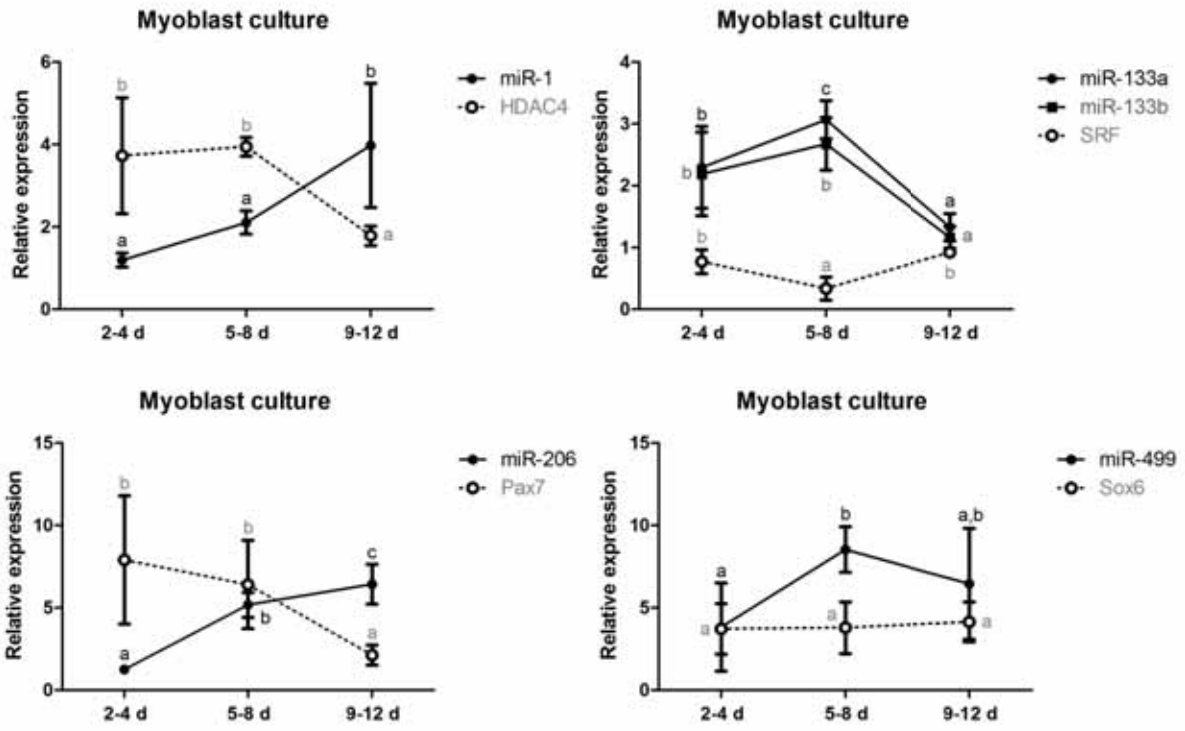


Figure 7: Relative expression of miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-499 and their respective targets, HDAC4, SRF, Pax7 and Sox6, in myoblast cultures of pacu. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

MRFs expression

The expression of MyoD in fast-twitch muscle was higher in 30-day-old pacus compared with 90-day-old and 2-year-old animals ($p<0.01$). Myogenin expression was significantly higher in 2-year-old pacus than in other groups and higher at 150 days compared with 30-day-old

animals ($p<0.01$). In slow-twitch muscle, the expression of MyoD was not statistically different between 150-day-old and 2-year-old pacus ($p=0.17$), whereas expression of Myogenin was significantly higher in 2-year-old pacus ($p<0.001$) (Figure 8).

