



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PERFIL TRANSCRICIONAL DE CÉLULAS MUSCULARES

DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) EM RESPOSTA A

SINAIS PRÓ-CRESCIMENTO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN*

VIVO

BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA

PROFA. DRA. MAELI DAL-PAI

PROF. DR. BRUNO OLIVEIRA DA SILVA DURAN

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

Maeli Dal-Pai

BOTUCATU – SP
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Zanella, Bruna Tereza Thomazini.

Perfil transcricional de células musculares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em resposta a sinais pró-crescimento : estudos *in vitro* e *in vivo* / Bruna Tereza Thomazini Zanella. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maeli Dal-Pai
Coorientador: Bruno Oliveira da Silva Duran
Capes: 20100000

1. Análise global (Matemática). 2. Bioinformática.
3. Cultura de células. 4. Músculos. 5. Células musculares.

Palavras-chave: Análise global; Bioinformática; Cultura celular; Músculo; Peixes.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 29 dias do mês de janeiro do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-Graduação - Central de Aulas IBB, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de BRUNA TEREZA THOMAZINI ZANELLA, intitulada **Perfil transcricional de células musculares de pacu (Piaractus mesopotamicus) em resposta a sinais pró-crescimento: estudos in vitro e in vivo**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MAELI DAL PAI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Profa. Dra. FLAVIA KARINA DELELLA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. BRUNO EVARISTO DE ALMEIDA FANTINATTI (Participação Presencial) do(a) Universidade Nove de Julho (Uninove) - Bauru, Profa. Dra. CLAUDIA DOS SANTOS MERMELSTEIN (Participação Virtual) do(a) Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) / Universidade Federal do Rio de Janeiro, Pesquisador Associado PEDRO LUIZ PUCCI FIGUEIREDO DE CARVALHO (Participação Virtual) do(a) Department of Ecology and Conservation Biology / Texas A&M University. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada __. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MAELI DAL PAI



*“Discovery consists of looking at the same
thing as everyone else and thinking some-
thing different.”*

- Albert Szent-Gyorgyi

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio, suporte e confiança em minha capacidade de desenvolvimento e superação. Obrigada por comemorar cada vitória e conforto nas situações desafiadoras.

Agradeço em especial minha orientadora, Profa. Dra. Maeli Dal-Pai, por ter aberto as portas do laboratório e grupo de pesquisa desde o início de minha graduação e por todos os ensinamentos, confiança e auxílio. Seu trabalho contribui muito para minha formação como pesquisadora e moldou minha carreira científica.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Bruno Oliveira da Silva Duran, pela parceria a todo instante e sem exceções. Sua atuação foi imensurável para que eu vencesse todas as dificuldades profissionais e pessoais.

Agradeço também a todos os amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para minha formação científica, especialmente Érika, Jéssica e Tassiana, e aos alunos de iniciação científica que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, Isabele, Guilherme e Ana.

Agradeço aos colegas alunos, docentes e técnicos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da UNESP pela convivência e auxílios diários.

Agradeço também a UNESP, como instituição, por ter me acolhido e ter me propiciado oportunidades de crescimento desde o primeiro minuto em que me tornei aluna. Que os princípios de educação gratuita, de qualidade e acesso a todos não sejam nunca perdidos ou ameaçados.

Agradeço imensamente aos membros das comissões examinadoras de qualificação e defesa, Professores Flavia K. Delella, José C. S. Vieira, Bruno E. A. Fantinatti, Claudia Mermelstein e Pedro L. P. F. de Carvalho, pelo tempo disponibilizado e contribuições realizadas.

Por fim, agradeço às agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio fundamental no desenvolvimento deste trabalho através da concessão de auxílios e bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, processo número #88887.482392/2020-00, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2018/26428-0.

Impacto potencial desta pesquisa

1. Título da Tese: Perfil transcricional de células musculares de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em resposta a sinais pró-crescimento: estudos *in vitro* e *in vivo*

Impacto científico: o presente estudo pode contribuir para melhor compreensão da biologia do tecido muscular esquelético em peixes em diferentes modelos de estudos através da caracterização do perfil transcricional de células musculares *in vitro* de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), em relação ao tecido muscular esquelético *in vivo* de juvenis dessa espécie. Além disso, os dados obtidos auxiliam na compreensão de como fatores externos influenciam no crescimento do tecido muscular nestes animais através da avaliação do perfil transcricional destas mesmas células frente a exposição aos fatores pró-crescimento, Igf1 e aminoácidos.

Impacto Econômico e Social: o músculo esquelético em peixes representa uma fonte de alimentação para consumo humano. Recentemente, carnes em laboratório têm sido desenvolvidas a partir de uma técnica chamada cultura de células. Essa técnica visa a produção de carnes com as mesmas características daquelas retiradas de animais, porém com menor impacto ambiental. Nesse estudo, buscamos entender como as células musculares de pacu se comportam em cultura com o objetivo de viabilizar estratégias para tornar essas células ainda mais semelhantes ao músculo desses animais e contribuir com pesquisas visando a futura produção da carne de peixes em laboratório. Além disso, analisamos a expressão de moléculas de sinalização expressas pelas células, quando expostas aos fatores que estimulam o crescimento das células musculares com o objetivo de contribuir com o entendimento sobre condições que podem maximizar o crescimento muscular e o rendimento do filé em peixes.

Potential impact of this research

1. Thesis Title: Transcriptional profile of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) muscle cells in response to pro-growth signals: *in vitro* and *in vivo* studies

Scientific impact: the present study can contribute to a better understanding of the biology of skeletal muscle tissue in fish in different study models by characterizing the transcriptional profile of *in vitro* muscle cells from pacu (*Piaractus mesopotamicus*) concerning the skeletal muscle tissue *in vivo* of juveniles of this species. Furthermore, the data obtained helps to understand how external factors influence the growth of muscle tissue in these animals through the evaluation of the transcriptional profile of these same cells when exposed to pro-growth factors, Igf1, and amino acids.

Economic and Social Impact: skeletal muscle in fish represents a food source for human consumption. Recently, cultivated meat has been engineered using a technique called cell culture. This technique aims to produce meat with the same characteristics as those taken from animals but with less environmental impact. In this study, we sought to understand how pacu muscle cells behave in culture to enable strategies to make these cells even more like the muscles of these animals and contribute to research involving the future production of fish meat in the laboratory. Furthermore, we analyzed the expression of signaling molecules expressed by cells when exposed to factors that stimulate the growth of muscle cells to contribute to understanding conditions that can maximize muscle growth and fillet yield in fish.

Sumário

1. Introdução.....	5
1.1. <i>Músculo estriado esquelético em peixes</i>	5
1.2. <i>Miogênese em peixes</i>	7
1.3. <i>Cultura celular de músculo estriado de peixes</i>	12
1.4. <i>Fatores pró-crescimento</i>	16
2. Objetivos.....	20
3. Referências gerais.....	21
CAPÍTULO I.....	28
CAPÍTULO II.....	63
6. Conclusões gerais	86
7. Apêndice – atividades complementares	87

Lista de abreviaturas

4e-bpi: eukaryotic translation initiation factor 4e-binding protein 1

AA: Amino acids

Acat1: acetyl-CoA acetyltransferase 1

Akt: protein kinase B

ATP: adenosina trifosfato

Bmp: bone morphogenetic protein

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

Ckma: creatina kinase, muscle a

Chrna1: cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1

Clu: clusterin

Ctnnb1: catenin (cadherin-associated protein) beta 1

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EROs: espécies reativas de oxigênio

Fgf21: fibroblast growth factor 21

Fn1a: fibronectin 1a

GDE: genes diferencialmente expressos

Gh: growth hormone

Glut4: glucose transporter 4

Hk1: hexokinase 1

Igf1: insulin-like growth factor 1

Igfbp: insulin-like growth factor-binding protein

Mdh2: malate dehydrogenase 2, NAD

MEC: matriz extracelular

MRF: myogenic regulatory factors

Mtor: mechanistic target of rapamycin kinase

Musk: muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase

Myf5: myogenic factor 5

Myf6: myogenic factor 6

Myod: myogenic differentiation

Myog: miogenina

Pax3: paired-box 3

Pax7: paired-box 7

Pi3k: phosphatidylinositol 3-kinase

Pkmb: pyruvate kinase M1/2b

S6k: ribosomal protein s6 kinase

Tgfb: transforming growth factor beta

Resumo

Os peixes compõem um dos grupos de vertebrados mais diversos do planeta, apresentando importância econômica e ecológica. O estudo da biologia desses animais tem sido aplicado para compreensão de fenômenos biológicos e para a avaliação do controle de poluentes, sendo considerados importantes indicadores biológicos. Dentre outras propriedades, esses animais apresentam características relevantes para o estudo do músculo que os diferenciam de outros grupos, porém o perfil molecular de suas células musculares em ambiente *in vitro* não é bem caracterizado. A cultura de células tem contribuído para a compreensão dos efeitos diretos de fatores extrínsecos em células musculares, considerando que estes podem desencadear alterações em vias de sinalização no tecido muscular, resultando também na alteração do fenótipo desse tecido. Fatores pró-crescimento tem sido estudados como fortes efetores para o estímulo da miogênese e hipertrofia das células musculares, sendo o Igf1 (insulin-like growth factor 1) um dos fatores mais estudados nesses animais. Nesse sentido, objetivamos caracterizar o perfil transcricional de células musculares *in vitro* de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), em relação ao tecido muscular esquelético *in vivo* de juvenis dessa espécie e avaliar o perfil transcricional dessas células frente a exposição aos fatores pró-crescimento, Igf1 e aminoácidos. De forma geral observamos que as principais diferenças moleculares entre os modelos *in vitro* e *in vivo* foram relacionadas à proliferação e diferenciação celular, estabelecimento de matriz extracelular e comunicação célula-célula, sendo estes processos mais enriquecidos no modelo *in vitro*, e processos de obtenção de energia, sendo no modelo *in vivo* esses processos foram mais diversos. Quanto ao estímulo com os fatores pró-crescimento, observamos que os aminoácidos tiveram um efeito direto e terminal no crescimento muscular, estimulando processos de proliferação e diferenciação das células musculares, enquanto o tratamento com Igf1 teve um efeito inicial e indireto, estimulando a síntese de proteínas e componentes de sua própria via de sinalização. Identificamos genes chaves e microRNAs modulados especificamente por esses fatores pró-crescimento que podem ser utilizados futuramente como possíveis marcadores moleculares da modulação do crescimento muscular. Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo podem permitir uma melhor compreensão sobre a manutenção de células musculares de peixes em ambiente *in vitro*, possibilitando melhor caracterização do perfil molecular do músculo esquelético de peixes e possíveis aplicações na produção de carne *in vitro*, além de elucidar o mecanismo de ação de fatores de crescimento no tecido muscular desses animais, possibilitando futuras aplicações nos sistemas de aquicultura.

Palavras-chaves: músculo; peixes; cultura celular; análise global; transcriptoma

Abstract

Fishes are one of the most diversified vertebrate groups on the planet, with worldwide importance in economic and food production. The study of the biology of these animals has been applied to understand several biological phenomena and to evaluate the control of pollutants in the environment, as these animals are considered biological indicators. Among other properties, fishes have relevant characteristics for the skeletal muscle study that differentiate them from other groups. Nevertheless, the molecular profile of their muscle cells, especially in an *in vitro* environment, is not well characterized. Cell culture has contributed to the understanding of the direct effects of extrinsic factors on fish muscle cells, considering that these factors can trigger alterations in the modulation of signaling pathways in skeletal muscle, which also results in changes in the phenotype of this tissue. Among the factors that modulate muscle tissue, pro-growth factors have been studied as effective effectors for stimulating myogenesis and hypertrophy of muscle cells, with Igf1 (insulin-like growth factor 1) being one of the most studied growth factors in these animals. In this sense, the objective of this work was to characterize the transcriptional profile of *in vitro* muscle cells of pacus (*Piaractus mesopotamicus*) compared to the *in vivo* skeletal muscle tissue of pacu juveniles and to evaluate the transcriptional profile of these cells submitted to treatment with pro-growth factors, Igf1 and amino acids. In general, the main differences between the *in vitro* and *in vivo* models were related to cell proliferation and differentiation, extracellular matrix establishment, and cell-cell communication, processes that were enhanced in the *in vitro* model, and processes related to energy production that were more diverse in the *in vivo* model. Considering the pro-growth stimulus, the amino acids had a direct and terminal effect, stimulating the proliferation and differentiation of muscle cells, while Igf1 had an initial effect, stimulating protein synthesis and its own pathway. We identified key genes and microRNAs modulated by each pro-growth factor that can be future applied as molecular markers of muscle growth modulation. The data obtained in the present study may allow a better understanding of the maintenance of fish muscle cells in an *in vitro* environment, allowing a better characterization of the molecular profile of fish skeletal muscle and its possible applications in *in vitro* meat production. In addition, our data can elucidate the mechanism of action of the growth factors in the muscle tissue of these animals, allowing future innovations in aquaculture systems.

Keywords: muscle; fish; cell culture; omics; transcriptome

1. Introdução

1.1. Músculo estriado esquelético em peixes

O setor da aquicultura tem ganhado grande reconhecimento por sua contribuição nas áreas de nutrição e segurança alimentar, sendo um dos principais setores de comercialização mundial (FAO, 2022). Somente em 2020 a produção global da aquicultura alcançou a marca de 178 milhões de toneladas, o que corresponde a 406 bilhões de dólares. Do total da produção, 51% são provenientes de capturas, enquanto 49% correspondem a sistemas de cultivo. Ainda, 89% da produção total é direcionada exclusivamente para o consumo humano (FAO, 2022).

No Brasil, a produção no setor da aquicultura chegou a 664 mil toneladas em 2021. Peixes nativos, como os redondos, totalizaram em conjunto 147 mil toneladas da produção nacional (IBGE, 2022). Entre os peixes redondos podemos citar o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que possui crescimento acelerado e boa aderência à alimentação artificial, adaptações importantes para a aquicultura intensiva (Urbinati e Gonçalves, 2005; Volkoff et al, 2017).

Os peixes compõem um dos grupos mais diversos de vertebrados do planeta e, além de sua importante representação no setor econômico e alimentício, esses animais também possuem características vantajosas para o estudo do tecido muscular. Devido ao habitat em que vivem, a proporção de 40 a 70% de tecido muscular esquelético, em relação ao peso corporal, é benéfica, pois permite a execução de movimentos rápidos, o que devido à densidade do ambiente aquático demanda maior quantidade de energia se comparado ao ambiente terrestre (Bone, 1978).

O crescimento muscular nesses animais apresenta uma característica que os diferem dos outros vertebrados, o crescimento indeterminado. Após a maturação sexual, a formação de novas fibras musculares, processo denominado hiperplasia, continua em taxas significativamente maiores nos peixes em comparação aos mamíferos. Nos mamíferos, o aumento da massa muscular na fase pós-natal ocorre quase que exclusivamente pelo aumento do diâmetro de fibras musculares pré-existentes, processo denominado hipertrofia. Ainda, apesar de alguns teleósteos não apresentarem este padrão de crescimento, como o zebrafish (*Danio rerio*), essa característica confere benefícios para a utilização desses animais como modelos para estudos do crescimento muscular de forma contínua (Biga e Goetz, 2006; Vélez et al, 2016).

Outra característica única desse grupo é a organização do tecido muscular. Em peixes, a musculatura esquelética se organiza em miômeros, estruturas morfofuncionais idênticas. Os miômeros são separados entre si por camadas de tecido conjuntivo, os miosseptos. A

organização entre os miômeros e miosseptos se apresenta de forma característica, lembrando a letra W (Fig. 1). Essa forma de organização do músculo esquelético auxilia na realização dos movimentos ondulatórios para natação e para a transmissão da força de contração (Sänger e Stoiber, 2001).

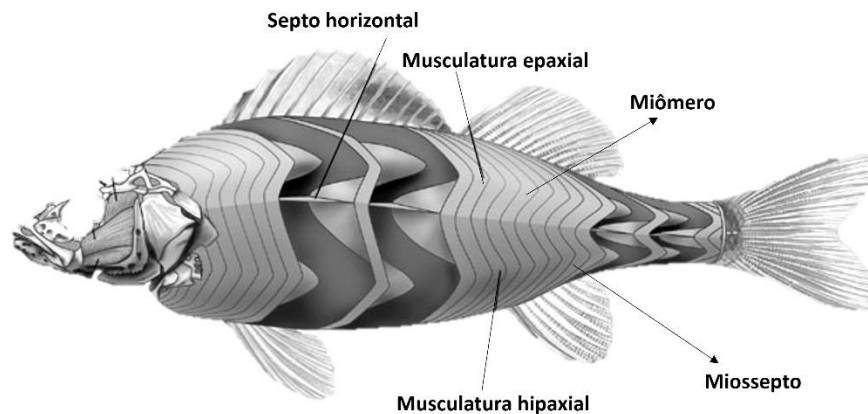


Figura 1. Organização da musculatura esquelética em peixes. Miômeros separados por miosseptos. Adaptado de: 2005. "v04_id131_con_axialmu.jpg" (On-line), Animal Diversity Web. Acesso em 23 de julho de 20203. Disponível em:

https://animaldiversity.org/collections/contributors/Grzimek_fish/structure_function/v04_id131_con_axialmu/.

Por fim, uma terceira característica que diferencia a organização do tecido muscular nos peixes é a compartimentalização. Nesses animais, as fibras, ou células musculares, são delimitadas em três compartimentos: oxidativo ou vermelho, glicolítico ou branco e intermediário. A proporção de cada compartimento varia de acordo com a espécie e com o ambiente em que o animal habita (Johnston et al, 1977).

O compartimento de fibras oxidativas conta com grande suprimento sanguíneo, motivo pelo qual esse compartimento também pode ser denominado como vermelho. As fibras presentes nessa região possuem muitas mitocôndrias e conseqüentemente o metabolismo oxidativo é predominante. As células desse compartimento são recrutadas em movimentos contínuos como para a sustentação do animal na coluna d'água e migração (Johnston et al, 1977; Sänger e Stoiber, 2001). As fibras musculares do compartimento glicolítico, também denominado de compartimento branco, possuem poucas mitocôndrias, metabolismo predominantemente glicolítico e diâmetros maiores em comparação às fibras do compartimento oxidativo. Nesse compartimento o suprimento sanguíneo é baixo e as fibras musculares contribuem para a realização de movimentos rápidos, como a captura de presas e fuga de

predadores (Johnston et al, 1977; Sanger e Stoiber, 2001). Entre os compartimentos oxidativo e glicolítico, há o compartimento intermediário no qual as fibras musculares apresentam características mistas tanto de células musculares oxidativas quanto glicolíticas (Johnston et al, 1977; Sanger e Stoiber, 2001) (Fig.2).

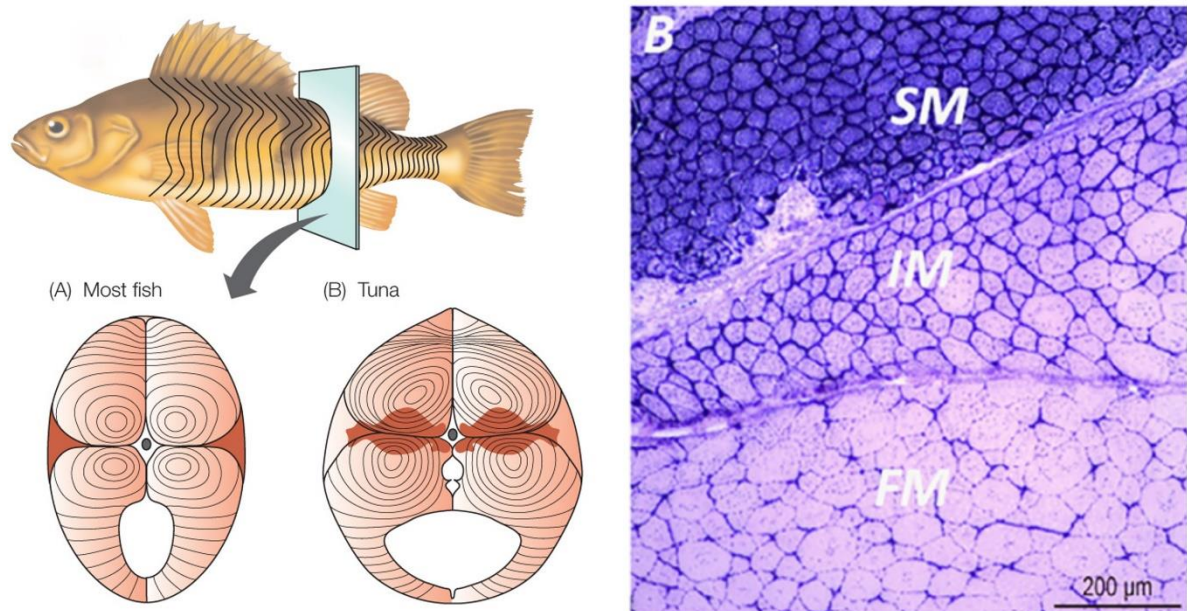


Figura 2. Compartimentalizao do tecido muscular em peixes. (A) Comparao entre o compartimento glicolítico (em rosa) e o compartimento oxidativo (em vermelho) na maioria dos peixes e em uma espécie específica, o atum (*Thunnus spp*). Fonte: Macmillan learning. Acesso em 23 de julho de 2023. Disponível em https://www.macmillanhigared.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/hillis2e_ch33_4.html. (B) Corte histológico do tecido muscular esquelético de pacu mostrando a separao dos compartimentos oxidativo (SM), intermediário (IM) e glicolítico (FM). Reao histoquímica por NADH-TR. Fonte: Dal-Pai-Silva et al, 2019, pp. 165, In: Baldisseroto, Urbinati e Cyrino. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*.