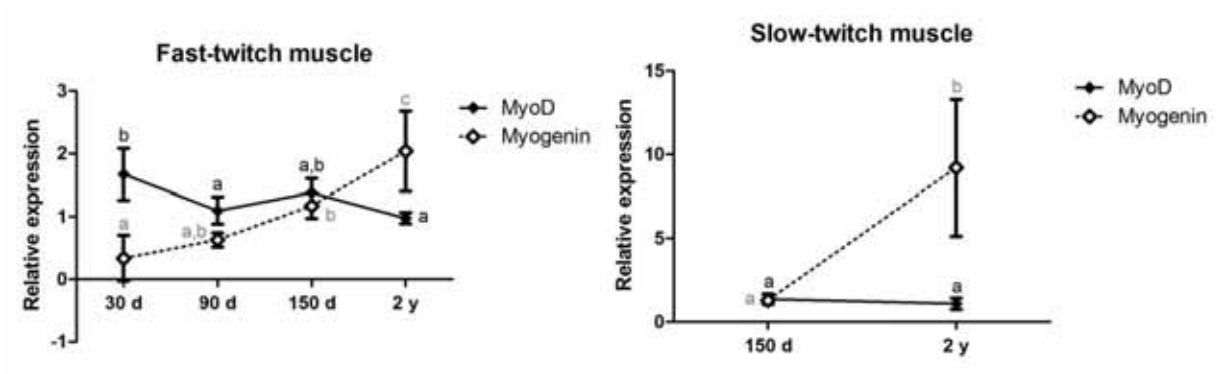


Figure 8: Relative expression of MyoD and Myogenin in fast- and slow-twitch muscles of pacu during growth. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

The expression of MyoD in myoblast cultures was significantly higher at 2-4 days compared with 9-12 days ($p<0.05$), whereas the expression of Myogenin was significantly higher at 9-12 days compared with other phases ($p<0.001$) and higher at 5-8 days compared with 2-4 days ($p<0.01$) (Figure 9).

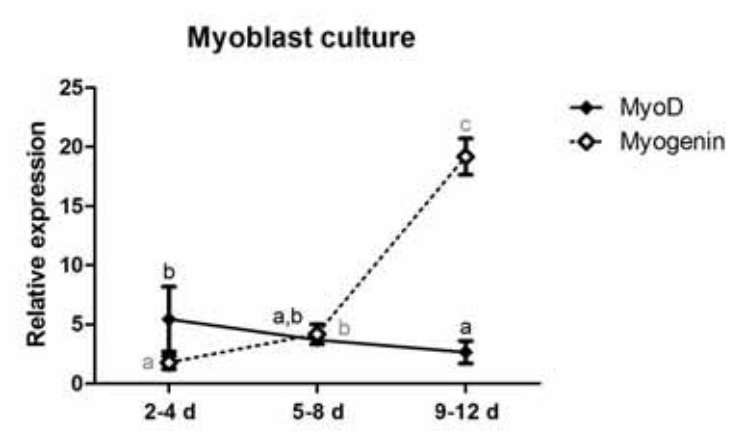


Figure 9: Relative expression of MyoD and Myogenin in myoblast cultures of pacu. Data are expressed as fold-change and are presented as mean ± SD (different letters – $p<0.05$).

Discussion

miRNAs and target expression

miRNAs are highly conserved molecules that silence target mRNAs through nucleotide base complementarity. miR-1, miR-133, miR-206 and miR-499 are highly expressed in skeletal muscle and are involved in many processes in this tissue (Ge & Chen, 2011). Studies in mammals have demonstrated that several miRNAs exhibited very similar or even identical nucleotide sequences and, therefore, are often grouped into families (Williams *et al*., 2009). Typically, these miRNAs participate in the same regulatory pathway, possessing similar functions in the biological tissue. miR-1 and miR-206 belong to the same family of miRNAs and are mainly involved in the differentiation of myoblasts in skeletal muscle through silencing of molecules that repress this process, such as HDAC4 and Pax7 (Chen *et al*., 2006; Williams *et al*., 2009; Chen *et al*., 2010; Yan *et al*., 2012a). Another molecule involved in muscle growth is SRF, whose mRNA is silenced by miR-133a and miR-133b, which also belong to the same family of miRNAs and are related to the phase of myoblast proliferation (Chen *et al*., 2006; Williams *et al*., 2009; Yan *et al*., 2012a). In addition to these miRNAs, miR-499 is a factor involved in the specification and maintenance of the slow-twitch phenotype in muscle fibres, especially through silencing of Sox6 mRNA, which participates in the definition of the fast-twitch phenotype (McCarthy *et al*., 2009; van Rooij *et al*., 2009; Wang *et al*., 2011).

A more general analysis of the expression results allows us to affirm that the levels of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increased according to the growth of pacus, whereas HDAC4, SRF and Pax7 decreased with the progression of muscle growth. On the other hand, miR-499 and Sox6 exhibited, respectively, a decrease and an increase in their expression levels according to the growth of fast-twitch muscle, whereas Sox6 exhibited a decrease in slow-twitch muscle during growth. Thus, it is possible to observe an inverse correlation between the expression of miRNAs and the expression of their putative target mRNAs, which makes sense given the biological function of miRNAs within cells (Krützfeldt *et al*., 2006) and suggests that miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 and miR-499 act directly on HDAC4, SRF, Pax7 and Sox6 in pacu skeletal muscle. Similar results were observed in fish species *Oreochromis niloticus* (Yan *et al*., 2012a), and an increased expression of miRNAs according to the growth was also observed in species *Danio rerio* (Wienholds *et al*., 2005) and *Cyprinus carpio* (Yan *et al*., 2012b).

HDAC4, which is a member of the class II histone deacetylases, associates with the transcription factor MEF2 by its N-terminal tail. This binding represses the activity of MEF2, an essential factor for the terminal differentiation of myoblasts (Miska *et al*., 1999; Miska *et al*., 2001). The lower levels of HDAC4 in fast- and slow-twitch muscles of adult pacus, most likely due to silencing by the high expression of miR-1, allowed the action of MEF2 and, therefore, muscle differentiation. On the other hand, high expression of HDAC4 in fast- and slow-twitch muscles of younger pacus inhibited the regulation of MEF2-dependent genes, contributing to the maintenance of myoblasts in a proliferative state in these animals.

Pax7 is a transcription factor expressed in satellite cells that promotes embryonic development and the postnatal growth of skeletal muscle (Seger *et al*., 2011). This factor is required for the survival of satellite cells and subsequently for the proliferation of myoblasts, in addition to preventing precocious differentiation (Chen *et al*., 2010). Expression of Pax7 was higher in fast-twitch muscle of 30- and 90-day-old pacus, and subsequently decreased, possibly as a result of the rising levels of miR-206, which contributed to the differentiation increasingly prominent. This pattern was also observed in slow-twitch muscle, with increasing levels of miR-206 and decreasing levels of Pax7, promoting higher differentiation of myoblasts in adult pacus.

SRF, which belongs to the MADS box transcription factor family, is a central regulator of cell cycle and promotes the transcriptional activation of immediate-early genes, especially c-fos (Hipskind *et al*., 1991). However, in addition to this role in the proliferation of several cell types, SRF also regulates the expression of muscle-specific genes, such as α-actin, dystrophin and myosin light chain, by binding to a nucleotide sequence known as the CArG box, which demonstrates its acting also in muscle differentiation (Soulez *et al*., 1996; Li *et al*., 2005). In fast-twitch muscle, we presume that SRF activated immediate-early genes in larval pacus, promoting myoblast proliferation. From 90 days, SRF began to stimulate muscle differentiation, but the high levels of miR-133a and miR-133b silenced its expression, maintaining cellular proliferation. In adult pacus, we observed low levels of SRF, but differentiation of myoblasts was ensured through the increased expression of miR-1 and miR-206 in this development stage. We did not observe statistical difference in expression of miR-133a, miR-133b and SRF during growth of slow-twitch muscle, but probably because we did not have this tissue from 30- and 90-day-old pacus. We presume that, as in fast-twitch muscle, the main function of SRF in slow-twitch muscle of 150-day-old and 2-year-old pacus was stimulate myoblast differentiation, but a basal level of myoblast proliferation was maintained by miR-133a and miR-133b.