1.2. Miogênese em peixes

O processo de formao do tecido muscular esquelético, ou miogênese, em peixes assim como nos demais vertebrados ocorre no início da embriogênese. Especificamente nos peixes, o tecido muscular da região axial  o mais abundante, auxiliando nos movimentos necessários para natao e sustento (Keenan e Currie, 2019). No grupo dos teleósteos, a miogênese se inicia com a segmentao anteroposterior da mesoderme paraxial em blocos de células denominados somitos. Em seguida, os somitos são novamente segmentados em outros dois

conjuntos de células: esclerótomo e miótomo. No miótomo, as células passam a expressar fatores de regulação miogênica (MRFs, do inglês: myogenic regulatory factors), sendo neste estágio do desenvolvimento que se tornam comprometidas com a linhagem miogênica. Nesta etapa do desenvolvimento, as células também passam a apresentar componentes característicos das células musculares, como proteínas estruturais, miosinas (Currie e Ingham, 2001; Keenan e Currie, 2019).

Para o grupo dos peixes, o comprometimento já no início do desenvolvimento com a linhagem miogênica é uma característica vantajosa, considerando que a fertilização geralmente ocorre no ambiente externo. Sendo assim, o comprometimento inicial e a rápida formação de células musculares propiciam a fuga de predadores, o que aumenta a chance de sobrevivência dos embriões (Currie e Ingham, 2001).

Após a formação e comprometimento das células miogênicas, células denominadas adaxiais passam pela determinação de seu fenótipo a partir da influência de fatores derivados da notocorda (Fig. 3). Um exemplo disso é o fator Hedgehog que reprime a expressão de genes que determinam as células musculares glicolíticas, o que resulta no fenótipo oxidativo das células adaxiais (Blagden et al, 1997; Keenan e Currie, 2019). É a partir do desenvolvimento das células adaxiais que células estriadas e alongadas passam a compor o miótomo, assim como células musculares denominadas como pioneiras que contribuem para as demais etapas da formação muscular (Currie e Ingham, 2001; Keenan e Currie, 2019).

Como discutido anteriormente, as fibras musculares em peixes são separadas em compartimentos bem delimitados de acordo com suas características fenotípicas e fisiológicas. A musculatura vermelha se forma a partir da migração das células adaxiais da região adjacente a notocorda para a região superficial do embrião. Já o compartimento da musculatura branca se forma a partir de células que, após a migração das células adaxiais, permanecem na região interna do miótomo (Fig. 3) (Devoto et al, 1996). Em comparação, nos mamíferos a especificação dessas células ocorre ao longo de todo o miótomo, o que caracteriza a distribuição irregular de células musculares com padrão fisiológico distinto no tecido muscular esquelético desses animais (Currie e Ingham, 2001).

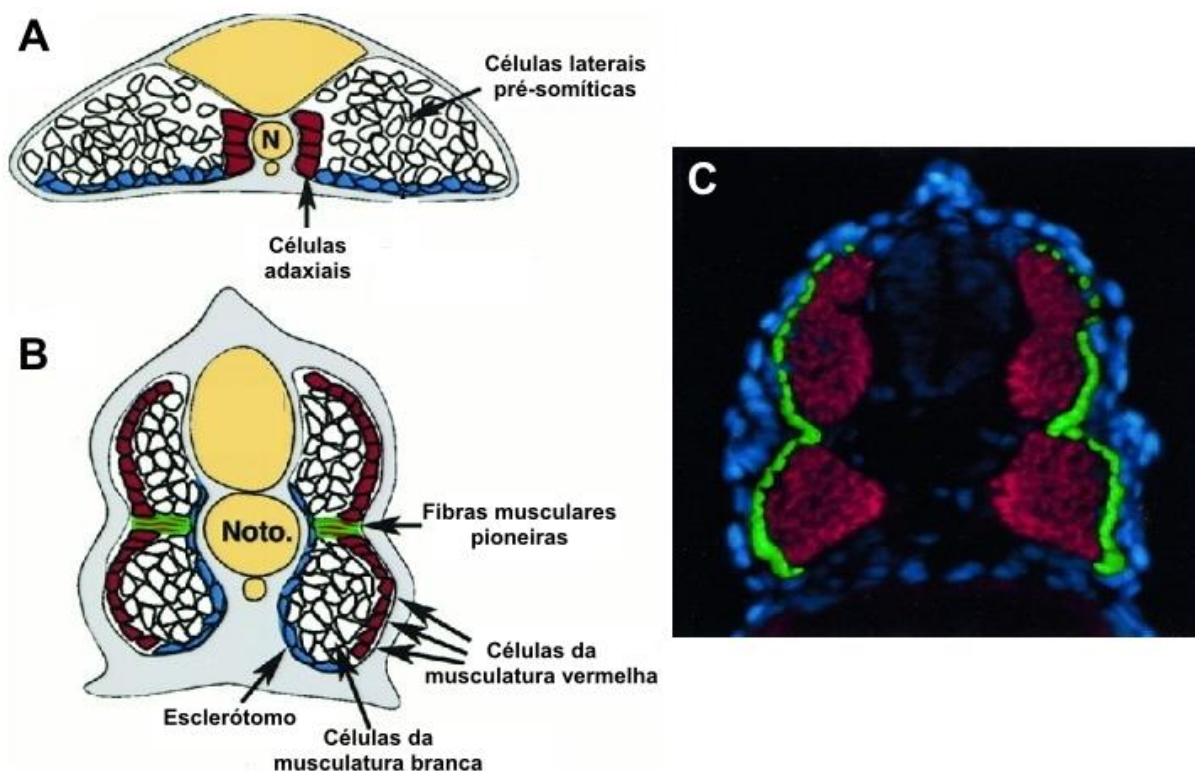


Figura 3. Miogênese embrionária em peixes. (A) Esquema de corte transversal de embrião de zebrafish com 13 horas de desenvolvimento. Células denominadas adaxiais passam pela determinação de seu fenótipo pelo estímulo de fatores derivados da notocorda, essas células darão origem às fibras musculares do compartimento vermelho. Células pré-somíticas laterais contribuem para o desenvolvimento das fibras da musculatura branca. (B) Esquema de corte histológico de embrião de zebrafish com 24 horas de desenvolvimento destacando a localização das células das musculaturas vermelha e branca após a migração das células adaxiais. (C) Fibras musculares do compartimento vermelho (em verde – marcação por anticorpo S58) formam uma camada de células superficiais, enquanto as fibras musculares do compartimento branco (em vermelho – marcação por anticorpo zm4) permanecem numa região mais profunda do miótomo (adaptado de Stickney et al, 2000).

Em peixes, ocorre também um processo denominado miogênese secundária no qual esses animais crescem de forma acelerada, conservando as características da miogênese primária. Esse processo acontece a partir da formação de uma camada externa de células oriundas de células não adaxiais localizadas nos somitos. De forma geral, essas células contribuem para o crescimento muscular durante toda a vida, caracterizando o padrão de crescimento indeterminado (Keenan e Currie, 2019). É também a partir dessa camada de células que serão derivadas as células precursoras miogênicas, ou células satélites. As células satélites contribuem para a regeneração e crescimento muscular, possuem capacidade de renovação e são mantidas ao longo de todo o desenvolvimento (Johnston et al, 2011).

O estado quiescente e atividades das células satélites é controlado por genes membros da família paired-box como *pax3* e *pax7*. Nos mamíferos a expressão de *pax3* é alta durante a embriogênese, e posteriormente diminui quando *pax7* passa a ser expresso em níveis significativos. A marcação por *pax7* tende a indicar o estado quiescente das células satélites, enquanto a manutenção do pool de células satélites em embriões de mamíferos é controlada, possivelmente, pela expressão de *pax3* (Buckingham e Rigby, 2014). Em peixes, a manutenção da expressão de *pax3* nas fases pós-natais de desenvolvimento pode estar relacionada a capacidade de esses animais manterem o crescimento muscular por hiperplasia e hipertrofia, fato não observado em mamíferos (Froehlich et al, 2013a, 2013b).

Durante a embriogênese e nas fases pós-natais, os MRFs estimulam os processos de proliferação e diferenciação das células musculares a partir da ativação das células satélites, processo que ocorre através da diminuição da expressão de *pax7* e dos demais fatores que controlam o estado quiescente dessas células (Watabe, 1999, 2001). Os MRFs primários, *myod* (*myogenic differentiation 1*) e *myf5* (*myogenic factor 5*), estimulam a proliferação das células musculares, denominadas então de mioblastos, enquanto os MRFs secundários, *miogenina* e *myf6* (*myogenic factor 6*), induzem a diferenciação dessas células em miotubos (Fig. 4) (Watabe, 1999, 2001). A diferenciação de mioblastos em miotubos depende da fusão entre os mioblastos, o que está sujeito a uma série de eventos, como adesão e reconhecimento entre as células, rearranjo do citoesqueleto e fusão entre as membranas (Fig. 4) (revisado por Kim et al, 2015). Recentemente, outros fatores, além dos MRFs, foram descritos como atuantes nos processos de fusão e diferenciação das células musculares, como o gene *myomaker*, que codifica uma proteína muscular transmembrana, e um micropeptídeo específico do tecido muscular denominado *myomixer*. Esses fatores foram primeiro identificados em mamíferos, mas a sua atuação também já foi comprovada como essencial para o processo de fusão entre os mioblastos de peixes (Landemaine et al, 2014; Shi et al, 2017).

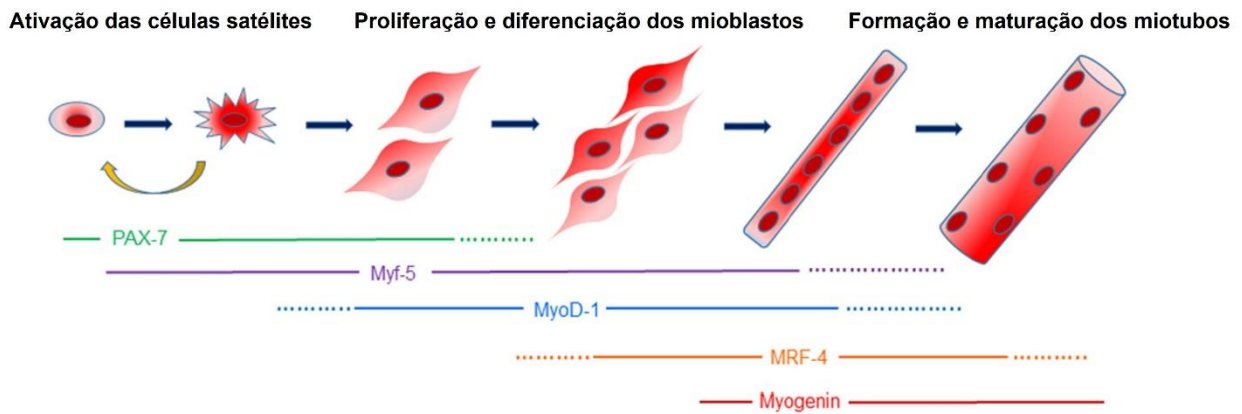


Figura 4. Atuação dos fatores de regulação miogênica (MRFs) no processo de miogênese embrionária e pós-natal. A diminuição de *pax7* leva a saída do estado de quiescência de células satélites que se diferenciam em mioblastos. Os MRFs primários *myf5* e *myod* estimulam a proliferação dos mioblastos, enquanto os MRFs secundários miogenina e *mrf4* (*myf6*) estimulam a fusão dos mioblastos e posterior diferenciação em miotubos (adaptado de Romagnoli e Brandi, 2021).

O microambiente tecidual também exerce forte influência sobre a atividade das células musculares, o que foi investigado principalmente em experimentos utilizando células musculares *in vitro*. O cultivo de células musculares da linhagem C2C12 em matrigel, uma membrana basal solubilizada, foi avaliado por Ding et al, 2020. Os autores observaram que as células cultivadas na presença de matrigel resultavam em miotubos mais longos e com maior diâmetro. Ainda, quando o fator SU9516, que estimula a expressão da integrina $\alpha7\beta1$, foi adicionado ao cultivo esses efeitos foram exacerbados, o que indica a importância da homeostase das interações entre as células musculares e matriz extracelular (MEC) para o desenvolvimento do tecido muscular (Ding et al, 2020).

Células C2C12 cultivadas na presença de fibronectina, colágeno ou de proteoglicanos advindos da MEC descelularizada proveniente do tecido muscular, rapidamente sintetizam glicoproteínas de matriz criando o seu próprio microambiente (Chaturvedi et al, 2015). Quando cultivadas em modelo 3D na presença da MEC descelularizada, essas células foram capazes de manter a proliferação e a organização celular, se estabelecendo de forma linear ou em padrão circular e seguindo a estrutura da MEC, indicando que a MEC pode organizar e direcionar células musculares em desenvolvimento (Chaturvedi et al, 2015). Além disso, os proteoglicanos presentes na MEC podem atuar na biodisponibilidade de fatores de crescimento como o TGF β

(Lund e Cornelison, 2013), indicando a importância da MEC não só na estruturação do tecido muscular, assim como para a interação das células musculares entre si e com outros fatores.

A miogênese e crescimento muscular pós-natal são processos complexos que envolvem uma série de eventos controlados por vias de sinalização e fatores de regulação distintos. O mecanismo e controle desses processos no músculo de peixes vem sendo investigados em experimentos utilizando modelos *in vitro*, uma vez que essa metodologia recapitula as etapas que ocorrem durante a miogênese (Vélez et al, 2016).

1.3. Cultura celular de músculo estriado de peixes

A cultura de células, nomeada primeiramente como cultura de tecidos, é uma técnica que foi desenvolvida para permitir o estudo das células animais sem a influência de variações externas e sistêmicas que podem ocorrer de forma normal ao longo do desenvolvimento dos organismos ou devido a situações patológicas e experimentais (Freshney, 2010).

Os experimentos com cultura de células permitem investigações nas mais diversas áreas do conhecimento. A fisiologia e crescimento dos peixes vem sendo avaliada em uma série de estudos que utilizam modelos *in vivo*. No entanto, devido às interações sistêmicas, algumas questões podem ser melhor elucidadas utilizando os modelos *in vitro* (Vélez et al, 2016). Um exemplo disso é avaliação de fatores de crescimento como o Igf1, uma vez que em estudos *in vivo* não é possível diferenciar se os níveis circulantes desse fator de crescimento são provenientes do tecido muscular esquelético ou do fígado (Vélez et al, 2016). Diversos outros desafios presentes na aquicultura foram investigados utilizando modelos *in vitro* como o controle da saúde dos animais, resposta a infecções virais e bacterianas, edição de genes específicos, aplicações toxicológicas e ambientais, além do estudo de nutrientes específicos (Goswani et al, 2022).

Especificamente em relação ao músculo esquelético, alterações no meio de cultivo são amplamente aplicadas para avaliar o efeito de fatores externos nos processos de proliferação, diferenciação e crescimento de células musculares de peixes. Bower e Johnston, 2010, suplementaram o meio de cultivo de células musculares de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) com Igf1 e aminoácidos para avaliar a expressão de Igfs e proteínas de ligação ao Igf, as Igfbps.

Castillo et al, 2004, 2006, avaliaram o efeito de Igf1 e insulina na proliferação e absorção de glicose e alanina em células musculares *in vitro* de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Jiang et al, 2017, avaliaram a deficiência ou suplementação de metionina no perfil proteômico de células musculares *in vitro* de *Scophthalmus maximus*. Recentemente, Luo et al, 2023, avaliaram a oxidação e esterificação de ácidos graxos em células musculares *in vitro* de carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com ácido linoleico. Nosso grupo de pesquisa também utilizou células musculares *in vitro* de pacu para investigar a influência de microRNAs durante a proliferação e diferenciação de células musculares (Duran et al, 2015), assim como para avaliar a resposta dessas células frente a suplementação com ácido ascórbico quando expostas a oxidante (Duran et al, 2019) ou restrição de nutrientes (Zanella et al, 2021).

Sendo assim, diversos são os estudos que demonstram a contribuição dos estudos *in vitro* para a compreensão de diferentes fenômenos biológicos em peixes, porém algumas inconsistências são observadas nas respostas moleculares entre modelos *in vitro* e *in vivo*, principalmente considerando os estudos farmacológicos onde há uma dificuldade na padronização de dosagem de drogas entre estes modelos experimentais (Otava et al, 2015).

McMullen et al, 2019, utilizaram dados públicos para avaliar a resposta transcricional em hepatócitos, *in vitro*, e em fígado de ratos, *in vivo*, frente a exposição a diferentes compostos. Os autores observaram uma discrepância tanto nas vias enriquecidas entre esses modelos experimentais, assim como na expressão de genes-alvos. Isolando as principais diferenças entre os modelos experimentais, ou seja, as vias que são comumente enriquecidas em cada modelo experimental independente do composto químico aplicado, os autores aumentaram em 36% a concordância entre a comparação dos resultados nos modelos *in vitro* e *in vivo*, destacando a necessidade de levar em conta as diferenças sistêmicas nas comparações entre modelos experimentais diferentes (McMullen et al, 2019).

Considerando especificamente as células do tecido muscular esquelético, a aplicação dos resultados obtidos em modelos *in vitro* enfrenta não só a barreira da extrapolação dos resultados para modelos e situações *in vivo*, como também apresenta diferenças fisiológicas entre espécies e linhagens celulares (Abdelmoez et al, 2020; Allen et al, 2023).

Abdelmoez et al, 2020, analisando dados públicos de transcriptoma de linhagens de células musculares C2C12 e L6, células musculares humanas em cultura primária e tecido muscular esquelético de camundongos e humanos observaram diferenças no padrão de expressão de genes relacionados ao metabolismo e função do músculo esquelético. Além disso, comparando experimentalmente células C2C12, L6 e células musculares humanas, os autores observaram diferenças na captação de glicose e atividade mitocondrial tanto em comparação entre os tipos celulares quanto em características espécies específicas (Abdelmoez et al, 2020).

As diferenças observadas entre os modelos *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionadas não só com as distinções entre as espécies, como também às características do cultivo de células em ambiente *in vitro*. Células musculares são comumente cultivadas na presença de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) e suplementadas com compostos derivados de animais como o soro fetal bovino e soro de cavalo. Apesar de a combinação desses fatores ser amplamente aplicada e ser ideal para proliferação e diferenciação das células musculares, uma dose de nutrientes supra fisiológica pode estar presente nesses meios de cultivo, o que pode alterar a forma de resposta dessas células (Allen et al, 2023). Apesar de estratégias para melhor adaptação do modelo *in vitro* às condições reais dos organismos serem aplicadas, como a utilização de plasma e soro humano para o cultivo de células, co-cultura e explante (Allen et al, 2023), essa metodologia ainda precisa ser mais bem padronizada, principalmente para organismos não modelos como os peixes.

As células *in vitro* podem ser obtidas a partir de culturas primárias e de linhagens celulares. Nas culturas primárias, o tecido alvo é retirado diretamente do animal, as células são separadas mecanicamente e/ou enzimaticamente e cultivadas em suspensão ou em um substrato sólido. Após diversos ciclos de proliferação e expansão, essas células podem ser subcultivadas, ou seja, diluídas e cultivadas em novos substratos. Esse processo pode dar origem às linhagens celulares, no qual as células mantêm a capacidade proliferativa após múltiplos subcultivos, podendo se tornar imortalizadas (Freshney, 2010).

Atualmente, o banco de dados Cellulosaurus que compila dados de linhagens celulares, possui 913 linhagens de células de peixes cadastradas. Essas células foram isoladas de diferentes fontes como nadadeiras, olhos, fígado e rins (Bairoch, 2018). No entanto, somente

linhagens de dezoito espécies foram isoladas de músculo esquelético, sendo que apenas duas dessas linhagens tem potencial miogênico confirmado (Bairoch, 2018). Nesse sentido, o desenvolvimento de linhagens de células musculares de peixes, assim como de melhores estratégias para manutenção dessas células, traz benefícios para o aprofundamento sobre a biologia do tecido muscular desses animais e para aplicações na produção de alimentos.

Nessa linha de investigação, Zhi et al, 2023, estabeleceram uma linhagem de células musculares de *Cyprinus carpio haematopterus* e testaram sua resposta frente a infecções bacterianas, pesticidas, metais pesados e alterações genéticas. Embora o objetivo principal não tenha sido monitorar as características específicas das células musculares, o estabelecimento e caracterização dessa linhagem celular pode ser útil para estudos futuros, considerando que o cultivo desse animal e estudos em toxicologia *in vivo* levam longos períodos para serem finalizados (Zhi et al, 2023). Em um estudo pioneiro, Saad et al, 2023, isolaram e propagaram células musculares esqueléticas de *Scomber scombrus* que foram capazes de manter as características miogênicas e a capacidade de proliferação mesmo após múltiplos cultivos. Além disso, essas células demonstraram a capacidade de acumular lipídeos quando estimuladas, o que pode ser de grande auxílio no desenvolvimento de carne *in vitro* de peixes (Saad et al, 2023).

Como descrito nos tópicos anteriores, a aquicultura vem aumentando seus números globalmente de forma rápida e constante. No entanto, ainda há desafios a serem enfrentados quanto a segurança e qualidade dos produtos comercializados. Nesse sentido, a produção de carne *in vitro* pode solucionar problemas enfrentados pelos sistemas de cultivo e captura de peixes, além de reduzir os riscos de contaminações e as pressões na obtenção dos recursos naturais e exploração do meio ambiente (Goswani et al, 2022).

Sendo assim, a comparação entre os perfis de respostas e assinatura transcricional nos sistemas *in vitro* e *in vivo* pode auxiliar na extrapolação dos dados observados em sistemas isolados para os organismos com um todo e na aproximação dos dois modelos experimentais, reduzindo o número de animais utilizados em experimentos e ampliando os conhecimentos sobre a manutenção de células musculares de peixes em ambiente *in vitro*.

1.4. Fatores pró-crescimento

São inúmeros os efetores que podem modular o fenótipo do tecido muscular esquelético em peixes. Dentre estes, o Igfl (insulin-like growth factor 1) é um dos fatores mais estudados e um dos principais promotores de crescimento muscular em peixes (Vélez et al, 2017). Similarmente ao observado em mamíferos, o polipeptídeo de Igfl em teleósteos é formado por aproximadamente 68 a 70 aminoácidos. A expressão do gene que codifica esse fator de crescimento foi observada em peixes desde a embriogênese até a fase adulta em diferentes tecidos e órgãos como músculo esquelético, tecido adiposo, intestino, fígado, coração e rim, sendo que a maior expressão tende a ser no fígado na maioria das espécies (Wood et al, 2005).

A partir da ligação de Igfl ao seu receptor ocorre uma série de fosforilações em seus alvos *downstream* resultando na síntese de proteínas e hipertrofia das fibras musculares (Glass, 2010) (Fig. 5). Apesar da conservação estrutural dos receptores de Igfl entre as espécies de peixes e entre peixes e mamíferos (Wood et al, 2005), os estudos que realizaram as primeiras identificações desses receptores em peixes indicaram grande quantidade de receptores de Igfl presentes nos tecidos, principalmente quando comparado ao número de receptores de insulina (Parrizas et al, 1995; Vélez et al, 2017). Posteriormente, esses achados foram confirmados nos compartimentos oxidativos e glicolíticos do músculo esquelético, assim como no coração e em células musculares *in vitro* de diferentes teleósteos. Essa grande quantidade de receptores de Igfl em peixes pode facilitar a atuação desse fator de crescimento e indicar funções metabólicas além daquelas observadas em mamíferos (Vélez et al, 2017).

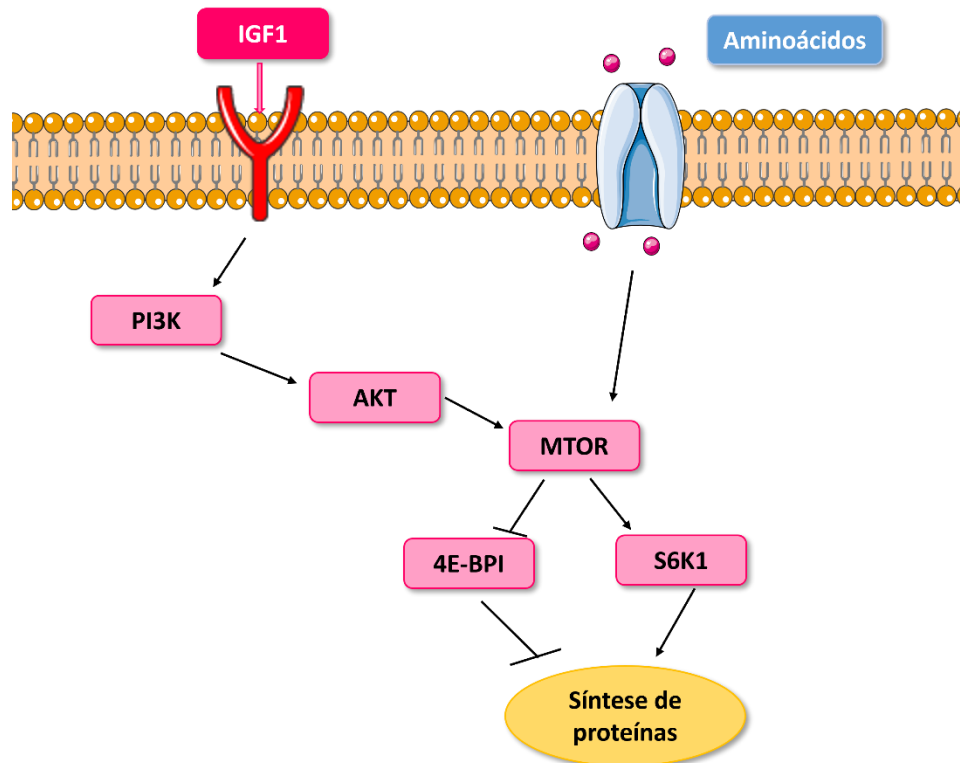


Figura 5. Estímulo e ativação de componentes downstream por fatores pró-crescimento. Após a ligação de IGF1 ao seu receptor, ocorre a fosforilação nos alvos *downstream* PI3k (phosphatidylinositol 3-kinase), Akt (protein kinase B) e Mtor (mechanistic target of rapamycin kinase). Uma vez fosforilada, Mtor fosforila 4e-bpi (eukaryotic translation initiation factor 4e-binding protein 1), inibidor do anabolismo, e S6k1 (ribosomal protein s6 kinase), efetor do anabolismo, resultando na síntese de proteínas. Alternativamente, os aminoácidos também são capazes de promover a fosforilação e ativação de Mtor. Adaptado de Vélez et al, 2017. Ícones obtidos em smart.servier.com.

Os efeitos de IGF1 na síntese proteica e hipertrofia são bem caracterizados em diversas espécies de peixes como *sea bream* (*Sparus aurata*), truta arco-íris, *Lates calcarifer* e *Fundulus grandis* (revisado por Fuentes et al, 2013). A correlação entre os níveis plasmáticos de IGF1 e as taxas de crescimento em salmão também foram observadas, assim como a administração direta de IGF1 levou ao aumento do tamanho corporal de juvenis dessa mesma espécie (revisado por Vélez et al, 2017). Além disso, o estímulo de IGF1 nos processos de proliferação e diferenciação celular foi comprovado em células musculares *in vitro* de peixes, como truta arco-íris e *sea bream* (Castillo et al, 2004; Vélez et al, 2014; Hue et al, 2023) e em diferentes meios de cultivos em mioblastos *in vitro* de truta arco-íris (Gabillard et al, 2010). Ainda, a suplementação de IGF1 estimulou maior captação de glicose comparada ao tratamento com insulina em truta arco-íris (Castillo et al, 2004), assim como estimulou a expressão de Glut4 (glucose transporter 4) em

mioblastos de juvenis dessa mesma espécie (Díaz et al, 2009) e mioblastos de *sea bream* (Montserrat et al, 2012), indicando efeitos adicionais de Igfl, além dos efeitos mitôgenicos, em células musculares de peixes.

A atuação e expressão de Igfl sofre influência de hormônios, como o Gh (*growth hormone*), hormônios sexuais esteroides, glicocorticoides e hormônios tireoidianos (3,5,3'-triiodothyronine, T3) e de variações ambientais e nutricionais (Wood et al, 2005). Da mesma forma, os componentes da via Igfl também podem ser influenciados por esses fatores e serem ativados independentemente da atividade de Igfl. Exemplo disso é a ativação de Mtor a partir da adição de aminoácidos na alimentação ou meio de cultivo celular de mioblastos de truta arco-íris (Seiliez et al, 2008) e *sea bream* (Vélez et al, 2014).

De fato, células musculares *in vitro* de salmão do Atlântico mantidas em restrição de nutrientes apresentaram aumento da fosforilação de Mtor e da expressão de *hsp90α*, assim como de co-chaperonas indicando a ativação da resposta ao processamento de proteínas quando aminoácidos foram adicionados ao meio de cultivo (Garcia de la Serrana e Johnston, 2013). Similarmente, a adição de aminoácidos junto a suplementação de insulina em mioblastos de truta arco-íris foi capaz de aumentar os efeitos anabólicos da insulina, maximizando a fosforilação de componentes da via de sinalização de Igfl (Seiliez et al, 2008). Em concordância, Vélez et al, 2014, observaram a ativação de Mtor, de forma independente da presença de Igfl, em células musculares de *sea bream* suplementadas com aminoácidos. A presença de aminoácidos também foi capaz de regular a transcrição e ativação de outros componentes do sistema de Igfs, como as Igfbps, fato observado em experimentos com salmão do Atlântico (Bower e Johnston, 2010; de la Serrana e Johnston, 2013).

Os resultados investigados até o momento indicam que em peixes tanto o Igfl quanto outros fatores pró-crescimento, como os aminoácidos, possuem atuação direta no crescimento muscular e que, aparentemente, os aminoácidos são capazes de estimular o crescimento muscular de forma efetiva independente de Igfl (Seiliez et al, 2008; Vélez et al, 2014). No entanto, até onde tange nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a modulação global de vias moleculares por esses fatores isoladamente na proliferação, diferenciação e hipertrofia de

células musculares de peixes. Estudos nesse sentido podem contribuir para caracterização da ação de Igf1 e aminoácidos especificamente nas células musculares e contribuir com novas estratégias de produção na aquicultura.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o perfil transcricional de células musculares de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) juvenis, isoladas e cultivadas em ambiente *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Comparar o perfil transcricional entre células musculares *in vitro* e do tecido muscular *in vivo* de pacus juvenis;

2.2.2. Identificar genes chaves na manutenção de células musculares de pacu em ambiente *in vitro*;

2.2.3. Caracterizar a comunicação entre células musculares *in vitro* e no tecido muscular de pacus juvenis;

2.2.4. Obter o perfil transcricional de células musculares *in vitro* de pacus juvenis submetidas a estímulos pró-crescimento;

2.2.5. Identificar as especificidades do mecanismo de atuação de Igfl e aminoácidos em células musculares *in vitro* de pacus.

3. Referências gerais

Abdelmoez, A.M., Puig, L.S., Smith, J.A.B., Gabriel, B.M., Savikj, M., Dollet, L., Chibalin, A.V., Krook, A., Zierath, J.R., Pillon, N.J., 2020. Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 318: C615–C626. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00540.2019>.

Allen, S.L., Elliott, B.T., Carson, B.P., Breen, L. 2023. Improving physiological relevance of cell culture: the possibilities, considerations, and future directions of the ex vivo coculture model. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023 324:2, C420-C427. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00473.2022>

Animal Diversity Web. Acesso em 23 de julho de 20203. Disponível em: https://animaldiversity.org/collections/contributors/Grzimek_fish/structure_function/v04_id131_con_axialmu/

Bairoch, A., 2018. The Cellosaurus, a cell line knowledge resource. *J. Biomol. Tech.* 29:25-38. <https://doi.org/10.7171/jbt.18-2902-002>.

Biga, P.R., Goetz, F.W., 2006. Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291; 5:R1327-37. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00905.2005>.

Blagden, C.S., Currie, P.D., Ingham, P.W., Hughes, S.M., 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev.* 11; 17:2163-75. <https://doi.org/10.1101/gad.11.17.2163>.

Bone, Q., 1978. Locomotor muscle, in: *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 361–424. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60168-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60168-5)

Bower, N.I., Johnston, I.A., 2010. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and insulin-like growth factors during myogenesis in Atlantic salmon. *PLoS One*; 5(6):e11100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011100>.

Buckingham, M., Rigby, P.W., 2014. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Dev Cell.* 28; 3:225-38. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.020>.

- Castillo, J., Codina, M., Martínez, M. L., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2004. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 286, R935–R941. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00459.2003>.
- Castillo, J., Ammendrup-Johnsen, I., Codina, M., Navarro, I. and Gutiérrez, J., 2006. IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1683–R1690. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00294.2005>.
- Chaturvedi, V., Dye, D.E., Kinnear, B.F., van Kuppevelt, T.H., Grounds, M.D., Coombe, D.R., 2015. Interactions between Skeletal Muscle Myoblasts and their Extracellular Matrix Revealed by a Serum Free Culture System. *PLoS One.* 10; 6:e0127675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127675>.
- Currie, P.D., Ingham, P.W., 2001. Introduction and Patterning of Embryonic Skeletal Muscle Cells in the Zebrafish. In: Johnston, I. A. *Muscle development and growth*. Academic Press, 2001. p. 1–14.
- Dal-Pai-Silva, M., Zanella, B.T.T., Duran, B.O.S., Almeida, F.L.A., Mareco, E.A., Paula, T.G., 2019. Cellular and molecular features of skeletal muscle growth and plasticity In: Baldisseroto, Urbinati e Cyrino. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press, pp. 165.
- Devoto, S.H., Melançon, E., Eisen, J.S., Westerfield, M., 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development.* 122; 11:3371–80. <https://doi.org/10.1242/dev.122.11.3371>.
- Díaz, M., Vraskou, Y., Gutiérrez, J., Planas, J.V., 2009. Expression of rainbow trout glucose transporters GLUT1 and GLUT4 during in vitro muscle cell differentiation and regulation by insulin and IGF-I. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 296, R794–R800. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90673.2008>.
- Ding, R., Horie, M., Nagasaka, S., Ohsumi, S., Shimizu, K., Honda, H., Nagamori, E., Fujita, H., Kawamoto, T., 2020. Effect of cell-extracellular matrix interaction on myogenic characteristics and artificial skeletal muscle tissue. *J Biosci Bioeng.* 130; 1:98-105. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.02.008>.
- Duran, B.O.S., Fernandez, G.J., Mareco, E.A., Moraes, L.N., Salomão, R.A., Gutierrez de Paula, T., Santos, V.B., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2015. Differential microRNA Expression in

- Fast- and Slow-Twitch Skeletal Muscle of *Piaractus mesopotamicus* during Growth. *PLoS One* 10; 11:e0141967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141967>.
- Duran, B.O.S., Góes, G.A., Zanella, B.T.T., Freire, P.P., Valente, J.S., Salomão, R.A.S., Fernandes, A., Mareco, E.A., Carvalho, R.F., Dal-Pai-Silva, M., 2019. Ascorbic acid stimulates the in vitro myoblast proliferation and migration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Sci Rep.* 9; 1:2229. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38536-4>.
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Freshney, R. I., 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. 732p, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Froehlich, J.M., Galt, N.J., Charging, M.J., Meyer, B.M., Biga, P.R., 2013a. In vitro indeterminate teleost myogenesis appears to be dependent on Pax3. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 49; 5:371-85. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9616-2>.
- Froehlich, J.M., Fowler, Z.G., Galt, N.J., Smith, D.L., Biga, P.R., 2013b. Sarcopenia and piscines: the case for indeterminate-growing fish as unique genetic model organisms in aging and longevity research. *Front Genet.* 4; 159. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00159>.
- Fuentes, E.N., Valdés, J.A., Molina, A., Björnsson, B.T., 2013. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone--insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol.* 192; 136-48. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.009>.
- Gabillard, J.C., Sabin, N., Paboeuf, G., 2010. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell Tissue Res* 342, 471–477. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1071-8>
- Garcia de la serrana, D., Johnston, I. A., 2013. Expression of Heat Shock Protein (Hsp90) Paralogues Is Regulated by Amino Acids in Skeletal Muscle of Atlantic Salmon. *PLoS One* 8, <https://doi.org/e74295.10.1371/journal.pone.0074295>.
- Glass, D.J., 2010. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13, 225–229. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833862df>
- Goswami, M., Yashwanth, B.S., Trudeau, V., Lakra, W.S., 2022. Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research. *Mol Biol Rep.* 49(3):2393-2411. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06997-4>.

Hue, I., Capilla, E., Rosell-Moll, E., Balbuena-Pecino, S., Goffette, V., Gabillard, J.C., Navarro, I., 2023. Recent advances in the crosstalk between adipose, muscle and bone tissues in fish. *Front Endocrinol (Lausanne)* 14; 1155202. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1155202>.

IBGE, 2022. Produção da Aquicultura. Pesquisa da Pecuária Municipal. URL <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940#resultado> (acesso em 07.07.2023).

Jiang, H., Bian, F., Zhou, H., Wang, X., Wang, K., Mai, K., He, G., 2017. Nutrient sensing and metabolic changes after methionine deprivation in primary muscle cells of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J Nutr Biochem.*; 50:74-82. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.08.015>.

Johnston, I.A., Davison, W., Goldspink, G., 1977. Energy metabolism of carp swimming muscles. *J. Comp. Physiol. B: Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 114, 203–216 <https://doi.org/10.1007/BF00688970>.

Johnston, I.A., Bower, N.I., Macqueen, D.J., 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J Exp Biol.* 214; 1617-28. <https://doi.org/10.1242/jeb.038620>.

Keenan, S.R., Currie, P.D., 2019. The Developmental Phases of Zebrafish Myogenesis. *J Dev Biol.* 7, 2:12. <https://doi.org/10.3390/jdb7020012>.

Kim, J.H., Jin, P., Duan, R., Chen, E.H., 2015. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr Opin Genet Dev.* 32:162-70. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.006>.

Landemaine, A., Rescan, P.Y., Gabillard, J.C., 2014. Myomaker mediates fusion of fast myocytes in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 451; 4:480-4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.093>.

Lund, D.K., Cornelison, D.D., 2013. Enter the matrix: shape, signal and superhighway. *FEBS J.* 280; 17:4089-99. <https://doi.org/10.1111/febs.12171>.

Luo, Y., Jiao, J., Jin, A., Hussain, D., Chen, L., Qiao, F., Zhang, M., Du, Z., 2023. Metabolism of linoleic and linolenic acids in muscle cells of two freshwater fish with n-3 or n-6 fatty acid requirements. *Aquaculture*; 563, 738994. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738994>.

Macmillan learning. Acesso em 23 de julho de 2023. Disponível em https://www.macmillanhighered.com/BrainHoney/Resource/6716/digital_first_content/trunk/test/hillis2e/hillis2e_ch33_4.html.

- McMullen, P.D., Pendse, S.N., Black, M.B., Mansouri, K., Haider, S., Andersen, M.E., Clewell, R.A., 2019. Addressing systematic inconsistencies between in vitro and in vivo transcriptomic mode of action signatures. *Toxicol. Vitro.* 58, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.014>.
- Montserrat, N., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2012. Metabolic Effects of Insulin and IGFs on Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Muscle Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 26; 3:55. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00055>.
- Otava, M., Shkedy, Z., Talloen, W., Verheyen, G.R., Kasim, A., 2015. Identification of in vitro and in vivo disconnects using transcriptomic data. *BMC Genomics* 16, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1726-7>
- Párrizas, M., Plisetskaya, E.M., Planas, J., Gutiérrez, J., 1995. Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen Comp Endocrinol.* 98; 1:16-25. <https://doi.org/10.1006/gcen.1995>.
- Romagnoli, C., Brandi M.L., 2021. Muscle Physiopathology in Parathyroid Hormone Disorders. *Front. Med.* 8:764346. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.764346>
- Saad, M.K., Yuen, J.S.K., Joyce, C.M. L., Li, X., Lim, T., Wolfson, T.L., Wu, J., Laird, J., Vissapragada, S., Calkins, O.P., Ali, A., Kaplan, D.L., 2023. Continuous fish muscle cell line with capacity for myogenic and adipogenic-like phenotypes. *Sci Rep* 13, 5098. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31822-2>.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity. In: *Muscle development and growth*. San Diego: Academic Press, pp. 187–250.
- Seiliez, I., Gabillard, J.-C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutierrez, J., Kaushik, S., Panserat, S., Tesseraud, S., 2008. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R329–R335. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00146.2008>.
- Shi, J., Bi, P., Pei, J., Li, H., Grishin, N.V., Bassel-Duby, R., Chen, E.H., Olson, E.N., 2017. Requirement of the fusogenic micropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114; 45:11950-11955. <https://doi.org/10.1016/10.1073/pnas.1715229114>.
- Stickney, H.L., Barresi, M.J.F., Devoto, S.H., 2000. Somite development in zebrafish. *Dev. Dyn.* 219, 287 – 303. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::AID-DVDY1065>3.0.CO;2-A).

- Urbinati, E.C., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil*. UFSM - Santa Maria, pp. 225–255.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Jiménez-Amilburu, V., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2014. IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.05.024>.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Azizi, S., Montserrat, N., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2016. Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle physiology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*; 199:67-73. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.12.003>.
- Vélez, E.J., Lutfi, E., Azizi, S., Perelló, M., Salmerón, C., Riera-Codina, M., Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2017. Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture* 467; 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.004>.
- Volkoff, H., Esatevan Sabioni, R., Coutinho, L.L., Cyrino, J.E.P., 2017. Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Tissue distribution and effects of food quantity and quality on gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 203, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.022>.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55; 1-18. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb01042.x>.
- Watabe, S., 2001. Myogenic Regulatory factors. In: Johnston, I.A. *Muscle development and growth*. Academic Press, pp. 19–36.
- Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int Rev Cytol.* 243; 215-85. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43004-1).
- Zanella, B.T.T., Magiore, I.C., Duran, B.O.S., Pereira, G.G., Vicente, I.S.T., Carvalho, P.L.P.F., Salomão, R.A.S., Mareco, E.A., Carvalho, R.F., Paula, T.G.d., Barros, M.M., Dal-Pai-Silva, M., 2021. Ascorbic Acid Supplementation Improves Skeletal Muscle Growth in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Juveniles: In Vivo and In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2995. <https://doi.org/10.3390/ijms22062995>.

Zhi, S., Wang, J., Wang, Y., Yang, L., Qin, C., Yan, X., Zhao, M., Liu, M., Qu, L., Nie, G., 2023. Establishment and characterization of Yellow River carp (*Cyprinus carpio haematopterus*) muscle cell line and its application to fish virology and immunology. *Fish Shellfish Immunol.*;139:108859. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108859>.

CAPÍTULO I

*Caracterização do perfil transcricional de células musculares de pacu
in vitro em relação ao tecido muscular in vivo*

Caracterização do perfil transcricional de células musculares de pacu *in vitro* em relação ao tecido muscular *in vivo*

Bruna Tereza Thomazini Zanella¹, Érika Stefani Perez¹, Mirely Francine dos Santos Barbosa¹, Jéssica Silvino Valente¹, Bruno Oliveira da Silva Duran², Maeli Dal-Pai-Silva¹

¹Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP.

²Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, GO.