Muscle-specific miR-499 participates in the specification and maintenance of twitch phenotypes. van Rooij *et al*. (2009) demonstrated that the increased expression of miR-499 in the skeletal muscle of mice was sufficient to promote the transition of fast-twitch to slow-twitch muscle fibres, in part mediated by the downregulation of Sox6. In zebrafish, Sox6 represses slow-twitch-specific genes, like slow myosin heavy chain 1 and slow troponin, in a manner that is involved in the maintenance of the fast-twitch phenotype in muscle fibres (Wang *et al*., 2011). We observed higher miR-499 expression and low Sox6 expression in the fast-twitch muscle of larval pacus, likely because fibres were in the process of forming. As the fibres matured and differentiated, especially in adult pacus, the expression of Sox6 also increased, likely as a result of the decreased levels of miR-499, allowing the full definition of the fast-twitch phenotype. In slow-twitch muscle, there was no statistical difference in miR-499 between 150-day-old and 2-year-old pacus, but its levels probably decreased the expression of Sox6 in adult pacus. This low level of Sox6 demonstrates the increasingly specification of slow-twitch phenotype. These results were corroborated by the expression of miR-499 and Sox6 between fast- and slow-twitch muscles of 150-day-old and 2-year-old pacus. The very high expression of miR-499 in slow muscle of both development stages possibly reduced the levels of Sox6 and contributed to the establishment of the slow-twitch phenotype in muscle fibers. On the other hand, Sox6 exhibited higher expression in fast muscle of 150-day-old pacus and a slight increase in fast muscle of 2-year-old animals, despite the lack of a statistical difference, contributing to the definition of fast-twitch phenotype.

In summary, the high levels of miR-1 and miR-206 in adult pacus might have promoted the differentiation of myoblasts in the fast and slow muscles of these animals, through the silencing of HDAC4 and Pax7 mRNAs, respectively. On the other hand, the expression of miR-133a and miR-133b increased earlier, beginning at 90 days, possibly silencing SRF mRNA and maintaining the proliferation of myoblasts in juvenile pacus. miR-499 might have regulated the establishment of the slow-twitch phenotype in muscle fibres, through the silencing of Sox6.

To provide further insight and in order to complement our study we performed a pacu myoblast culture, which allowed the investigation of miRNAs in a controlled environment. We evaluated the expression of miRNAs and their targets in a progression of myoblast proliferation to myoblast differentiation, studying the cultures at 2-4 days (commitment and early proliferation), 5-8 days (late proliferation and early fusion) and 9-12 days (late fusion and myotube formation). The myoblast cultures also revealed an inverse correlation between

expression of miRNAs and their targets, as well as in fast- and slow-twitch muscles during growth. miR-1 and miR-206 showed higher expression during myoblast differentiation (9-12 days), which reduced the levels of HDAC4 and Pax7 in this phase of culture. Given the roles of HDAC4 and Pax7 in repressing myoblast differentiation, it makes sense that they had higher expression during early (2-4 days) and late proliferation (5-8 days). The expression of miR-133a and miR-133b was higher during myoblast proliferation (2-4 and 5-8 days), whereas SRF presented lower levels at 5-8 days. SRF started to stimulate the mechanism of proliferation at 2-4 days, but its level decreased at 5-8 days due to the high expression of miR-133a and miR-133b, rising again at 9-12 days, when SRF promoted the myoblast differentiation. Expression levels of miR-499 had little variation during progression of myoblast culture, and Sox6 did not exhibit statistical difference between proliferation and differentiation of myoblasts. Several studies demonstrated that the innervation pattern is essential for the specification of twitch phenotypes in muscle fibres (Naya *et al*., 2000; Serrano *et al*., 2001; Torgan & Daniels, 2001). A tonic and low-frequency neural stimulation induces the slow-twitch phenotype, whereas a phasic and high-frequency neural stimulation promotes the fast-twitch phenotype (Torgan & Daniels, 2001). However, the lack of innervation in primary myoblast cultures makes the specification and maintenance of twitch phenotypes a quite different of what occurs *in vivo*. It is possible that miR-499 and Sox6 did not participate in definition of twitch phenotypes during progression of myoblast cultures, but maybe in another biological process. These experiments in myoblast cultures reforced our work and contributed to the elucidation of the roles of miRNAs in proliferation and differentiation of myoblasts, besides suggests the direct silencing that miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 perform on HDAC4, SRF and Pax7 in pacu skeletal muscle.