Resumo

Pesquisas utilizando experimentos *in vitro* tem mostrado inúmeras contribuições para as diferentes áreas do conhecimento. Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para melhor adaptação e semelhança de ensaios *in vitro* aos modelos *in vivo* incluindo pesquisas recentes envolvendo crescimento muscular e produção de carne. Além disso, esse modelo experimental tem contribuído para melhor compreensão da biologia do tecido muscular esquelético e dos mecanismos que contribuem para o seu crescimento em peixes. No entanto, algumas discrepâncias ainda são observadas entre os modelos experimentais principalmente para os organismos não-modelos. Neste trabalho caracterizamos o perfil transcricional de células musculares *in vitro* e do tecido muscular *in vivo* de pacus juvenis através de sequenciamento de RNA. No modelo *in vitro*, encontramos enriquecimento de processos relacionados a proliferação e comunicação celular, assim como metabolismo glicolítico e, principalmente, estabelecimento de matriz extracelular. No modelo *in vivo* foram enriquecidos processos de desenvolvimento e contração muscular, metabolismo energético e processamento de aminoácidos. Foram selecionados para validação por RTq-PCR genes com localização central nas redes de interações, que apresentaram uma quantidade significativa de counts e que possuem papel relevante para o desenvolvimento e atividade muscular já descritos na literatura. Corroborando os nossos dados *in silico*, os genes *fn1a* (*fibronectin 1a*), *hk1* (*hexokinase 1*) e *ctnnb1* (*catenin (cadherin-associated protein) beta 1*)), respectivamente, relacionados à matriz extracelular, metabolismo glicolítico e à proliferação e diferenciação celular, tiveram maior expressão no modelo *in vitro*, enquanto os genes *ckma* (*creatina kinase, muscle a*), *acat1* (*acetyl-CoA acetyltransferase 1*), *mdh2* (*malate dehydrogenase 2, NAD*) e *pkmb* (*pyruvate kinase M1/2b*), associados respectivamente a produção de ATP, oxidação de ácidos graxos, metabolismo oxidativo e glicolítico, tiveram maior expressão no modelo *in vivo*. Em adição, os

genes *musk* (*muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase*), *chrna1* (*cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1*) e *clu* (*clusterin*), cujas proteínas possuem localização extracelular, tiveram maior expressão no modelo *in vivo* em relação ao modelo *in vitro*. Os dados obtidos podem propiciar o desenvolvimento de estratégias para a manutenção de células musculares de peixes *in vitro*, assim como maximizar a produção desses animais em sistemas de cultivo de forma sustentável através da melhoria da tecnologia de cultivo de células musculares, ampliando o conhecimento para produção de carne de peixes em sistema *in vitro*.

1. Introdução

O setor pesqueiro e os sistemas de piscicultura contribuem mundialmente para o crescimento das esferas econômicas e alimentícias. A produção mundial do setor da aquicultura foi estimada em 178 milhões de toneladas em 2020, sendo 89% dessa produção voltada apenas para o consumo humano (FAO, 2022). A produção nacional conta com o cultivo de diversas espécies inseridas, como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), e nativas, entre os quais, os peixes classificados como redondos: o tambaqui (*Colossoma macropomum*), tambacu (híbrido entre tambaqui e pacu) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que em conjunto totalizaram 147 mil toneladas da produção nacional em 2021 (IBGE, 2022). O pacu é encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai e possui características favoráveis para a aquicultura intensiva, como um rápido crescimento e boa adaptação à diferentes tipos de alimentação (Urbinati e Gonçalves, 2005; Volkoff et al, 2017), tendo sido produzidos 9.5 mil toneladas dessa espécie somente no ano de 2021, no Brasil (IBGE, 2022).

Além de terem importância para a alimentação humana, os peixes são excelentes modelos para o estudo do tecido muscular. Nesses animais, o músculo esquelético corresponde a aproximadamente 60% da massa corporal, sendo recrutado nos movimentos de natação, sustentação, captura de presas e fuga de predadores (Bone, 1978). O músculo esquelético em peixes apresenta características que os diferenciam de outros grupos como a compartimentalização especializada de fibras musculares fisiologicamente distintas, assim como a manutenção do crescimento por hiperplasia e hipertrofia após as fases iniciais de desenvolvimento (Sänger e Stoiber, 2001). O crescimento e formação do tecido muscular, tanto por hiperplasia quanto de hipertrofia, depende da proliferação e diferenciação de células musculares. A compreensão sobre estes processos vem avançando nas últimas décadas através

da contribuição dos estudos *in vitro* que permitem a visualização e análise da recapitulação da miogênese de forma facilitada (Gabillard et al, 2010; Vélez et al, 2015).

A contribuição dos achados obtidos por estudos *in vitro* é inegável não só referente a biologia do tecido muscular, como também para uma série de questões que requerem a resposta específica de determinado tipo celular, um grande controle dos fatores externos, ou a estimulação e inibição de moléculas-alvo (Vélez et al, 2015). Ainda, essa metodologia pode reduzir os custos e tempo despendidos em experimentos e não carregam as questões éticas inerentes aos experimentos com modelos animais (Adams, 2019).

Nesse sentido, investigações utilizando cultura primária de células musculares de peixes trouxeram importantes contribuições sobre a formação do tecido muscular e sobre os aspectos celulares e moleculares que governam esse processo (Vélez et al, 2015). Embora sejam necessários maiores esclarecimentos para o desenvolvimento de modelos experimentais com células de peixes, a manutenção de células musculares *in vitro* vem apresentando um grande potencial para a produção de carne em laboratório, processo que reduz não só a utilização de animais no setor agropecuário como também reduz o consumo de energia, água e espaço para a produção de carne (Tuomisto e Teixeira De Mattos, 2011).

No entanto, apesar das importantes contribuições dos estudos utilizando modelos *in vitro*, algumas discrepâncias são observadas ao extrapolar os resultados obtidos através deste modelo para situações *in vivo*, principalmente em estudos farmacológicos e na caracterização do fenótipo em modelos específicos como em *knockout* de genes (Adams, 2019; McMullen et al, 2019; Otava et al, 2015). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias que busquem caracterizar e adaptar as culturas celulares para maior semelhança com os processos que acontecem nos animais. As análises globais podem contribuir para a caracterização molecular de modelos *in vitro* e *in vivo* e para a compreensão do que os diferem, possibilitando assim a criação de novas estratégias que tornem os estudos *in vitro* ainda mais eficazes. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o perfil transcriptômico de células musculares isoladas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em relação ao tecido muscular *in vivo* de juvenis dessa mesma espécie.

2. Metodologia

2.1. Cultivo dos animais

Pacus juvenis de 12-20g foram cultivados à 28 °C em caixas d'água de 0,5 m³ em fotoperíodo de claro e escuro de 12 horas no biotério de organismos aquáticos localizado no

Setor de Morfologia do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências de Botucatu. A alimentação foi realizada uma vez ao dia com dieta comercial apropriada (Guabi-Pirá, extrusada, 28% proteína, 5% extrato etéreo, 16,5% matéria mineral, 7% fibras, 1,5% cálcio, 0,6% fósforo, 300 mg/kg vitamina C, 87,5 UI/kg vitamina E). Os animais foram eutanasiados com excesso de benzocaína, em uma concentração acima de 250 mg/L. Foram coletados fragmentos da musculatura branca, da região epaxial (dorsal), de aproximadamente 12 peixes em cada processo de estabelecimento de culturas primárias e de 6 peixes para a coleta das amostras musculares *in vivo*. Esse projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu e aprovado sob protocolo 1050-CEUA. Os procedimentos foram conduzidos em concordância com ARRIVE guidelines (Kilkenny et al, 2010)

2.2. Cultura primária de células musculares

O protocolo para isolamento e cultura celular de mioblastos foi realizado conforme descrição de Fauconneau e Paboeuf, 2000, no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (IBB/UNESP). Inicialmente, as superfícies externas dos animais foram esterilizadas em álcool 70%. Amostras da musculatura branca foram coletadas em meio de extração (DMEM, 9mM NaHCO₃, 20mM HEPES, 15% soro de cavalo e 1% antibióticos e antifúngicos (penicilina, estreptomicina e anfotericina B); Sigma-Aldrich) e dissociadas mecanicamente utilizando-se bisturis. Os fragmentos musculares foram lavados em meio de lavagem (DMEM, 9mM NaHCO₃, 20mM HEPES e 1% antibióticos; Sigma-Aldrich) e centrifugados por 5 minutos. As amostras foram digeridas pela adição de 0.2% de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich), durante 1 hora e 20 minutos, seguida de centrifugação por 20 minutos. Para a quebra de contato célula-célula foi adicionada 0.1% de tripsina (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado e adicionado ao meio de extração. O pellet de células foi ressuscitado em meio completo (DMEM, 9mM NaHCO₃, 20mM HEPES, 10% soro fetal bovino e 1% antibióticos; Sigma-Aldrich) e filtrado em filtros de 100 e 40 µm (Corning). As amostras foram diluídas na concentração de 2x10⁶ células/mL e plaqueadas em placas de 6 poços previamente tratadas com poli-L-lisina e laminina (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas em estufa a 28°C até atingirem 80-90% de confluência, aproximadamente após 12 dias de cultivo. Diariamente, o meio de cultivo foi renovado e a morfologia das células foi monitorada em microscópio invertido. Os resultados foram obtidos a partir de 3 a 5 processos independentes de isolamento das células musculares.

2.3. Extração e sequenciamento de RNA

O RNA total foi extraído das amostras *in vitro* e *in vivo* seguindo o protocolo do reagente *TRIzol*® (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de *TRIzol*® e o homogeneizado foi mantido por 5 minutos à temperatura ambiente (25 °C). Foi acrescentado 0.2 mL de clorofórmio por amostra, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado por 15 minutos e a fase aquosa foi coletada. O RNA total foi precipitado através de álcool isopropílico. Em seguida, o material foi novamente centrifugado por 15 minutos e o pellet de RNA foi lavado com etanol 75%. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e após secagem, o RNA foi dissolvido em *UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free* (Thermo Fisher Scientific) e armazenado a -80°C.

O RNA foi quantificado em espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare), que fornece a medida de absorvância a 260 nm/280 nm, identificando a quantidade de RNA/proteínas presentes nas amostras, permitindo a análise da pureza do RNA extraído pela obtenção de uma razão 260/280 nm superior a 1.8. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese capilar no sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent), que fornece um número de integridade do RNA (RIN) baseado num sistema numérico de 1 a 10, sendo 1 o perfil de maior degradação e 10 o perfil de maior integridade. Foram utilizadas somente amostras com um RIN superior a 7.0.

Foram enviadas 03 amostras de cada grupo experimental para a construção de bibliotecas e sequenciamento de mRNAs realizados pela empresa LC Sciences, sediada em Houston, Texas (EUA), com base na plataforma Illumina NovaSeq 6000. Cada biblioteca foi submetida a um pipeline específico de modo a obter os valores de reads para os mRNAs, os quais foram utilizados para os cálculos de expressão diferencial entre os modelos experimentais.

2.4. Montagem e análise do transcriptoma

O RNA total foi fragmentado e purificado e, para a construção de bibliotecas de cDNA, foram realizadas as etapas de hibridação e ligação de adaptadores, transcrição reversa, purificação, amplificação e quantificação do cDNA. O cDNA foi então diluído e utilizado para amplificação de seus fragmentos. Os dados resultantes do sequenciamento foram disponibilizados por um link providenciado pela empresa, e transferidos para a estrutura computacional de alto desempenho do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado, do Instituto de Biociências de Botucatu, que consiste em uma estação com 64 gigabytes de memória e 24 núcleos de processamento. O processamento de dados foi realizado em sistema

operacional GNU/Linux, com base na distribuição Linux Mint 18.1 (disponível em www.linuxmint.com).

A qualidade do sequenciamento foi avaliada por meio do software FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc), versão 0.10.1. Através do software Trimmomatic (Bolger et al, 2014), os adaptadores foram removidos, assim como reads com baixa qualidade de leitura, aqui considerados com phred score < 33 . O transcriptoma foi montado através do software Trinity (Grabherr et al, 2011; Haas et al, 2013) utilizando-se a metodologia “*de novo*”, uma vez que a espécie avaliada não possui genoma disponível. Os reads foram alinhados utilizando o alinhador Bowtie2 (Langmead e Salzberg, 2012) tendo como referência o proteoma das espécies *Danio rerio*, *Pygocentrus nattereri* e *Astyanax mexicanus* disponíveis na plataforma Ensembl Genome Browser 89 (Howe et al, 2021). Os resultados de alinhamento foram submetidos a cálculos de expressão diferencial em ambiente R, a partir da quantidade de *counts* de cada gene, utilizando o pacote DESeq2 (Love et al, 2014). Os genes foram considerados como diferencialmente expressos somente quando apresentaram valor de p-ajustado < 0.05 e valor de Log2 de fold change > 1.5 para genes up-regulados (com maior expressão no modelo *in vitro*) e < -1.5 para genes down-regulados (com maior expressão no modelo *in vivo*).

2.5. Análise dos genes diferencialmente expressos (GDEs)

Para o agrupamento das amostras de cada modelo experimental de acordo com o perfil transcricional, realizamos a análise de componente principal a partir dos *counts* normalizados em escala Log2 utilizando-se o pacote DESeq2 em ambiente R (Love et al, 2014).

A análise dos processos biológicos foi conduzida utilizando a ferramenta Gene Ontology (Ashburner et al, 2000; Carbon et al, 2021), considerando os dados de *Danio rerio* como referência (Panther Overrepresentation Test, Released 20210224; GO Ontology database doi: 10.5281/zenodo.5725227, Released 2021-11-16). Foi aplicado o teste estatístico de Fisher com correção de False Discovery Rate (FDR) em cada análise. Foram considerados significativos os processos com valor de Fold Enrichment > 2.0 , considerando que esse parâmetro indica a razão entre a proporção do número dos GDEs observados nos dados submetidos em relação à quantidade esperada de genes de referência participantes de um determinado processo biológico. Os dez termos com maior valor de Fold Enrichment em cada modelo experimental foram utilizados para construção de gráficos em ambiente R utilizando o pacote ggplot2 (Wickham, 2016).

2.6. Redes de interação

As redes de interação entre os GDEs observados em cada modelo experimental foram construídas utilizando-se a ferramenta STRING 11.5 (Szklarczyk et al, 2019) considerando o valor de *score* > 0.9 para os processos biológicos e *score* > 0.6 para componente celular. Os GDEs foram classificados por cor de acordo com o tipo de processo biológico do qual participam. As redes de interação foram customizadas utilizando a ferramenta Cytoscape (Shannon et al, 2003) para que a cor dos nodos referentes a cada processo biológico representasse a referida classificação.

2.7 Identificação e seleção de genes em ambiente extracelular

No contexto de nosso estudo, a fim de identificar possíveis componentes envolvidos na comunicação celular, a partir da lista dos GDEs em cada modelo experimental selecionamos os genes preditos de serem traduzidos em proteínas localizadas no ambiente e matriz extracelular. A possível localização dos genes foi obtida através da ferramenta Gene Ontology (Ashburner et al, 2000; Carbon et al, 2021), considerando os dados de *Danio rerio* como referência (Panther Overrepresentation Test, Released 20210224; GO Ontology database doi: 10.5281/zenodo.5725227, Released 2021-11-16).

2.8. Seleção de genes para validação

Os seguintes parâmetros foram considerados para seleção dos GDEs a serem validados por RTq-PCR: genes que participam de processos biológicos enriquecidos em cada modelo experimental, cuja média de *counts* tenha sido maior que zero em cada grupo, que tenham função biológica relevante para o metabolismo muscular e que, preferencialmente, sejam caracterizados como centrais. A identificação dos genes centrais (*hub*) em cada rede de interação foi realizada utilizando o plugin para o Cytoscape, cytoHubba (Chin et al, 2014), que analisa o grau de interação entre os componentes da rede utilizando onze parâmetros estatísticos, resultando em um ranking dos genes com o maior número de interações. Neste trabalho o método de ranqueamento aplicado foi o “Degree”. Os genes foram definidos como centrais quando apresentaram no mínimo sete interações.

2.9 Validação por RTq-PCR e análise estatística

Os níveis de expressão dos genes selecionados na etapa anterior foram detectados por PCR em tempo real, através da plataforma QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) localizado no Laboratório de Biologia do Músculo Estriado (LBME)

do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (IBB/UNESP). Todas as análises foram realizadas em conformidade com as diretrizes do Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments (MIQE) (Bustin et al, 2009). As amostras de cDNA foram amplificadas utilizando-se o GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e primers específicos para cada alvo molecular. Primers foram desenhados a partir das sequências identificadas no transcriptoma (Tabela 1) e a síntese foi realizada pela empresa Exxtend (Brasil). Os primers foram diluídos em UltraPure™ Distilled Water DNase, RNase Free (Thermo Fisher Scientific) e suas concentrações ajustadas para 5 µM. A quantificação relativa da expressão dos genes foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando o software DataAssist™ v3.01 (Thermo Fisher Scientific). A expressão dos genes alvos foi normalizada pela expressão do gene endógeno *hprt1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) cujo valor foi constante entre as amostras e entre os grupos experimentais. Após a realização do teste de normalidade (Shapiro-Wilk), foi realizado teste T para os dados em distribuição normal e o teste de Mann-Whitney foi aplicado para os dados em distribuição não normal. Todos os testes foram realizados em ambiente R, adotando intervalo de confiança de 95% (Zar, 2009). Gráficos de expressão gênica foram construídos em ambiente R, utilizando o pacote ggplot2 (Wickham, 2016).

Tabela 1. Primers sintetizados a partir do transcriptoma do pacu para validação dos genes alvos selecionados.

Gene	Sequência
<i>hprt1</i> (<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)	F: CACTATGCTGCTGACCTGGA R: GCGAAGAAGCTTGTAGCCTCCT
<i>fn1a</i> (<i>fibronectin 1a</i>)	F: GGAAATCCCATCTCCAAGT R: TCACGCTCAGTCAGTCCATC
<i>ctnnb1</i> (<i>catenin (cadherin-associated protein) beta 1</i>)	F: GTGGCAACACCCTCATTCT R: GAATTAGCCCAGGACAAGGA
<i>hk1</i> (<i>hexokinase 1</i>)	F: AATGCCCAACAACAAGAG R: GCAGGCTGTTTTTCAGAAGG
<i>tgfb2</i> (<i>transforming growth factor, beta 2</i>)	F: TTCAAGAGGGACCTTGGATG R: AGGACCTTGCTGTGCTGAGT

<i>ckma</i> (<i>creatine kinase, muscle a</i>)	F: TTCACCAAAGCCGAAATAGG R: AACTGGGCATCAGAGACAGG
<i>acat1</i> (<i>acetyl-CoA acetyltransferase 1</i>)	F: TGTGCTCTTCCGATCTGTTG R: TGAGAGGCTCCCTTTGAATG
<i>mdh2</i> (<i>malate dehydrogenase 2, NAD</i>)	F: GACATCGTCAGAGCCAACAC R: TGATTGTCTTTCCAGCGTGA
<i>pkmb</i> (<i>pyruvate kinase M1/2b</i>)	F: GTCCTCAGCCCACACATCAT R: ACCCGTAATGGACAGACAGC
<i>musk</i> (<i>muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase</i>)	F: GGAACACACAATGTCACCGC R: TCTCTGTAAGCCCCCGATCA
<i>chrn1</i> (<i>cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1</i>)	F: GGTCTTTGTCATCGCCTCCA R: CAAACAGCGGTATGGCAGTG
<i>clu</i> (<i>clusterin</i>)	F: GAGCACACGTCTGAACTCCA R: TCTTTCCCAAGTCCCGCATC

3. Resultados

3.1. Caracterização histológica das células musculares *in vitro* e do tecido muscular *in vivo*

Entre os 10º e 12º dias de cultivo celular foi observada a predominância de células musculares alongadas e multinucleadas. Nessa fase, também foi possível observar, em menor proporção, células musculares arredondadas e com um único núcleo (Fig. 1A). Durante esse período de cultivo, a confluência de células atingiu em torno de 80-90% como observado nas imagens de visualização por contraste (Fig.1B).

O tecido muscular esquelético de pacu juvenil, compartimento glicolítico, foi caracterizado pela presença de fibras musculares de diferentes diâmetros, distribuídas em mosaico, multinucleadas com núcleos periféricos, com aspecto cilíndrico e circundadas individualmente e em feixes por tecido conjuntivo (Figs. 1C-D).

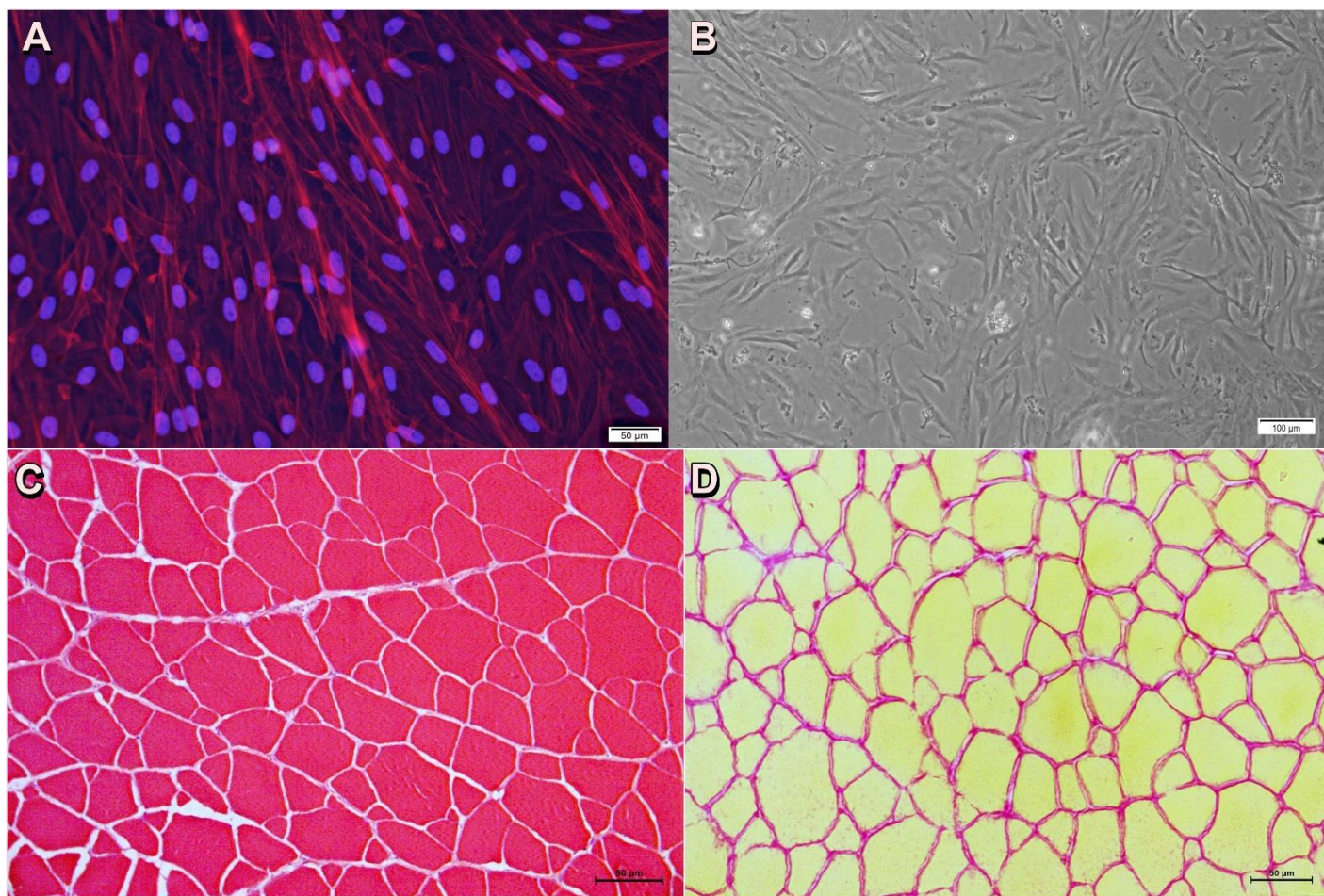


Figura 1. Células musculares *in vitro* e corte histológico do tecido muscular *in vivo* de pacus juvenis. A) Marcação de células musculares *in vitro* por imunofluorescência, núcleo marcado por DAPI (azul), actina marcada por Texas Red (vermelho). Presença de células multinucleadas e mononucleadas (aumento: 20x; barra: 50um), imagens obtidas no 12º dia de cultivo celular. B) Visualização de células musculares de pacu por contraste, imagens obtidas em microscópio invertido (aumento: 10x; barra: 100um), imagens obtidas no 12º dia de cultivo celular. C-D) Corte histológico do tecido muscular esquelético de pacu, compartimento glicolítico. Coloração por hematoxilina em roxo e eosina em vermelho (C) e picrosirius red (D), fibras musculares em amarelo e colágeno em vermelho (aumento: 10x; barra: 50um).

3.2. Métricas do sequenciamento e análise de componente principal

O sequenciamento de RNA das amostras de células musculares *in vitro* resultou em 77.361.335 *reads* enquanto 82.172.854 *reads* foram obtidas a partir do sequenciamento do tecido muscular *in vivo*, sendo obtidos aproximadamente 26.000 *reads* por amostra. Os *reads* das amostras *in vitro* e *in vivo* foram montadas em 334.638 *contigs*, dos quais 127.086 foram identificados e anotados. Após normalização, 9.300 genes foram considerados como diferencialmente expressos sendo 5.785 genes com maior expressão no modelo *in vitro* e 3.515 genes com maior expressão no modelo *in vivo* (Tabela 2, Material Suplementar – Tabela S1).

Tabela 2. Métricas obtidas a partir do sequenciamento de células musculares *in vitro* e do tecido muscular *in vivo* de pacu.

Parâmetros	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Reads	77.361.335	82.172.854
Contigs	334.638	
Genes anotados	127.086	
Genes normalizados	109.368	
Genes diferencialmente expressos	5.785	3.515
Processos enriquecidos	198	186

A análise de componente principal mostrou uma clara separação entre as amostras dos modelos experimentais, indicando que o perfil transcricional desses modelos difere entre si. Além disso, observamos maior homogeneidade entre as amostras do modelo *in vitro* do que entre as amostras do modelo *in vivo*, o que já se espera devido a maior quantidade de variáveis presentes no ambiente sistêmico do tecido muscular (Figura 2).

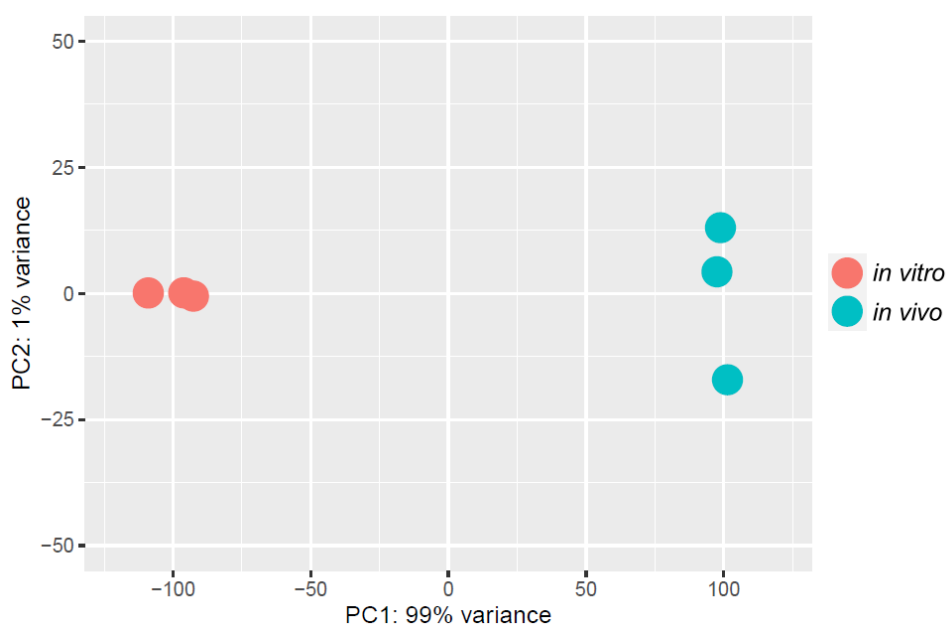


Figura 2. Análise de componente principal de células musculares *in vitro* (vermelho) e tecido muscular *in vivo* (azul) de pacu, n = 3 amostras/grupo.

3.3. Análise de enriquecimento de processos biológicos

Para melhor caracterização do perfil transcricional, foi realizado o enriquecimento de processos biológicos a partir dos GDEs observados *in vitro* e *in vivo*.

Foram selecionados 198 processos biológicos enriquecidos pelos GDEs mais expressos no modelo *in vitro* que foram relacionados, principalmente, à proliferação celular (mitose, divisão celular e reparo de DNA); crescimento celular; comunicação célula-célula, mediado principalmente por Wnt; transporte intracelular mediado por vesículas; síntese de componentes de matriz extracelular (MEC); glicosilação de proteínas e metabolismo glicolítico (Figura 3, Material Suplementar S1).

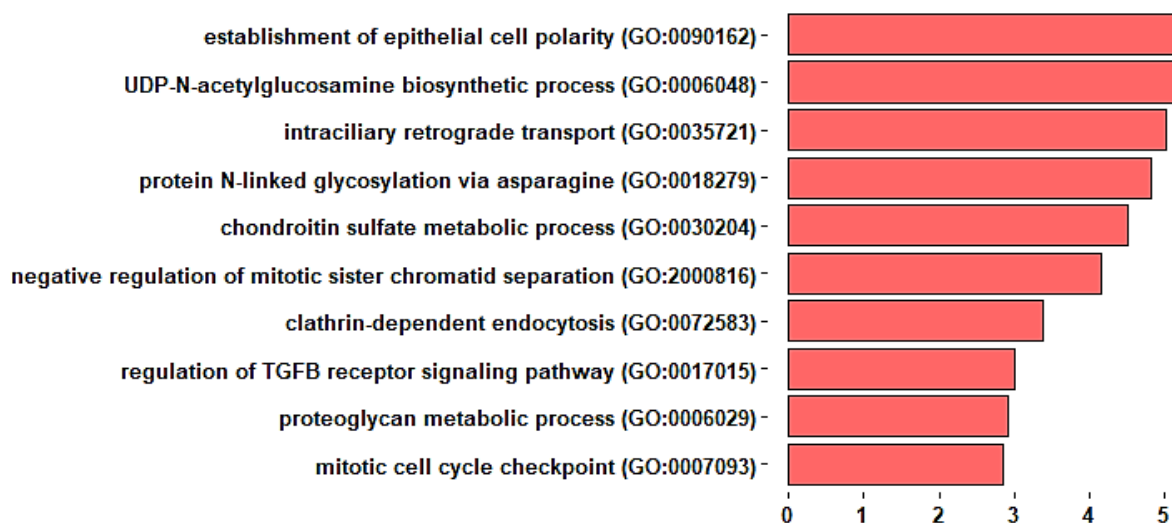


Figura 3. Dez principais processos biológicos enriquecidos pelos GDEs com maior expressão no modelo *in vitro*. Teste de Fisher. False Discovery rate (FDR) < 0.05. Valores no eixo x se referem ao parâmetro da plataforma Gene Ontology de Fold Enrichment.

Os processos biológicos primários foram agrupados sob nomenclaturas mais específicas, elaboradas a fim de facilitar a organização e compreensão dos resultados. A categoria "proliferação celular" engloba processos que correspondem a atividades como organização do fuso mitótico, organização de citoesqueleto para a mitose, separação de cromátides irmãs, replicação de DNA e fusão de membrana (Figura 4A). Os processos envolvidos com crescimento e organização de estrutura celular foram relacionados à organização de actina e citoesqueleto, estabelecimento de polaridade celular, processos de crescimento, regulação da morfologia da célula e de localização de proteínas (Figura 4A).

Considerando a comunicação célula-célula e trânsito de vesículas, os principais processos enriquecidos foram relacionados à sinalização de Wnt, sendo identificados tanto componentes de sua sinalização quanto mediado por receptores, e transporte de vesículas via

microtúbulos relacionados a endocitose e comunicação entre organelas como retículo endoplasmático e sistema de Golgi (Figura 4B).

Os processos relacionados ao metabolismo energético e estabelecimento da MEC corresponderam à glicosilação de proteínas, biossíntese de glicosaminoglicanos, metabolismo de hexose, manose e monossacarídeos, biossíntese de componentes de membrana celular como o colesterol e organização de componentes da MEC como colágeno e proteoglicanos (Figura 4C).

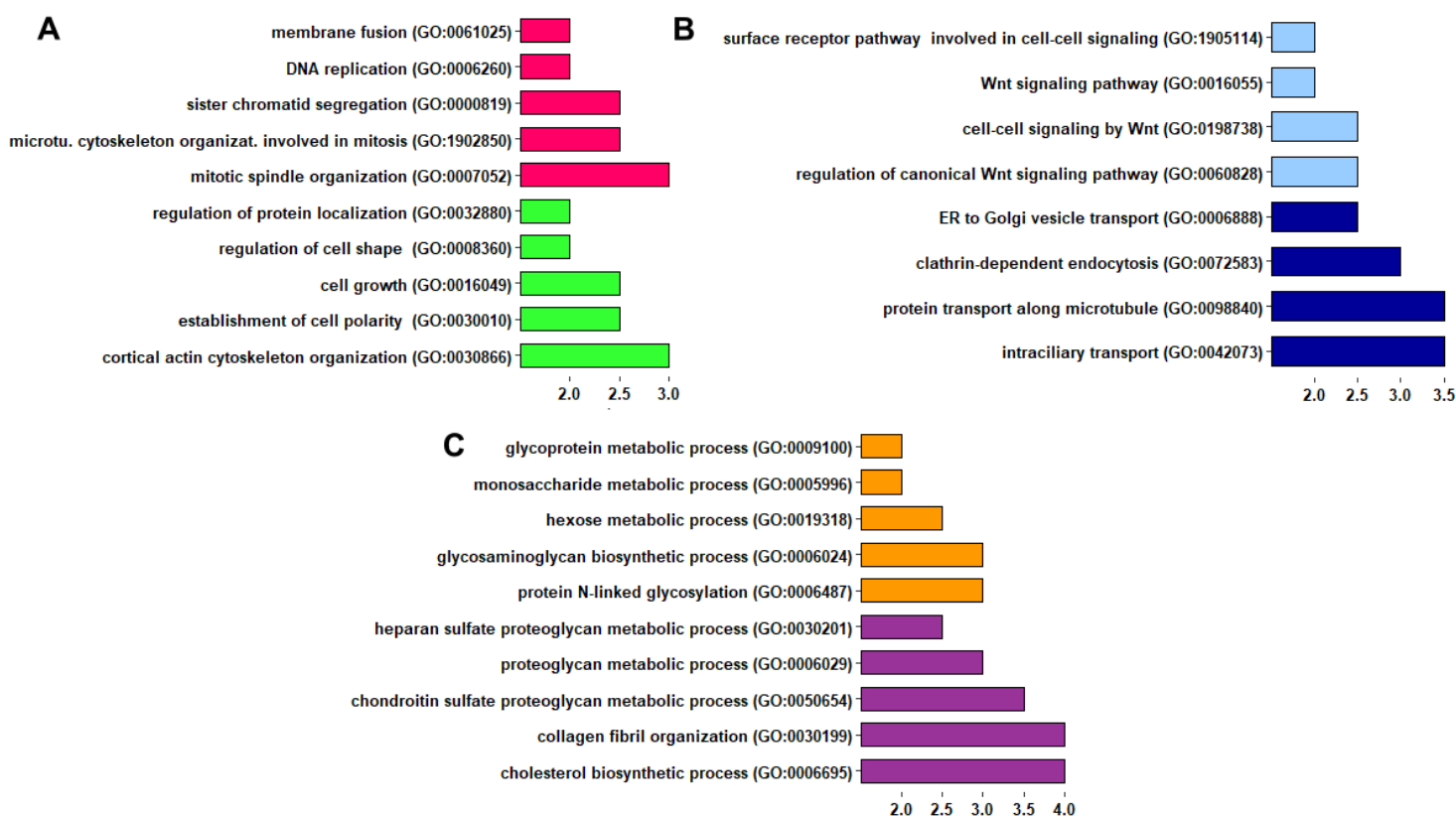


Figura 4. Processos biológicos enriquecidos pelos GDEs *in vitro* categorizados em (A) proliferação (rosa) e organização celular (verde), (B) comunicação celular (azul claro) e transporte de vesículas (azul escuro) e (C) metabolismo glicolítico (alaranjado) e glicosilação de proteínas/MEC (roxo). Teste de Fisher. False Discovery rate (FDR) < 0.05. Valores no eixo x se referem ao parâmetro da plataforma Gene Ontology de Fold Enrichment.

Em relação ao modelo *in vivo*, foram selecionados 186 processos biológicos relacionados ao desenvolvimento e contração muscular; metabolismo mitocondrial; combate a espécies reativas de oxigênio (EROs); metabolismo de ácidos graxos; biossíntese de nucleotídeos e processamento de proteínas (Figura 5).

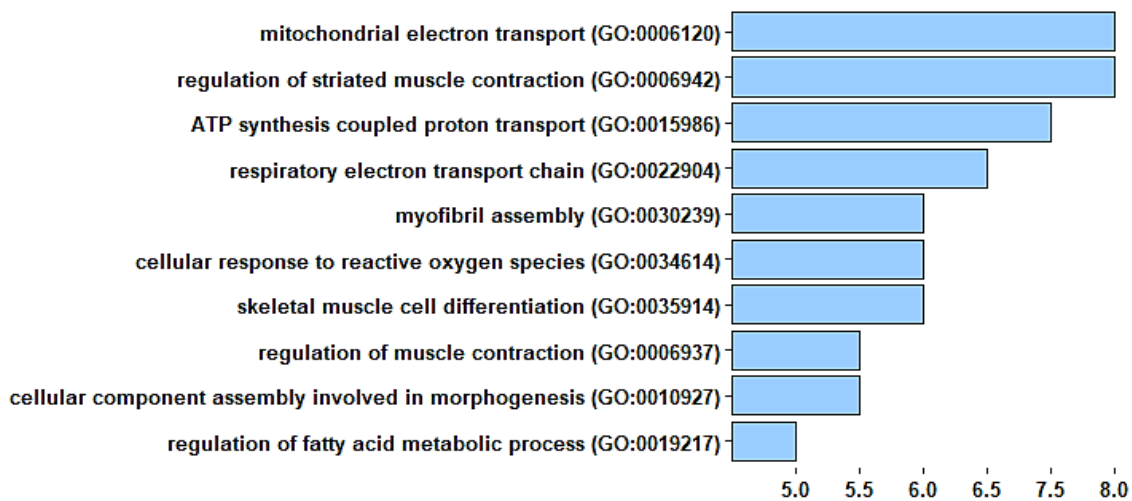


Figura 5. Processos biológicos enriquecidos pelos GDEs com maior expressão no modelo *in vivo*. Teste de Fisher. False Discovery rate (FDR) < 0.05. Valores no eixo x se referem ao parâmetro da plataforma Gene Ontology de Fold Enrichment.

Assim como nas análises referentes ao modelo *in vitro*, os processos biológicos enriquecidos no modelo *in vivo* foram classificados de acordo com o tipo de atividade e resposta celular.

Os processos classificados como de metabolismo energético foram relacionados ao processamento de nucleotídeos como a biossíntese de compostos nitrogenados, metabolismo e fosforilação de nucleotídeos e riboses e processos relacionados à oxidação de ácidos graxos, biossíntese de aminoácidos e glicogênio (Figura 6A).

Em adição ao metabolismo de aminoácidos e ácidos graxos, encontramos um número elevado de processos relacionados ao metabolismo oxidativo como fosforilação oxidativa, síntese de ATP, cadeia transportadora de elétrons e ciclo do ácido tricarboxílico. Em concordância ao metabolismo oxidativo, processos envolvidos com o combate a EROs, como detoxificação celular e resposta ao peróxido de hidrogênio foram enriquecidos nesse modelo experimental (Figura 6B).

Por fim, também foram enriquecidos processos envolvidos com atividade e desenvolvimento muscular como formação de miofibrilas e miotubos e organização de sarcômeros, assim como processos relacionados ao processamento de proteínas como estabilização de proteínas, tradução, alongação e formação de ribossomos (Figura 6C).

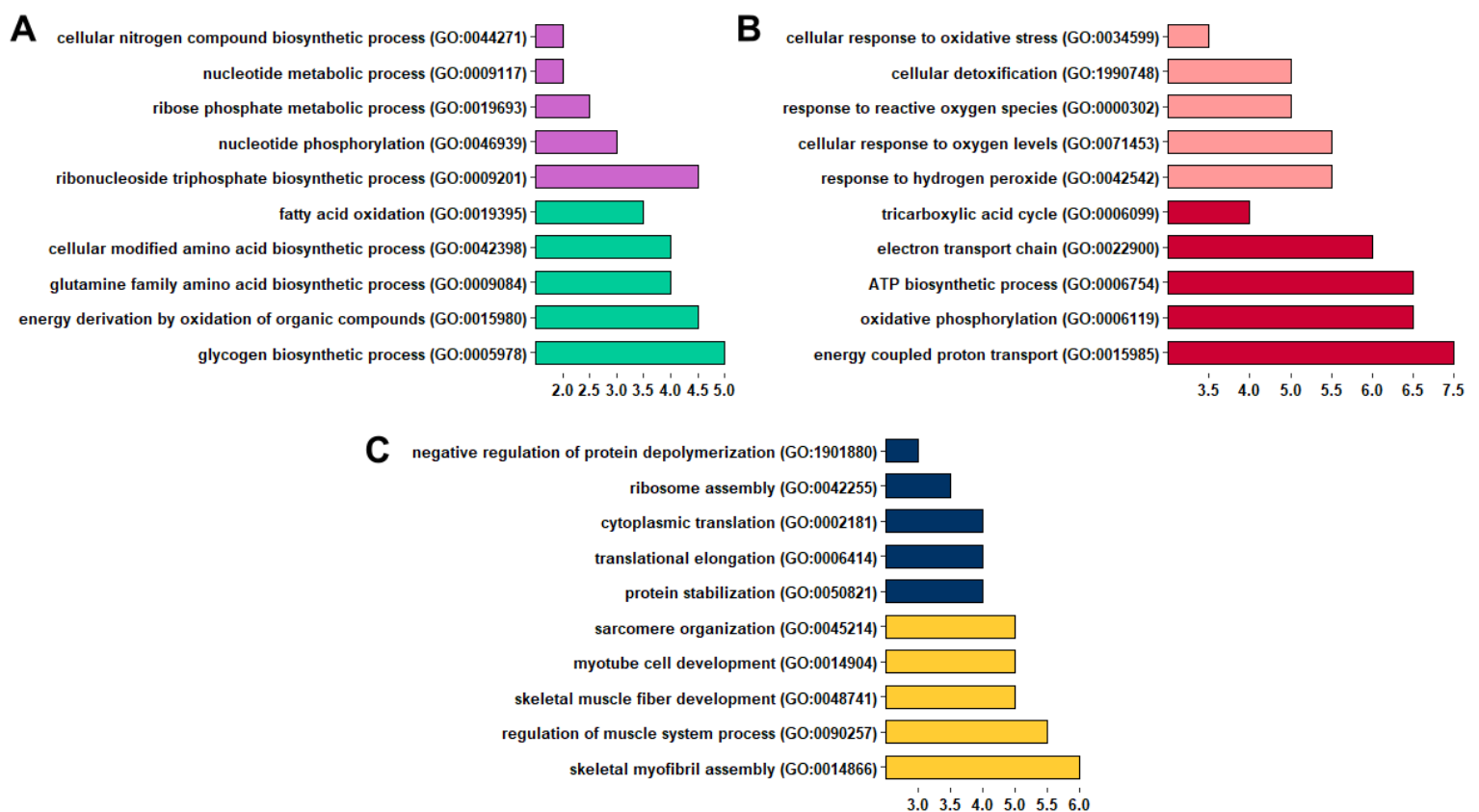


Figura 6. Processos biológicos enriquecidos pelos GDEs *in vivo* categorizados em (A) processamento de nucleotídeos (roxo) e metabolismo energético (verde), (B) resposta ao estresse oxidativo (rosa) e atividade mitocondrial (vermelho) e (C) processamento de proteínas (azul) e desenvolvimento muscular (amarelo). Teste de Fisher. False Discovery rate (FDR) < 0.05. Valores no eixo x se referem ao parâmetro da plataforma Gene Ontology de Fold Enrichment.

3.4. Redes de interação

Redes de interação foram construídas a partir dos GDEs encontrados em cada modelo experimental para a visualização de como genes envolvidos em diferentes processos interagem entre si.