Even with the important findings of our study that demonstrate the regulation of muscle growth performed by miRNAs, because there are dozens of target mRNAs regulated by a single miRNA, it is possible that miR-1, miR-133, miR-206 and miR-499 were also involved in other aspects of muscle development, such as metabolism and skeletal muscle performance (Wang, 2013; Hitachi & Tsuchida, 2014). Further investigations are necessary to increase our understanding of the functions of each miRNA, especially through gain and loss of function assays that can readily be accomplished in primary myoblast cultures (Johnston *et al*., 2011). The expression of miRNAs exhibited variations between different development stages and between distinct twitch phenotypes, and this study provides the first expression profile of miRNAs in the skeletal muscle of pacu. These results could serve as the basis for further research involving fish

muscle growth and may assist in the development of new farming strategies that induce increased muscle mass, ensuring greater production.

MRFs expression

Skeletal muscle growth is regulated by the sequential expression of MRFs, including MyoD and Myogenin, which are responsible for myoblasts proliferation and differentiation, respectively (Almeida *et al*., 2010). These mechanisms enable the fusion of myoblasts and the origin of new muscle fibres (hyperplasia) or the internalization of myoblasts nuclei in growing fibres, expanding them in length and diameter (hypertrophy) (Johnston *et al*., 2011; Carani *et al*., 2013). We also analyzed the expression of MyoD and Myogenin during growth of fast- and slow-twitch muscles and in myoblast cultures, to confirm the occurrence of proliferation and differentiation mechanisms.

In fast-twitch muscle, MyoD exhibited a slight decrease throughout the growth of pacus, whereas the levels of Myogenin showed an increase according to the growth. The high expression of MyoD in larval pacus allowed an intense myoblast proliferation, required for the large-scale formation of muscle fibres that occurs in this development stage. In juvenile pacus, the hyperplasia and hypertrophy occurred simultaneously (Almeida *et al*., 2010), allowing the formation of some fibers while others were increasing in size. These processes were regulated by both MyoD, which decreased at 90 days, and Myogenin, which increased at 150 days. Myogenin exhibited higher expression in adult pacus and promoted marked differentiation in this development stage (Aguiar *et al*., 2008; Almeida *et al*., 2008), which makes sense because, as fish approaches its final size, the fibres become increasingly mature and muscle growth rates begin to decline (Johnston *et al*., 2011). In slow-twitch muscle, the expression levels of MyoD were not different between 150-day-old and 2-year-old pacus, and Myogenin also presented higher levels in adult pacus, which corroborates the data obtained in fast-twitch muscle. The experiments in myoblast cultures confirmed the roles of MyoD and Myogenin in proliferation and differentiation, respectively, since expression of MyoD had a decrease with the progression of cultures, with higher levels at 2-4 and 5-8 days, whereas Myogenin showed increasingly levels, with higher expression at 9-12 days.

Our results suggest that during muscle growth, MyoD regulated the proliferation of myoblasts, which appeared more pronounced in early development stages and tended to decrease according to the growth progression. In later development stages, the differentiation of cells,

regulated by expression of Myogenin, became more predominant (Aguiar *et al*., 2008; Almeida *et al*., 2008).

Conclusion

The expression pattern of miR-1, miR-133, miR-206 and miR-499 indicate their role in the regulation of skeletal muscle in pacu, controlling factors involved in the proliferation and differentiation of myoblasts, and in the specification and maintenance of twitch phenotypes in muscle fibres (Figure 10).