Em relação ao modelo *in vitro*, observamos uma íntima relação entre os genes envolvidos nos processos de proliferação, comunicação célula-célula e transporte mediado por vesículas. Em contrapartida, genes envolvidos com metabolismo glicolítico apresentaram interações com genes envolvidos com glicosilação de proteínas e síntese de componentes da MEC. Genes envolvidos com a formação da MEC e organização da polaridade e estrutura celular foram observados distribuídos ao longo de toda a rede (Figura 7). A rede resultou em interações entre 461 genes com valor de PPI $1.0E-16$.

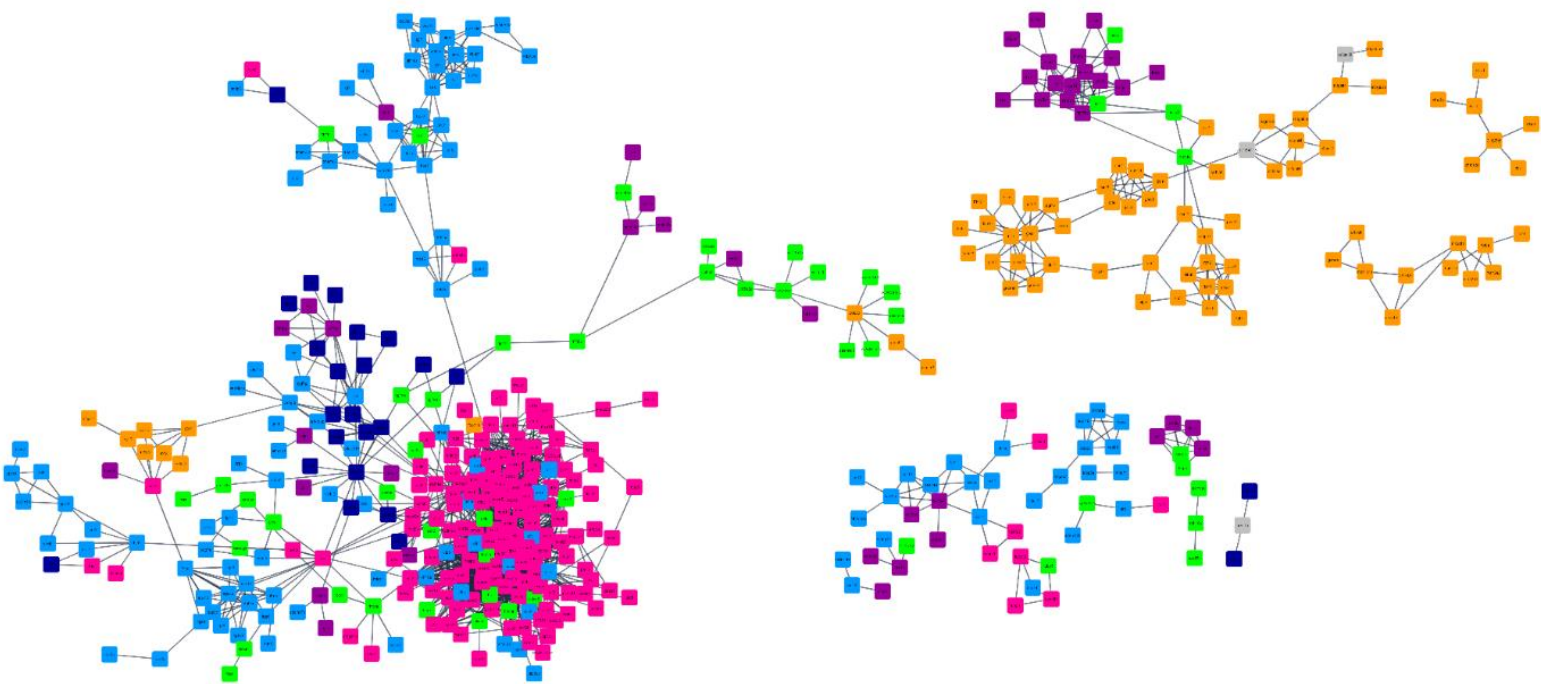


Figura 7. Rede de interação entre os GDEs enriquecidos no modelo *in vitro*. Cores representam o tipo de processo biológico envolvido: proliferação (rosa), crescimento e organização celular (verde), comunicação celular (azul claro), transporte de vesículas (azul escuro), metabolismo glicolítico (alaranjado) e glicosilação de proteínas/MEC (roxo). Pontos em cinza representam genes adicionados à rede para compor as ligações, mas que não foram diferencialmente expressos entre os grupos experimentais. PPI Enrichment: $1.0E-16$, score > 0.9. Rede obtida através da ferramenta STRING 11.5 (Szklarczyk et al, 2019).

Dentre os processos biológicos enriquecidos *in vitro*, vias relacionadas à endocitose e comunicação celular apresentaram valores significativos de Fold Enrichment. Além disso, diversos genes envolvidos com a glicosilação de proteínas e componentes da MEC foram enriquecidos nesse modelo experimental, interagindo tanto de forma isolada quanto integrada aos genes de outros processos biológicos (Figura 7). Nesse sentido, a partir da análise de componente celular, buscamos quais dos GDEs up-regulados nas células musculares *in vitro* são traduzidos em proteínas que possuem localização na MEC e ambiente extracelular, o que resultou na seleção de 28 genes que atenderam esses critérios.

A construção da rede de interações entre esses genes permitiu classificá-los em quatro processos biológicos: síntese e ligação ao colágeno, glicoproteínas e glicólise, inibição da via Bmp (bone morphogenetic protein) e degradação da MEC (Figura 8, Material Suplementar – Tabela S1).

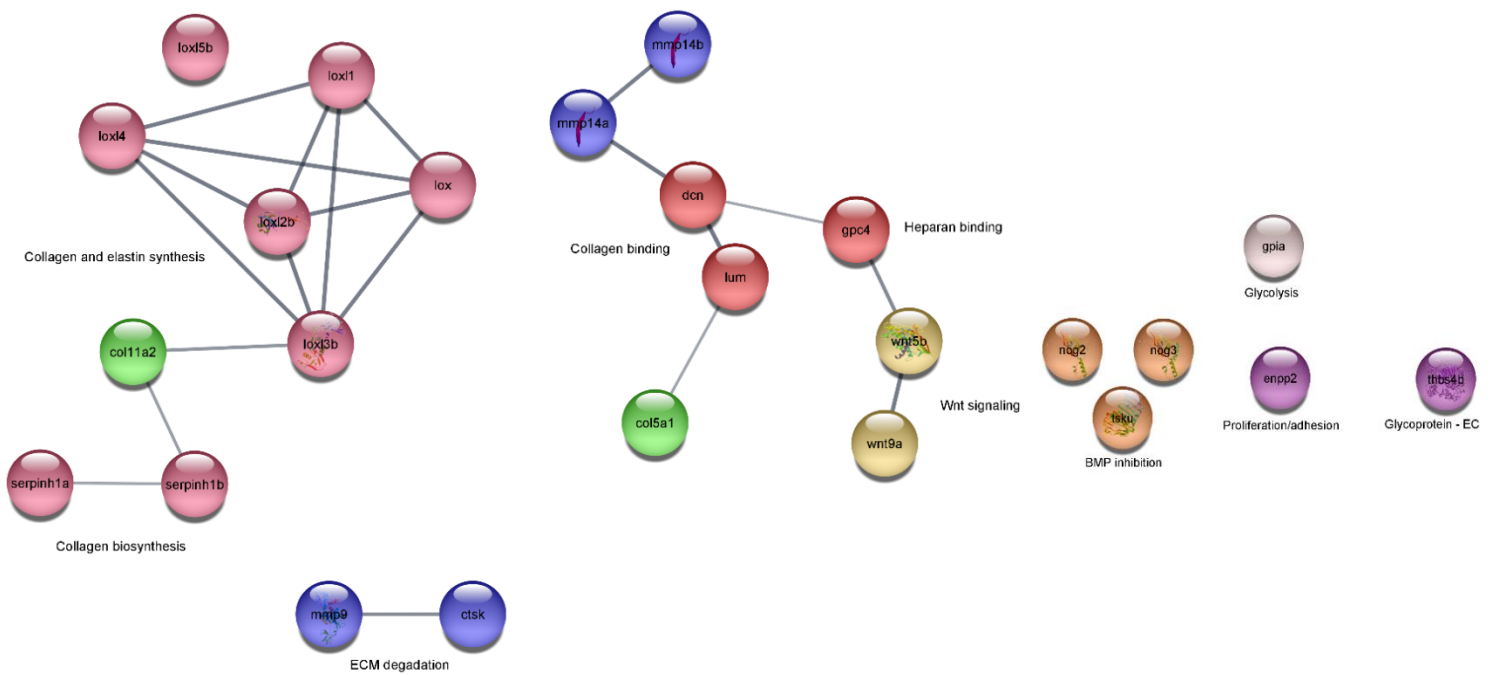


Figura 8. Rede de interação entre os GDEs enriquecidos no modelo *in vitro* com localização na MEC e ambiente extracelular. PPI Enrichment: 1.0E-16, score > 0.6. padrão de cores diferente. Rede obtida através da ferramenta STRING 11.5 (Szklarczyk et al, 2019).

Em relação ao modelo *in vivo*, a interação entre os GDEs resultou em uma rede complexa na qual genes de diferentes processos biológicos interagem entre si. Nessa análise, observamos que grande parte das interações foi entre os GDEs de processos de produção de ATP (metabolismo de aminoácidos, metabolismo mitocondrial, via glicolítica e oxidação de ácidos graxos) e processamento de proteínas. Esses genes apresentaram uma intrínseca relação com genes de desenvolvimento e atividade muscular e a rede resultou em interações entre 350 genes com valor de PPI 1.0E-16 (Figura 9).

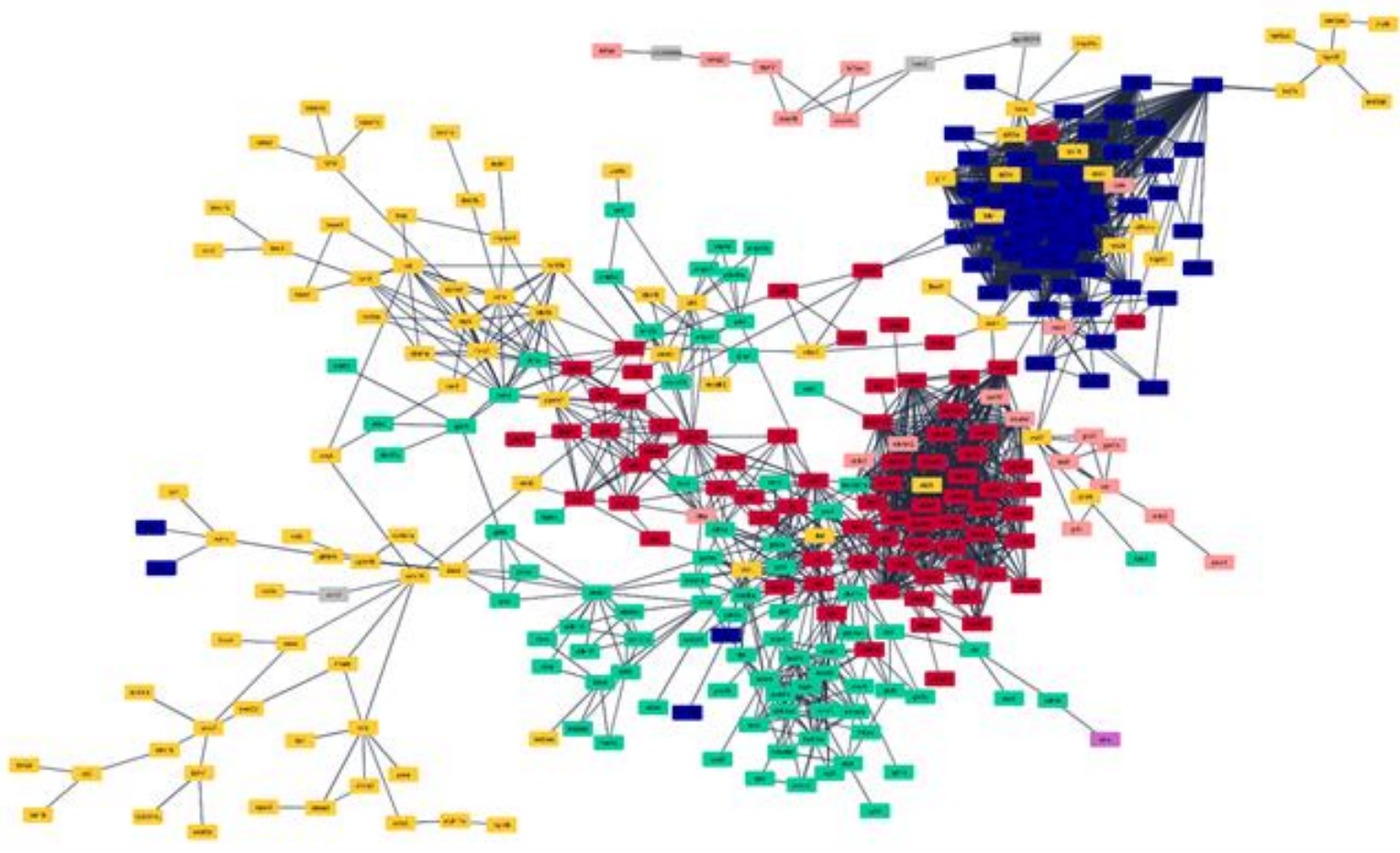


Figura 9. Rede de interação entre os GDEs enriquecidos no modelo *in vivo*. Cores representam o tipo de processo biológico: processamento de nucleotídeos (roxo), metabolismo energético – glicólise e oxidação de ácidos graxos (verde), resposta ao estresse oxidativo (rosa), atividade mitocondrial (vermelho), processamento de proteínas (azul) e desenvolvimento muscular (amarelo). PPI Enrichment: $1.0E-16$, score > 0.9. Rede obtida através da ferramenta STRING 11.5 (Szklarczyk et al, 2019).

Para avaliar a dinâmica no microambiente do tecido muscular assim como a possível interação deste tecido com outros órgãos na complexidade do modelo *in vivo*, selecionamos os GDEs com maior expressão no modelo *in vivo* cujas proteínas possuem localização em ambiente e matriz extracelular. Foram encontrados 78 GDEs que atendem este critério. A partir da análise de ontologia, observou-se que estes GDEs participam de processos como sequestro de cálcio, contração muscular, adesão celular e transporte intracelular. Adicionalmente, para identificação de genes que participam da comunicação com outros órgãos e tecidos, combinamos a lista de genes de nosso estudo que foram up-regulados no modelo *in vivo* com os genes caracterizados a partir do secretoma de músculo esquelético descrito no trabalho de Henningsen et al, 2020. A partir da combinação dessas duas listas de genes foram encontrados 53 genes up-regulados *in vivo*, adicionais, relacionados a processos de quimiotaxia, regulação

do sistema nervoso e desenvolvimento e diferenciação celular (Figura 10, Material Suplementar - Tabela S1).

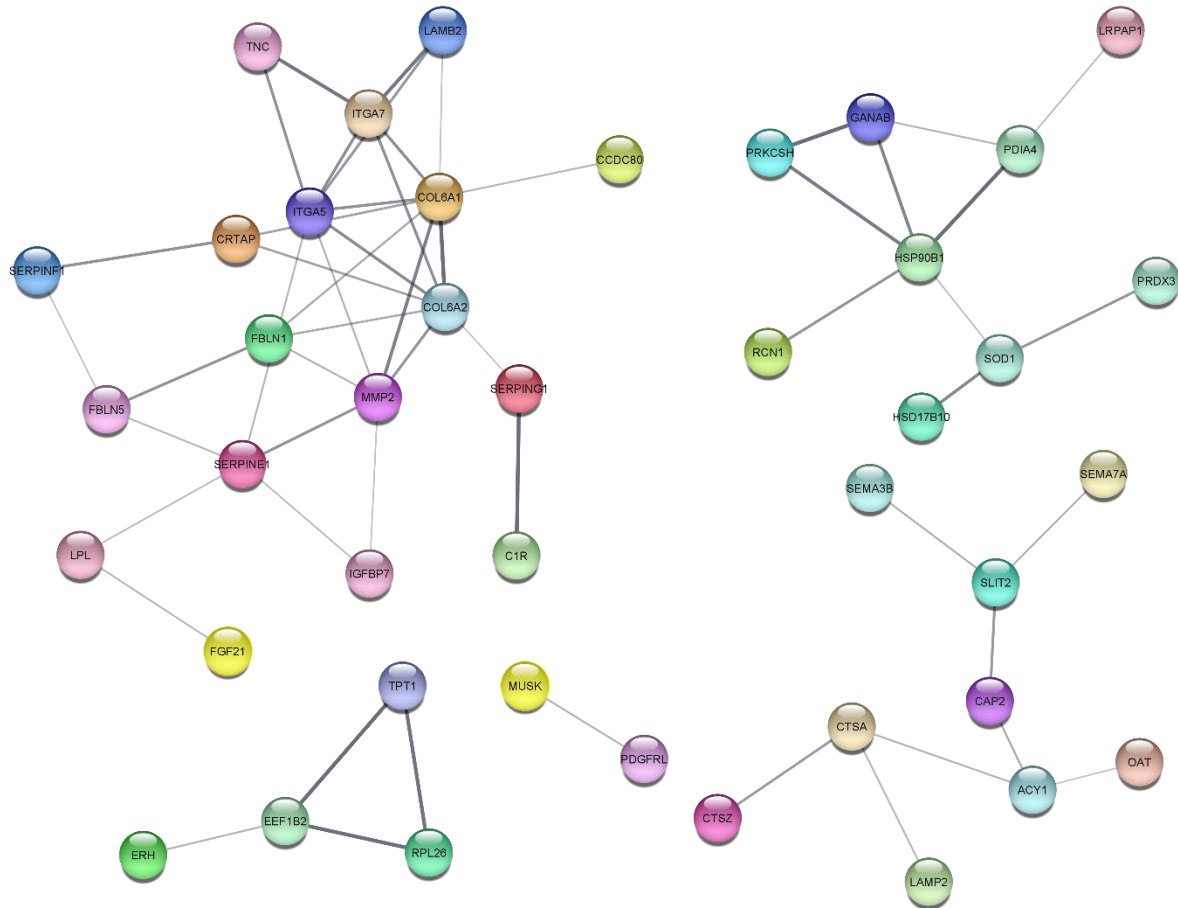


Figura 10. Rede de interação entre os GDEs enriquecidos no modelo *in vivo* com localização na MEC e ambiente extracelular. Genes em amarelo foram validados por RTq-PCR. PPI Enrichment: 1.0E-16, score > 0.6. Rede obtida através da ferramenta STRING 11.5 (Szklarczyk et al, 2019).

3.5. Seleção e validação dos GDEs

Considerando os parâmetros descritos anteriormente, selecionamos para validação genes enriquecidos no modelo *in vitro* relacionados a MEC, como *fn1a* (*fibronectin 1a*), proliferação e diferenciação celular, como *ctnnb1* (*catenin (cadherin-associated protein), beta 1*), metabolismo glicolítico, como *hk1* (*hexokinase 1*) e a citocina *tgfb2* (*transforming growth factor; beta 2*) (Tabela 3). Embora o gene *tgfb2* não tenha sido definido como gene central, selecionamos esse alvo para validação considerando a função que exerce no desenvolvimento celular.

Os genes selecionados a partir do enriquecimento no modelo *in vivo* estão associados prioritariamente aos processos de geração de energia como a *ckma* (*creatina kinase, muscle a*), *acat1* (*acetyl-CoA acetyltransferase 1*), envolvida no metabolismo de ácidos graxos, *mdh2* (*malate dehydrogenase 2, NAD*), envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico e *pkmb* (*pyruvate kinase M1/2b*), que participa da última etapa da via glicolítica (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros avaliados para seleção de genes para validação nos modelos *in vitro* e *in vivo*.

Gene (sigla)	Log2 - Fold Change	Counts (<i>in vitro</i>)	Counts (<i>in vivo</i>)	Interações (n°)
<i>fn1a</i>	6,61	1000	300	10
<i>ctnnb1</i>	2,37	4000	300	17
<i>hk1</i>	2,86	3000	150	13
<i>tgfb2</i>	2,21	2500	100	---
<i>ckma</i>	-11,55	200	11000	14
<i>acat1</i>	-4,00	800	2500	16
<i>mdh2</i>	-3,60	7000	17000	22
<i>pkmb</i>	-13,02	200	30000	21

Além disso, também validamos os genes seguintes up-regulados no modelo *in vivo* cuja proteína possui localização extracelular: *musk* (*muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase*), essencial para a formação das junções neuromusculares, *chrna1* (*cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1, muscle*), relacionado as interações na região de sinapse e *clu* (*clusterin*), que possivelmente pode atuar no microambiente do tecido muscular, considerando que possui ação contra apoptose já descrita em cardiomiócitos (Pereira et al, 2018) (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros avaliados para seleção de genes cuja proteína corresponde a ambiente extracelular no modelo *in vivo*.