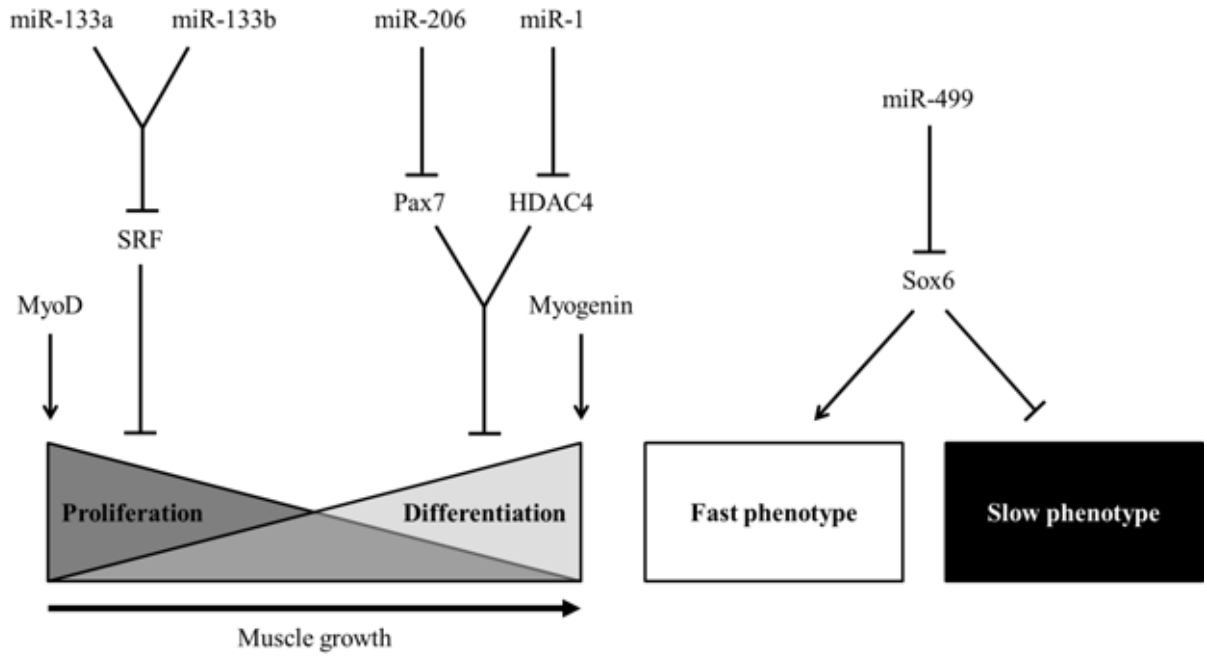


Figure 10: Model of regulation of MRFs and miRNAs in pacu skeletal muscle.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP Foundation (Process nº 2013/01892-2 and Process nº 2013/10196-0).

References

Aguiar, D.H., Bock, C., Padovani, C.R. and Dal Pai-Silva, M. MyoD, myogenin and proliferating cell nuclear antigen expression in growing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research*. v. 39(15), p. 1673-1679, 2008.

Almeida, F.L.A., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C. and Dal Pai-Silva, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron*. v. 39(8), p. 1306-1311, 2008.

Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal, D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C. Portella, M.C. and Dal Pai-Silva, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron*. v. 41(8), p. 997-1004, 2010.

Bower, N.I. and Johnston, I.A. Selection of reference genes for expression studies with fish myogenic cell cultures. *BMC Molecular Biology*. v. 10(80), p. 1-11, 2009.

Carani, F.R., Duran, B.O.S., Gutierrez de Paula, T. Piedade, W.P. and Dal-Pai-Silva, M. Morphology and expression of genes related to skeletal muscle growth in juveniles of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimatidae, Teleostei). *Acta Scientiarum Animal Sciences*. v. 35(3), p. 219-226, 2013.

Chargé, S.B.P. and Rudnicki, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*. v. 84(1), p. 209-238, 2004.

Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L. and Wang, D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*. v. 38(2), p. 228-233, 2006.

Chen, J.F., Tao, Y., Li. J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X. and Wang, D.Z. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *The Journal of Cell Biology*. v. 190(5), p. 867-879, 2010.

Froehlich, J.M., Galt, N.J., Charging, M.J., Meyer, B.M. and Biga, P.R. In vitro indeterminate teleost myogenesis appears to be dependent on Pax3. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. v. 49(5), p. 371-385, 2013.

Gabillard, J.C., Sabin, N. and Paboeuf, G. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell and Tissue Research*. v. 342, p. 471-477, 2010.

Ge, Y. and Chen, J. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*. v. 10(3), p. 441-448, 2011.

Goljanek-Whysall, K., Sweetman, D. and Münsterberg, A.E. microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clinical Science*. v. 123(11), p. 611-625, 2012.

Hipskind, R.A., Rao, V.N., Mueller, C.G., Reddy, E.S. and Nordheim, A. Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature*. v. 354(6354), p. 531-534, 1991.

Hitachi, K. and Tsuchida, K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Frontiers in Physiology*. v. 4(408), p. 1-7, 2014.

Johansen, K.A. and Overturf, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Biotechnology*. v. 7(6), p. 576-587, 2005.

Johnston, I.A., Bower, N.I. and Macqueen, D.J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*. v. 214(Pt 10), p. 1617-1628, 2011.

Krützfeldt, J., Poy, M.N. and Stoffel, M. Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nature Genetics*. v. 38, p. S14-S19, 2006.

Li, S., Czubryt, M.P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Wiebel, F.F., Nordheim, A. and Olson, E.N. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *PNAS*. v. 102(4), p. 1082-1087, 2005.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. v. 25(4), p. 402-408. 2001.

McCarthy, J.J., Esser, K.A., Peterson, C.A. and Dupont-Versteegden, E.E. Evidence of myomiR network regulation of β-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiological Genomics*. v. 39(3), p. 219–226, 2009.

Miska, E.A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S.J., Pines, J. and Kouzarides, T. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *The EMBO Journal*. v. 18(18), p. 5099-5107, 1999.

Miska, E.A., Langley, E., Wolf, D., Karlsson, C., Pines, J. and Kouzarides, T. Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation. *Nucleic Acids Research*. v. 29(16), p. 3439-3447, 2001.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2011*. 2013. 60p.

Naya, F.J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J.A., Williams, R.S. and Olson, E.N. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 275(7), p. 4545-4548, 2000.

Rowlerson, A. and Veggetti, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. (Ed) *Muscle development and growth. Fish Physiology 18*. San Diego: Academic Press, 2001. 327p.

Sänger, A.M. and Stoiber, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In: Johnston, I.A. (Ed) *Muscle development and growth. Fish Physiology 18*. San Diego: Academic Press, 2001. 327p.

Santos, V.B., Santos, R.S., Salomão, R.A.S. and Silva, R.M. Reprodução induzida de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com o uso de diferentes hormônios comerciais. *Pesquisa & Tecnologia*. v. 9(1), p. 1-6, 2012.

Seger, C., Hargrave, M., Wang, X., Chai, R.J., Elworthy, S. and Ingham, P.W. Analysis of Pax7 expressing myogenic cells in zebrafish muscle development, injury and models of disease. *Developmental Dynamics*. v. 240(11), p. 2440-2451, 2011.

Serrano, A.L., Murgia, M., Pallafacchina, G., Calabria, E., Coniglio, P., Lomo, T. and Schiaffino, S. Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. PNAS. v. 98(23), p. 13108-13113, 2001.

Soulez, M., Rouviere, C.G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A. and Tuil, D. Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Molecular and Cellular Biology*. v. 16(11), p. 6065-6074, 1996.

Torgan, C.E. and Daniels, M.P. Regulation of myosin heavy chain expression during rat skeletal muscle development in vitro. *Molecular Biology of the Cell*. v. 12, p. 1499-1508, 2001.

van Rooij, E., Liu, N. and Olson, E.N. microRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*. v. 24(4), p. 159-166, 2008.

van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm Jr., R.J. and Olson, E.N. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental Cell*. v. 17(5), p. 662-673, 2009.

Wang, X., Ono, Y., Tan, S.C., Chai, R.J., Parkin, C. and Ingham, P.W. Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development*. v. 138(20), p. 4399-4404, 2011.

Wang, X.H. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. v. 16(3), p. 258-266, 2013.

Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., Bruijn, E., Horvitz, H.R., Kauppinen, S. and Plasterk, R.H.A. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science 8*. v. 309(5732), p. 310-311, 2005.

Williams, A.H., Liu, N., van Rooij, E. and Olson, E.N. MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology*. v. 21(3), p. 461-469, 2009.

Yan, B., Guo, J., Zhao, L. and Zhao, J. microRNA expression signature in skeletal muscle of Nile tilapia. *Aquaculture*. v. 364-365, p. 240-246, 2012a.

Yan, X., Ding, L., Li, Y., Zhang, X., Liang, Y., Sun, X. and Teng, C. Identification and profiling of microRNAs from skeletal muscle of the common carp. *PLOS ONE*. v. 7(1), p. 1-9, 2012b.

Supplementary material

Supplementary data 1: Bioinformatic prediction of interactions between miRNAs and their putative target mRNAs.

```
target: Piaractus_mesopotamicus_HDAC4_utr3
length: 712
miRNA : dre-miR-1
length: 22

mfe: -18.4 kcal/mol
p-value: 0.999931

position  366
target 5'  A  U         U   GG   C 3'
            AC   CUUCUUU CAU  CCA
            UG   GAAGAAA GUA  GGU
miRNA  3' UA  UAU       U   A      5'
```

```
target: Piaractus_mesopotamicus_SRF_3utr
length: 815
miRNA : dre-miR-133a-3p
length: 21

mfe: -21.9 kcal/mol
p-value: 0.931724

position  354
target 5' C     ACU   UU      U 3'
           GCUGG     G  GACCAA
           CGACC     C  CUGGUU
miRNA  3' U     AACUU CC      U 5'
```

```
target: Piaractus_mesopotamicus_SRF_3utr
length: 815
miRNA : dre-miR-133b-3p
length: 22

mfe: -21.9 kcal/mol
p-value: 0.949434

position  354
target 5'  C     ACU   UU      U 3'
            GCUGG     G  GACCAA
            CGACC     C  CUGGUU
miRNA  3' AU     AACUU CC      U 5'
```

```
target: Piaractus_mesopotamicus_pax7_3utr
length: 190
miRNA : dre-miR-206-3p
length: 21

mfe: -20.8 kcal/mol
p-value: 0.437849

position  36
target 5' U   UUCCCC    UC    GGGC   GUG    C 3'
           CAC      CGCU  UCCU    GCA   UCCA
           GUG      GUGA  AGGA    UGU   AGGU
miRNA  3'    U              A      A        5'
```

```
target: Piaractus_meospotmaicus_SOX6_utr_dowstream
length: 1859
miRNA : mir499
length: 22

mfe: -24.3 kcal/mol
p-value: 0.753434

position  885
target 5' A         CCUUCAGCGCUUUU        C    3'
           AAACAUCGC               UGCGGGUC
           UUUGUAGUG               ACGUUCAG
miRNA  3' A                                AAUU 5'
```

8. APÊNDICE

Anexo 1: Aprovação do projeto de mestrado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **506-CEUA**, sobre "Expressão de microRNAs envolvidos com o crescimento muscular do pacu (*Piaractus mesopotamicus*): análises *in vivo* e *in vitro*", sob a responsabilidade de **Maeli Dal Pai**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "*Ad referendum*" da ***COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS*** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 13 de junho de 2013.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3880 0851 fax 14 3815 3744 e-mail: secdta@ibb.unesp.br