Gene (sigla)	Log2 - Fold Change	Counts (<i>in vitro</i>)	Counts (<i>in vivo</i>)	Interações (n°)
<i>musk</i>	-4,60	66	308	01
<i>chrna1</i>	-6,24	10	270	--
<i>clu</i>	-3,4	28	62	--

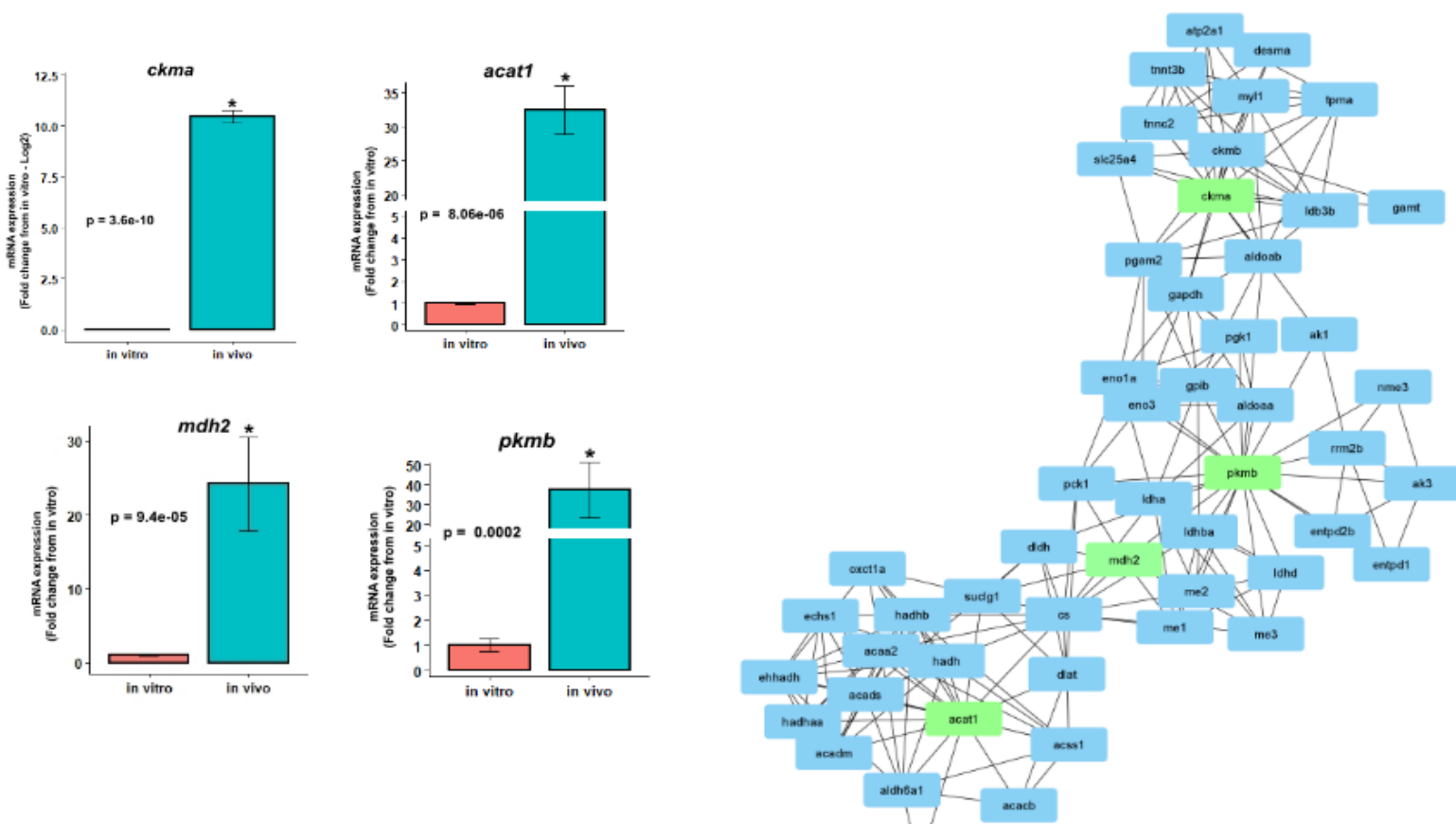


Figura 12. Expressão de GDEs up-regulados *in vivo*, relacionados a geração de energia (*ckma*), metabolismo de ácidos graxos (*acat1*), metabolismo oxidativo (*mdh2*) e metabolismo glicolítico (*pkmb*). Dados representados em média \pm DP. Test t. Rede de interação entre os genes validados (em verde) e os GDEs up-regulados no modelo *in vivo*. PPI Enrichment: 1.0E-16, score > 0.9. Rede obtida através da ferramenta STRING 11.5 (Szkklarczyk et al, 2019).

Em relação aos genes selecionados a partir de sua localização no ambiente extracelular ou MEC, encontramos maior expressão dos genes *musk*, *chrna1* e *clu* no modelo *in vivo* em relação ao modelo *in vitro* (Fig. 13). Não foi possível avaliar a expressão do gene *chrna1* no modelo *in vitro* devido a sua baixa expressão em todas as amostras do grupo experimental, o que impossibilitou a análise estatística desse gene. O gene *fgf21* não apresentou diferença estatísticas entre os grupos experimentais, sendo excluído das análises subsequentes.

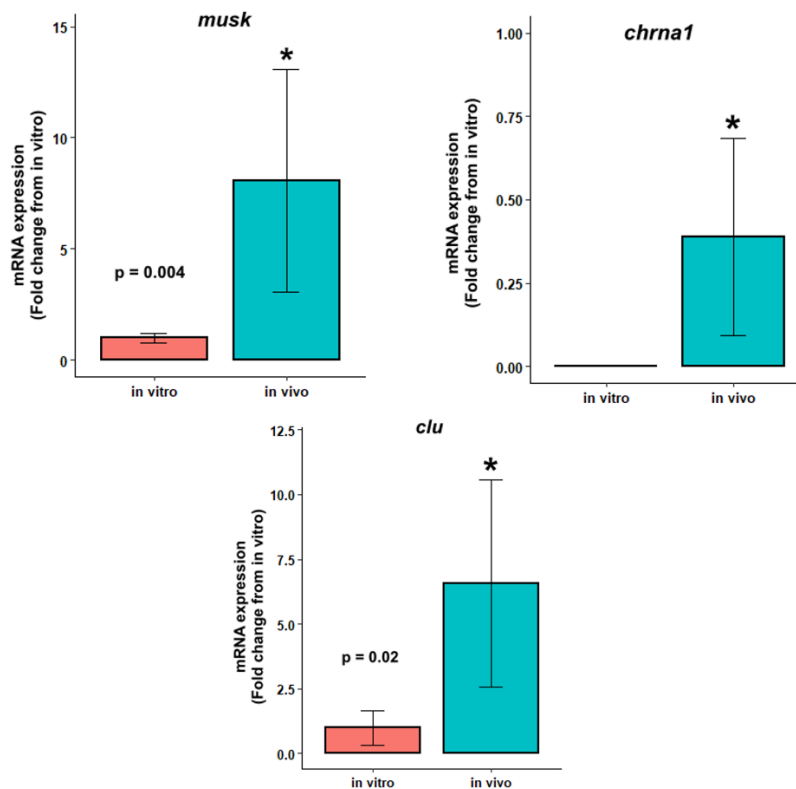


Figura 13. Expressão de GDEs up-regulados *in vivo*, relacionados a localização extracelular e MEC, *musk*, *chrna1* e *clu*. Dados representados em média \pm DP. Test t.

4. Discussão

Através da caracterização do perfil transcricional de células musculares *in vitro* e do tecido muscular *in vivo* em pacus juvenis, observamos enriquecimento de processos relacionados a proliferação, comunicação celular, estabelecimento de matriz extracelular e metabolismo glicolítico, no modelo *in vitro*, enquanto no modelo *in vivo*, os processos enriquecidos foram relacionados com o desenvolvimento, contração muscular, metabolismo energético e processamento de aminoácidos.

O enriquecimento de vias glicolíticas observado no nosso modelo *in vitro* indica a prevalência desse processo para obtenção de energia em detrimento de outros processos como o metabolismo oxidativo, o que pode contribuir para a proliferação e formação de novas células musculares tanto através do suporte energético, quanto pela fusão dos mioblastos em miotubos (Tixier et al, 2013). Em células C2C12, genes envolvidos no metabolismo glicolítico foram essenciais para a fusão de mioblastos, etapa fundamental para a progressão da miogênese (Tixier et al, 2013). Esses dados reforçam os achados do presente estudo, em que as células em cultura apresentaram maior expressão de fatores relacionados à proliferação, fusão e

diferenciação, como observado pelo enriquecimento destes processos *in silico* e pela maior expressão, no modelo *in vitro*, dos genes *ctnbl1* e *tgfb2*.

O controle do nível de expressão de b-catenina (*ctnbl1*) foi descrito em células musculares e no músculo esquelético de camundongos, sendo que o *knockout* desse gene resultou em prejuízos na regeneração de músculos lesionados, enquanto a superexpressão levou a saída precoce do ciclo celular e a exaustão do pool de células satélites (Rudolf et al, 2016). Ainda, o tratamento com TGF β 2 recuperou o número de células musculares diferenciadas em quantidade semelhante aos animais controles em camundongos com baixa expressão de b-catenina, indicando a atuação conjunta desses genes no controle dos processos de proliferação e diferenciação de células musculares (Rudolf et al, 2016).

Na literatura, é bem documentado que células tumorais reprogramam seu metabolismo priorizando processos glicolíticos de geração de energia. Essa mudança auxilia no aumento de massa e na obtenção de substrato para a síntese de ácidos nucleicos, aminoácidos e macromoléculas. Esse processo foi caracterizado em 1924 e recebe o nome de efeito Warburg (revisado em Wackerhage et al, 2022). Recentemente, a reprogramação do metabolismo energético de células musculares em crescimento vem sendo discutida em mamíferos, apresentando um cenário semelhante ao efeito Warburg (Wackerhage et al, 2022).

Nesse sentido, além do estímulo à miogênese e hipertrofia das células no modelo *in vitro*, a priorização do metabolismo glicolítico pode ser vantajosa para a sobrevivência das células considerando que essas se encontram em um ambiente pouco favorável para combater as EROs, moléculas geradas prioritariamente pela atividade mitocondrial e danosas quando em altas concentrações (Turrens, 1997). Em comparação, no nosso estudo, diversos processos de metabolismo oxidativo e combate às EROs foram enriquecidos pelos genes up-regulados *in vivo*, modelo experimental que além de dispor de um sistema antioxidante localmente, conta com a interação de outros órgãos, como o fígado, que produzem enzimas antioxidantes e podem auxiliar no combate às EROs e evitar o dano que elas possam causar (revisado por Supruniuk et al, 2023).

Dentre os processos biológicos, encontramos também o enriquecimento de vias relacionadas à síntese de componentes da MEC no modelo *in vitro*. A manutenção da MEC tem sido relacionada com uma maior taxa de fusão de mioblastos tanto atuando como um suporte para que as células se fundam quanto pelo sequestro de fatores que inibem a miogênese e crescimento muscular, como a miostatina (Brandan et al, 2008; Liu et al, 2021). Dentre os genes que codificam proteínas constituintes da MEC, selecionamos para validação a fibronectina (*fn1a*), cuja expressão foi up-regulada nas células em cultura, modelo *in vitro*, tanto *in silico*

quanto na validação experimental. Esse gene possui atividade já descrita na migração, organização e fusão de mioblastos (Bentzinger et al, 2013; Liu et al, 2021; Roman et al, 2018). De fato, células C2C12 cultivadas na presença de fibronectina apresentaram maiores taxas de migração, fusão e alongamento do que células cultivadas em outros meios, como gelatina (Vaz et al, 2012). Nesse sentido, consideramos que além de processos chaves como a proliferação e síntese de energia, a estruturação do microambiente extracelular é essencial para a manutenção e progressão das células musculares em isolamento, como observado também pela maior expressão de genes cujas proteínas possuem localização extracelular e podem atuar na comunicação célula-célula como colágeno, metaloproteinases, lumican e decorina que atuam na estruturação e remodelação da MEC (Zang et al, 2021).

De forma geral, os resultados encontrados no modelo *in vitro* podem indicar estratégias para a reestruturação e reorganização das células musculares de acordo com as características originais do tecido *in vivo* do qual foram extraídas. Devido à plasticidade do músculo esquelético, esse tecido pode se recuperar frente a situações que levam a ruptura de seu estado normal, restaurando as suas funções. Exemplo disso é a regeneração muscular frente a lesões, situação que é controlada principalmente pelas células satélites (revisado por Musaró, 2014).

Otero-Tarrazón, et al, 2023, observaram a regeneração do tecido muscular de trutas arco-íris 16 dias após lesão. Durante esse período experimental foi observado um aumento na expressão dos genes *pax7* e *wnt5*, momento que coincidiu com a diminuição de colágeno, aumento do número de células e formação de novas fibras musculares na região lesionada (Otero-Tarrazón, et al, 2023). Em mamíferos, há evidências que apoiam uma sequência de eventos para o reparo do tecido muscular, onde a proliferação de células e formação de miotubos é acompanhada também pelo fechamento da ferida e reparo da MEC (McNally e Demonbreun, 2021). Em nosso estudo, observamos maior expressão dos fatores da família paired-box e Wnt no modelo *in vitro* (análises *in silico*), assim como uma maior expressão de componentes de estabelecimento da MEC (*fn1a*), reforçando a hipótese de um direcionamento para a reconstrução do tecido muscular a partir das células musculares isoladas.

Ainda, reforçando nossa hipótese, é possível que essas células possam manter as características inerentes de estruturação do tecido muscular a partir de sua memória. Durante a hipertrofia muscular além da produção e acúmulo de proteínas nas fibras musculares, novos mionúcleos são acrescentados às fibras em crescimento. Após períodos de inatividade, indivíduos que passaram por estímulos hipertróficos, como exercício, voltam ao estado anabólico com mais rapidez, o que é possível que ocorra tanto através da memória celular (núcleos que foram acrescentados e mantidos durante a inatividade) quanto da memória epigenética

(hipo/hipermetilações no DNA das células musculares durante o exercício inicial) que permitem uma resposta molecular mais rápida frente a presença do estímulo anabólico (Gundersen, 2016; Sharples e Turner, 2023). De fato, células musculares quando isoladas *in vitro* são capazes de manter as características que apresentavam no tecido muscular *in vivo*, situação observada em células isoladas de pacientes com câncer e diabetes, após o exercício físico e durante o envelhecimento (Gundersen, 2016; Sharples e Turner, 2023). Sendo assim, é possível que a capacidade que as células musculares utilizadas no presente estudo apresentam de continuar seu ciclo celular e estruturação de microambiente de forma independente, sem a necessidade de demais estímulos externos, venha de alterações que ocorreram durante o desenvolvimento e crescimento do tecido muscular no ambiente sistêmico *in vivo* e que são mantidas mesmo após o isolamento das células.

Em relação ao modelo *in vivo*, as vias enriquecidas mais discrepantes do modelo *in vitro* foram relacionadas aos mecanismos de obtenção de energia. Encontramos genes envolvidos em diferentes vias de processamento de substratos, como a desfosforilação da creatina. A produção de energia via creatina é o primeiro mecanismo energético acionado, atuando também como uma reserva de energia no tecido muscular (Borchel et al, 2019). No presente estudo o gene que codifica a creatina quinase muscular (*ckma*) foi superexpresso no modelo *in vivo*. Interessantemente, Borchel et al, 2019, em uma análise comparativa, observaram que enzimas responsáveis tanto por produzir quanto metabolizar a creatina são sintetizadas localmente no tecido muscular de peixes, não existindo uma separação espacial entre esses processos como ocorre em mamíferos, indicando que esse mecanismo é essencial na obtenção e reserva de energia nestes animais.

Além da metabolização de creatina, também observamos maior expressão de genes envolvidos com a geração de energia demonstrando a variedade de mecanismos ativos para a produção energética no modelo *in vivo* em comparação ao modelo *in vitro*. Nesse sentido, a ativação desses processos pode favorecer atividades que demandam uma alta quantidade de energia e que foram enriquecidas no modelo *in vivo* como contração e desenvolvimento muscular (Barclay, 2017).

Com o objetivo de compreender se aspectos envolvidos na comunicação entre o tecido muscular esquelético e demais órgãos e tecidos podem ser perdidos a partir do isolamento das células musculares em cultura, também avaliamos genes cujas proteínas possuem localização extracelular ou na MEC. Nossos resultados demonstram uma maior expressão dos genes selecionados no tecido *in vivo*, o que indica que a expressão de genes envolvidos na comunicação tecidual necessita do estímulo fornecido por outros órgãos para sua ativação.

Exemplo disso foi a maior expressão dos genes relacionados à comunicação com o sistema nervoso, *musk* e *chrnal*. O gene *musk* é descrito como um importante mediador na formação das junções neuromusculares (Li et al, 2018), enquanto o gene *chrnal* é responsável por codificar a expressão de receptores de acetilcolina, controlando a entrada dessas moléculas nas células musculares (Sepich e Westerfield, 1994). A baixa expressão de *musk* e *chrnal* no modelo *in vitro* pode indicar a necessidade de interação com componentes do sistema nervoso para a expressão desses genes e desenvolvimento das junções neuromusculares, processo que pode ter sido suprimido nas células musculares ao serem isoladas.

Nesse mesmo sentido, a ausência da comunicação com outros tecidos que não interagem diretamente com o tecido muscular pode ter inibido a expressão de genes que podem atuar tanto de forma autócrina quanto endócrina, como a *clusterina (clu)*. A *clusterina* tem papel descrito na melhora de doenças inflamatórias como as doenças musculares degenerativas e mais recentemente teve seu papel descrito como protetora de cardiomiócitos frente a apoptose (Jun et al, 2011; Zhang et al, 2022). A baixa expressão desse gene no modelo *in vitro* reforça a hipótese de que o processo de isolamento das células musculares em pacus afeta não só a expressão de genes influenciados por tecidos diretamente relacionados ao tecido muscular, como também a expressão de genes secretados pelo músculo que afetam o organismo de forma sistêmica.

Embora tenha sido encontrado um número elevado de genes diferencialmente expressos entre os dois modelos experimentais, as vias enriquecidas por esses genes apresentam semelhanças. Um exemplo disso são genes e processos envolvidos na via glicolítica. No modelo *in vitro*, observamos a maior expressão do gene que codifica a enzima hexoquinase (*hkl*) e que atua no início da via glicolítica (revisado por Menard et al, 2014), enquanto no modelo *in vivo* encontramos maior expressão do gene que codifica a enzima piruvato quinase muscular (*pkmb*), que atua nas etapas finais da degradação da glicose (revisado por Menard et al, 2014). Dessa forma, embora exista uma especificidade na expressão temporal das vias de sinalização em cada modelo experimental, a atuação dos genes encontrados resulta em uma atividade comum.

De forma geral, observamos no presente estudo que as principais diferenças entre os modelos experimentais foram relacionadas aos processos de estabelecimento da estrutura do tecido muscular (formação de MEC e proliferação e diferenciação de células), mecanismos para obtenção de energia, sendo que no modelo *in vivo* as estratégias para este fim são mais diversas, e atividade das células musculares, considerando que no modelo *in vitro* a comunicação célula-célula parece ser mais intensa enquanto a atividade de contração ainda não é significativa. Os dados observados no presente estudo permitem delinear estratégias que possam garantir o

sucesso do modelo *in vitro* e aproximá-lo do modelo *in vivo*, como uma preparação do ambiente extracelular com diferentes componentes da MEC, co-cultura com outras células que compõem o tecido muscular, assim como aumentar a diversidade dos substratos energéticos fornecidos para essas células. Além disso, nossos dados elucidam e caracterizam o perfil molecular do músculo esquelético de peixes tanto especificamente da célula muscular como do tecido muscular como um todo, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novos artifícios para maximizar a produção na aquicultura de forma sustentável como a produção de carne em laboratório.

5. Arquivos suplementares

Tabela S1. Planilha 1 – Lista de genes diferencialmente expressos em células musculares *in vitro* e no tecido muscular *in vivo* de pacu. Os modelos apresentaram respectivamente, 5785 e 3515 genes diferencialmente expressos. Planilha 2 – Separação dos genes de acordo com os processos biológicos *in vitro*. Planilha 3 – Separação dos genes de acordo com os processos biológicos *in vivo*. Planilha 4 – GDEs *in vitro* cuja proteína possui localização na MEC e ambiente extracelular. Planilha 5 – GDEs *in vivo* cuja proteína possui localização na MEC e ambiente extracelular.

6. Referências

- Adams JC. A new initiative for AJP-Cell Physiology: "Making Cell Culture More Physiological". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019 Jun 1;316(6):C828-C829. doi: 10.1152/ajpcell.00157.2019.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., von Maltzahn, J., Soleimani, V.D., Yin, H., Rudnicki, M.A., 2013. Fibronectin regulates Wnt7a signaling and satellite cell expansion. *Cell Stem Cell* 12, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.015>
- Barclay, C.J., 2017. Energy demand and supply in human skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 38, 143–155. <https://doi.org/10.1007/s10974-017-9467-7>

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Bone, Q., 1978. Locomotor muscle, in: *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 361–424. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60168-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60168-5)

Borchel, A., Verleih, M., Kühn, C., Rebl, A., Goldammer, T., 2019. Evolutionary expression differences of creatine synthesis-related genes: Implications for skeletal muscle metabolism in fish. *Scientific Reports* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41907-6>

Brandan, E., Cabello-Verrugio, C., Vial, C., 2008. Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy. *Matrix Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.07.004>

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Carbon, S., Douglass, E., Good, B.M., Unni, D.R., Harris, N.L., Mungall, C.J., Basu, S., Chisholm, R.L., Dodson, R.J., Hartline, E., Fey, P., Thomas, P.D., Albou, L.-P., Ebert, D., Kesling, M.J., Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Mushayahama, T., LaBonte, S.A., Siegele, D.A., Antonazzo, G., Attrill, H., Brown, N.H., Garapati, P., Marygold, S.J., Trovisco, V., dos Santos, G., Falls, K., Tabone, C., Zhou, P., Goodman, J.L., Strelets, V.B., Thurmond, J., Garmiri, P., Ishtiaq, R., Rodríguez-López, M., Acencio, M.L., Kuiper, M., Lægreid, A., Logie, C., Lovering, R.C., Kramarz, B., Saverimuttu, S.C.C., Pinheiro, S.M., Gunn, H., Su, R., Thurlow, K.E., Chibucos, M., Giglio, M., Nadendla, S., Munro, J., Jackson, R., Duesbury, M.J., Del-Toro, N., Meldal, B.H.M., Paneerselvam, K., Perfetto, L., Porras, P., Orchard, S., Shrivastava, A., Chang, H.-Y., Finn, R.D., Mitchell, A.L., Rawlings, N.D., Richardson, L., Sangrador-Vegas, A., Blake, J.A., Christie, K.R., Dolan, M.E., Drabkin, H.J., Hill, D.P., Ni, L., Sitnikov, D.M., Harris, M.A., Oliver, S.G., Rutherford, K., Wood, V., Hayles, J., Bähler, J., Bolton, E.R., De Pons, J.L., Dwinell, M.R., Hayman, G.T., Kaldunski, M.L., Kwitek, A.E., Laulederkind, S.J.F., Plasterer, C., Tutaj, M.A., VEDI, M., Wang, S.-J., D’Eustachio, P., Matthews, L., Balhoff, J.P., Aleksander, S.A., Alexander, M.J., Cherry, J.M., Engel, S.R., Gondwe, F., Karra, K., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Simison, M., Skrzypek, M.S., Weng, S., Wong, E.D., Feuermann, M., Gaudet, P., Morgat, A., Bakker, E., Berardini, T.Z., Reiser, L., Subramaniam, S., Huala, E., Arighi, C.N., Auchincloss, A., Axelsen, K., Argoud-Puy, G., Bateman, A., Blatter, M.-C., Boutet, E., Bowler, E., Breuza, L., Bridge, A., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Casas, C.C., Coudert, E., Denny, P., Estreicher, A., Famiglietti, M.L., Georghiou, G., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hatton-Ellis,

E., Hulo, C., Ignatchenko, A., Jungo, F., Laiho, K., Le Mercier, P., Lieberherr, D., Lock, A., Lussi, Y., MacDougall, A., Magrane, M., Martin, M.J., Masson, P., Natale, D.A., Hyka-Nouspikel, N., Orchard, S., Pedruzzi, I., Pourcel, L., Poux, S., Pundir, S., Rivoire, C., Speretta, E., Sundaram, S., Tyagi, N., Warner, K., Zaru, R., Wu, C.H., Diehl, A.D., Chan, J.N., Grove, C., Lee, R.Y.N., Muller, H.-M., Raciti, D., Van Auken, K., Sternberg, P.W., Berriman, M., Paulini, M., Howe, K., Gao, S., Wright, A., Stein, L., Howe, D.G., Toro, S., Westerfield, M., Jaiswal, P., Cooper, L., Elser, J., 2021. The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. *Nucleic Acids Research* 49, D325–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>

Chin, C.H., Chen, S.H., Wu, H.H., Ho, C.W., Ko, M.T., Lin, C.Y., 2014. cytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology* 8. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-S4-S11>

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

Fauconneau, B., Paboeuf, G., 2000. Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and Tissue Research* 301, 459–463. <https://doi.org/10.1007/s004419900168>

Gabillard, J.C., Sabin, N., Paboeuf, G., 2010. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell Tissue Res.*, 342, 471 – 477. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1071-8>.

Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29, 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>

Gundersen, K., 2016. Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *J Exp Biol.*; 219(Pt 2):235-42. <https://doi.org/10.1242/jeb.124495>. PMID: 26792335.

Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8, 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>

- Henningsen, J., Rigbolt, K.T., Blagoev, B., Pedersen, B.K., Kratchmarova, I., 2010. Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. *Mol Cell Proteomics*. 9, 2482-96. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.002113>.
- Howe, K.L., Achuthan, P., Allen, James, Allen, Jamie, Alvarez-Jarreta, J., Ridwan Amode, M., Armean, I.M., Azov, A.G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., Gall, A., Giron, C.G., Grego, T., Guijarro-Clarke, C., Haggerty, L., Hemrom, A., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Juettemann, T., Kaikala, V., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D., Martinez, J.G., Marugán, J.C., Maurel, T., McMahon, A.C., Mohanan, S., Moore, B., Muffato, M., Oheh, D.N., Paraschas, D., Parker, A., Parton, A., Prosovetskaia, I., Sakthivel, M.P., Abdul Salam, A.I., Schmitt, B.M., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Steed, E., Szpak, M., Szuba, M., Taylor, K., Thormann, A., Threadgold, G., Walts, B., Winterbottom, A., Chakiachvili, M., Chaubal, A., de Silva, N., Flint, B., Frankish, A., Hunt, S.E., Iisley, G.R., Langridge, N., Loveland, J.E., Martin, F.J., Mudge, J.M., Morales, J., Perry, E., Ruffier, M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S.J., Cunningham, F., Yates, A.D., Zerbino, D.R., Flicek, P., 2021. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research* 49, D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>
- Jun, H. O., Kim, D. H., Lee, S. W., Lee, H. S., Seo, J. H., Kim, J. H., Kim, J.H., Yu, Y.S., Min, B.H., Kim, K.W., 2011. Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 signaling pathway. *Experimental & molecular medicine*, 43(1), 53-61. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.1.006>
- IBGE, 2022. Produção da Aquicultura. Pesquisa da Pecuária Municipal. URL <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940#resultado> (acesso em 07.07.2023).
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.*; 8:e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Li, L., Xiong, W.C., Mei, L., 2018. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu Rev Physiol.* ;80:159-188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>.
- Liu, Y., Xu, C., Asiamah, C.A., Ye, R., Pan, Y., Lu, L. li, Zhao, Z., Jiang, P., Su, Y., 2021. Decorin regulates myostatin and enhances proliferation and differentiation of embryonic myoblasts in Leizhou black duck. *Gene* 804. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145884>

- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- McNally, E.M., Demonbreun, A.R., 2021. Resealing and rebuilding injured muscle. *Science*; 374(6565):262-263. <https://doi.org/10.1126/science.abm2240>
- McMullen, P.D., Pendse, S.N., Black, M.B., Mansouri, K., Haider, S., Andersen, M.E., Clewell, R.A., 2019. Addressing systematic inconsistencies between in vitro and in vivo transcriptomic mode of action signatures. *Toxicology in Vitro* 58, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.014>
- Menard, L., Maughan, D., Vigoreaux, J., 2014. The Structural and Functional Coordination of Glycolytic Enzymes in Muscle: Evidence of a Metabolon? *Biology*, 3, 623-644. <https://doi.org/10.3390/biology3030623>
- Otava, M., Shkedy, Z., Talloen, W., Verheyen, G.R., Kasim, A., 2015. Identification of in vitro and in vivo disconnects using transcriptomic data. *BMC Genomics* 16, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1726-7>
- Musaró, A., 2014. The Basis of Muscle Regeneration. *Advances in Biology*. <https://doi.org/10.1155/2014/612471>
- Otero-Tarrazón, A., Perelló-Amorós, M., Jorge-Pedraza, V., Moshayedi, F., Sánchez-Moy, A., García-Pérez, I., Fernandez-Borras, J., Garcia de la Serrana, D., Navarro, I., Blasco, J., Capilla, E., Gutierrez, J., 2023. Muscle regeneration in gilthead sea bream: Implications of endocrine and local regulatory factors and the crosstalk with bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*;14:1101356. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1101356>.
- Pereira, R.M., Mekary, R.A., da Cruz Rodrigues, K.C., Anaruma, C.P., Ropelle, E.R., da Silva, A.S.R., Cintra, D.E., Pauli, J.R., de Moura, L.P., 2018. Protective molecular mechanisms of clusterin against apoptosis in cardiomyocytes. *Heart Fail Rev.* 23, 123–129. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9654-z>
- Roman, W., Martins, J.P., Gomes, E.R., 2018. Local Arrangement of Fibronectin by Myofibroblasts Governs Peripheral Nuclear Positioning in Muscle Cells. *Developmental Cell* 46, 102-111.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.031>
- Rudolf, A., Schirwis, E., Giordani, L., Parisi, A., Lepper, C., Taketo, M.M., Le Grand, F., 2016. β -Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep.* 15(6):1277-90. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.022>.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity., in: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. Academic Press, San Diego, pp. 187–250.

Sepich, D.S., Ho, R.K., Westerfield, M., 1994. Autonomous expression of the nicotinic acetylcholine receptor mutation in zebrafish muscle cells. *Dev Biol*;161(1):84-90. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1010>.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>

Sharples, A.P., Turner, D.C., 2023. Skeletal muscle memory. *Am J Physiol Cell Physiol*; 324(6):C1274-C1294. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00099.2023>

Supruniuk, E.; Górski, J.; Chabowski, A., 2023. Endogenous and Exogenous Antioxidants in Skeletal Muscle Fatigue Development during Exercise. *Antioxidants*, 12, 501. <https://doi.org/10.3390/antiox12020501>

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C. von, 2019. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 47, D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

Tixier, V., Bataille, L., Etard, C., Jagla, T., Weger, M., DaPonte, J.P., Strahle, U., Dickmeis, T., Jagla, K., 2013. Glycolysis supports embryonic muscle growth by promoting myoblast fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18982–18987. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301262110>

Tuomisto, H.L., Teixeira De Mattos, M.J., 2011. Environmental impacts of cultured meat production. *Environmental Science and Technology* 45, 6117–6123. <https://doi.org/10.1021/es200130u>

Turrens, J.F., 1997. Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Bioscience Reports* 17, 3–8.

Urbinati, E.C., Gonçalves, F.D., 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in: Baldisseroto, B., Gomes, L.C. (Eds.), *Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil*. UFSM - Santa Maria, pp. 225–255.

Vaz, R., Martins, G.G., Thorsteinsdóttir, S., Rodrigues, G., 2012. Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an in vitro myoblast cell model. *Cell and Tissue Research*, 348, 569 – 578. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1364-1>.

Vélez, E.J., Lutfi, E., Azizi, S., Montserrat, N., Riera-Codina, M., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J., 2015. Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle

- physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology* 199, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.12.003>
- Volkoff, H., Esatevan Sabioni, R., Coutinho, L.L., Cyrino, J.E.P., 2017. Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Tissue distribution and effects of food quantity and quality on gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 203, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.022>
- Wackerhage, H., Vechetti, I.J., Baumert, P., Gehlert, S., Becker, L., Jaspers, R.T., de Angelis, M.H., 2022. Does a Hypertrophying Muscle Fibre Reprogramme its Metabolism Similar to a Cancer Cell? *Sports Med.* 52, 2569–2578 <https://doi.org/10.1007/s40279-022-01676-1>
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York. Disponível em: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Zhang, K., Liu, K., Yu, D., Tang, Y., Geng, B., Xia, Y., Xu, P., 2022. The therapeutic and prognostic role of clusterin in diverse musculoskeletal diseases: a mini review. *Physiol Res.*; 71(6):739-747. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934908>
- Zhang, W., Liu, Y., Zhang, H., 2021. Extracellular matrix: an important regulator of cell functions and skeletal muscle development. *Cell Biosci.* 11, 65. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00579-4>
- Zar, J. H., 2009. *Biostatistical analysis*. 5. ed. New Jersey: Prentice – Hall.

CAPÍTULO II

Amino Acids and IGF1 regulation of fish muscle growth revealed by transcriptome and microRNAome integrative analyses of pacu (Piaractus mesopotamicus) myotubes



Article

Amino Acids and IGF1 Regulation of Fish Muscle Growth Revealed by Transcriptome and microRNAome Integrative Analyses of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Myotubes

Bruno Oliveira Silva Duran ^{1,†}, Bruna Tereza Thomazini Zanella ^{2,†}, Erika Stefani Perez ²,
Edson Assunção Mareco ³, Josefina Blasco ⁴, Maeli Dal-Pai-Silva ² and Daniel Garcia de la serrana ^{4,*}

¹ Department of Histology, Embryology and Cell Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás (UFG), Goiânia 74690-900, GO, Brazil; brunoduran@ufg.br

² Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-689, SP, Brazil; bruna.zanella@unesp.br (B.T.T.Z.); erika.perez@unesp.br (E.S.P.); maeli.dal-pai@unesp.br (M.D.-P.-S.)

³ Environment and Regional Development Graduate Program, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente 19050-680, SP, Brazil; edsonmareco@gmail.com

⁴ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; jblasco@ub.edu

* Correspondence: garciadelaserrana@ub.edu

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Duran, B.O.S.; Zanella, B.T.T.; Perez, E.S.; Mareco, E.A.; Blasco, J.; Dal-Pai-Silva, M.; Garcia de la serrana, D. Amino Acids and IGF1 Regulation of Fish Muscle Growth Revealed by Transcriptome and microRNAome Integrative Analyses of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Myotubes. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1180. <https://doi.org/10.3390/ijms23031180>

Academic Editor: Vincenzo Sorrentino

Received: 26 December 2021

Accepted: 17 January 2022

Published: 21 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Amino acids (AA) and IGF1 have been demonstrated to play essential roles in protein synthesis and fish muscle growth. The myoblast cell culture is useful for studying muscle regulation, and omics data have contributed enormously to understanding its molecular biology. However, to our knowledge, no study has performed the large-scale sequencing of fish-cultured muscle cells stimulated with pro-growth signals. In this work, we obtained the transcriptome and microRNAome of pacu (*Piaractus mesopotamicus*)-cultured myotubes treated with AA or IGF1. We identified 1228 and 534 genes differentially expressed by AA and IGF1. An enrichment analysis showed that AA treatment induced chromosomal changes, mitosis, and muscle differentiation, while IGF1 modulated IGF/PI3K signaling, metabolic alteration, and matrix structure. In addition, potential molecular markers were similarly modulated by both treatments. Muscle-miRNAs (*miR-1*, *-133*, *-206* and *-499*) were up-regulated, especially in AA samples, and we identified molecular networks with omics integration. Two pairs of genes and miRNAs demonstrated a high-level relationship, and involvement in myogenesis and muscle growth: *marcksb* and *miR-29b* in AA, and *mmp14b* and *miR-338-5p* in IGF1. Our work helps to elucidate fish muscle physiology and metabolism, highlights potential molecular markers, and creates a perspective for improvements in aquaculture and in in vitro meat production.

Keywords: muscle growth; cell culture; amino acids; IGF1; omics

1. Introduction

The skeletal muscle in teleost fish represents up to 60% of its total body mass and is the most abundant tissue, with a set of characteristics necessary for fish physiology and metabolism, and with great importance for aquaculture industry [1,2]. Muscle growth is a multifactorial process regulated by extrinsic and intrinsic signals. Extrinsic factors include nutrient availability, temperature, salinity, oxygenation, photoperiod, pH, and water flow [3]. Intrinsic signals include transcription factors (such as myogenic regulatory factors, MRFs), hormones, cytokines, and growth factors. These inputs can shift the balance between protein synthesis and degradation pathways, promoting protein accretion by favoring protein synthesis, and therefore muscle growth [4]. Protein synthesis is strongly regulated by the IGF/PI3K/MTOR axis, while protein degradation is mediated by the ubiquitin-proteasome, calpain/calpastatin and autophagic-lysosomal systems [5,6].

Some of the main factors that regulate protein synthesis are IGFs (insulin-like growth factors), together with their own receptors (IGFR—insulin-like growth factor receptor) and binding proteins (IGFBP—insulin-like growth factor-binding protein) [7]. The IGFs are circulating peptides that comprise mostly two variants, IGF1 and IGF2, with roles in muscle cell viability, the proliferation and differentiation of myoblasts, and hypertrophy and repair after muscle injury and exercise [8–10]. The IGF1 is one of the most studied and characterized growth factors that promote muscle growth. When binding to its receptor (IGF1R), IGF1 triggers a phosphorylation cascade, promoting the activation of PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), which is necessary to produce phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. This component recruits the AKT (protein kinase B), which subsequently activates MTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) by phosphorylation [4]. The MTOR integrates endocrine signals, regulates cell cycle, gene transcription, cytoskeletal organization, and protein synthesis. Besides, the pathways involved in protein synthesis control can be activated by signals other than growth factors. Several studies have shown that amino acids promote the phosphorylation of MTOR [11,12] and regulate the transcription and activation of components of the IGF system [13,14] on their own. These studies support the existence of an independent route stimulated by amino acids to promote muscle growth in teleost fish. Given the roles of the IGF system and amino acids in promoting protein synthesis and muscle formation, the comprehension of their effects is beneficial for understanding muscle metabolism and for aquaculture.

The microRNAs (miRNAs) also play a fundamental role in controlling the progression of the myogenic program and the determination of the muscle fiber phenotypes [15,16]. The miRNAs correspond to a class of small non-coding RNAs of which the main function is the post-transcriptional regulation of genes, promoted by the translation inhibition or decay of messenger RNAs (mRNAs) [16–18]. miRNAs regulate their targets in a combinatorial pattern, increasing the complexity and regulatory potential of gene expression, with most of them able to finely regulate signaling pathways and common biological functions [19,20]. miRNAs in teleost fish are involved in embryogenesis and several developmental and physiological processes in different tissues [21–28]. Both muscle formation and growth are regulated by several miRNAs, with some of them considered as muscle-specific with unique or high expression in skeletal muscles, such as *miR-1*, *miR-133*, *miR-206* or *miR-499*. These miRNAs apply a high degree of control over the different phases of myogenesis, including myoblast proliferation, myotube formation, fiber type specification, and muscle regeneration [29–32], orchestrating the fate and phenotype of muscle cells.

Fish myoblast cell cultures are a very powerful tool to study all of these molecular networks and signals regulating myogenesis and muscle growth [33–42]. This *in vitro* model encompasses the main stages of myogenesis, especially myoblast proliferation, differentiation, and fusion into myotubes [38,39,41]. Moreover, the cell culture system provides a more controlled environment than *in vivo*, allowing the analysis of many signaling pathways and molecular networks under controlled conditions. This enables a more in-depth study of regulatory molecules and the investigation of their roles at different stages of cell culture [7]. Furthermore, myoblast cell culture medium can be modified to assess the role of nutrients, growth factors or hormones in regulating the muscle growth process [12–14,35,38,40,42–45], such as the amino acids and IGF1.

In this context, large-scale sequencing techniques have provided enormous progress in the molecular biology field. Global approaches, such as the transcriptome and microRNAome, allow one to obtain a molecular profile of different tissues under distinct conditions or moments, providing opportunities for the identification of molecular markers, and new information on the signaling pathways that regulate a particular biological process [46]. However, to our knowledge, no study has performed large-scale sequencing in fish myotube cell cultures treated with pro-growth signals. Thus, our main objective was to obtain and evaluate the transcriptome and microRNAome of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) myotubes stimulated with amino acids or IGF1. Our analysis of both omics provided new insight into different signaling pathways' activation, potential molecular markers, and

networks integrating gene and miRNA transcription, allowing better comprehension of the molecular regulation of fish myogenesis and muscle growth using pro-growth inputs.

2. Results

2.1. AA and IGF1 Treatments Were Effective, and AA Induced Higher Number of Differentially Expressed Genes (DEGs)

The sequencing of pacu myotubes transcriptome yielded a total of 70,363,951 (CTR), 69,999,996 (AA) and 76,376,683 (IGF1) paired-end reads per group (Supplementary Table S1). After trimming, 30,902,924 paired-end reads were successfully assembled into 176,103 contigs. A total of 69,932 contigs (40%) were successfully annotated, and after normalization, the myotubes treated with AA or IGF1 showed a non-redundant list of 1228 (524 down- and 704 up-regulated) and 534 (289 down- and 245 up-regulated) DEGs compared to the CTR group, respectively (Supplementary Tables S1 and S2).

The principal component analysis (PCA) plot, according to the transcriptome results, showed different profiles between CTR, AA, and IGF1 samples. The pacu myotubes were well separated according to the experimental groups, showing that the treatments were effective, and the cell culture replicates were similar to each other (Supplementary Figure S1). We further confirmed the effectiveness of our protocol via the digital expression of *fbxo32* (*f-box protein 32*), a well-known marker of muscle protein degradation and atrophy [42,47–50], and *myog* (*myogenin*), related to myogenesis and growth [51–54]. Both AA and IGF1 groups showed decreased *fbxo32* transcription (fold-change = 0.37 in AA and 0.39 in IGF1; p -adj < 0.01) and increased *myog* transcription (fold-change = 2.02 in AA and 1.68 in IGF1; p -adj < 0.01) compared to CTR (Figure 1).

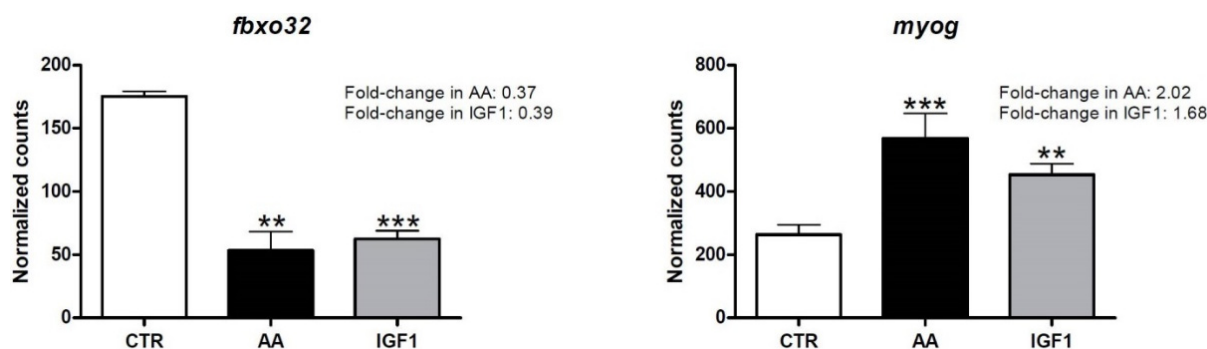


Figure 1. Digital expression of *fbxo32* and *myog*. Gene expression of *fbxo32* (*f-box protein 32*) and *myog* (*myogenin*) in CTR, AA and IGF1 groups according to the differential expression analyses. Expression is shown as number of counts, and values represent means \pm s.e.m. ($n = 3$ independent cell cultures). The fold-changes are shown in the graphs and asterisks indicate significant differences compared to CTR: **: p -adj < 0.01; ***: p -adj < 0.001.

2.2. DEGs Were Specific to Each Treatment or Shared by Both AA and IGF1, Which Modulated Different Biological Processes

The heatmap of gene expression showed a different transcription pattern between the experimental groups. The hierarchical clustering revealed three main groups of genes, better defined by the K-means clustering (K-means = 3), namely Cluster I, II and III, which have increased expression respectively in AA, IGF1, and CTR treatments (Figure 2; Supplementary Table S3). In addition, we used the Venn diagram for further information about genes up- or down-regulated by both pro-growth inputs. Among the 1228 and 534 DEGs, we found that 218 genes were differentially expressed by both AA and IGF1 treatments (Figure 3; Supplementary Table S3), mainly involved with IGF/PI3K/MTOR signaling and the JAK-STAT cascade (Supplementary Figure S2).

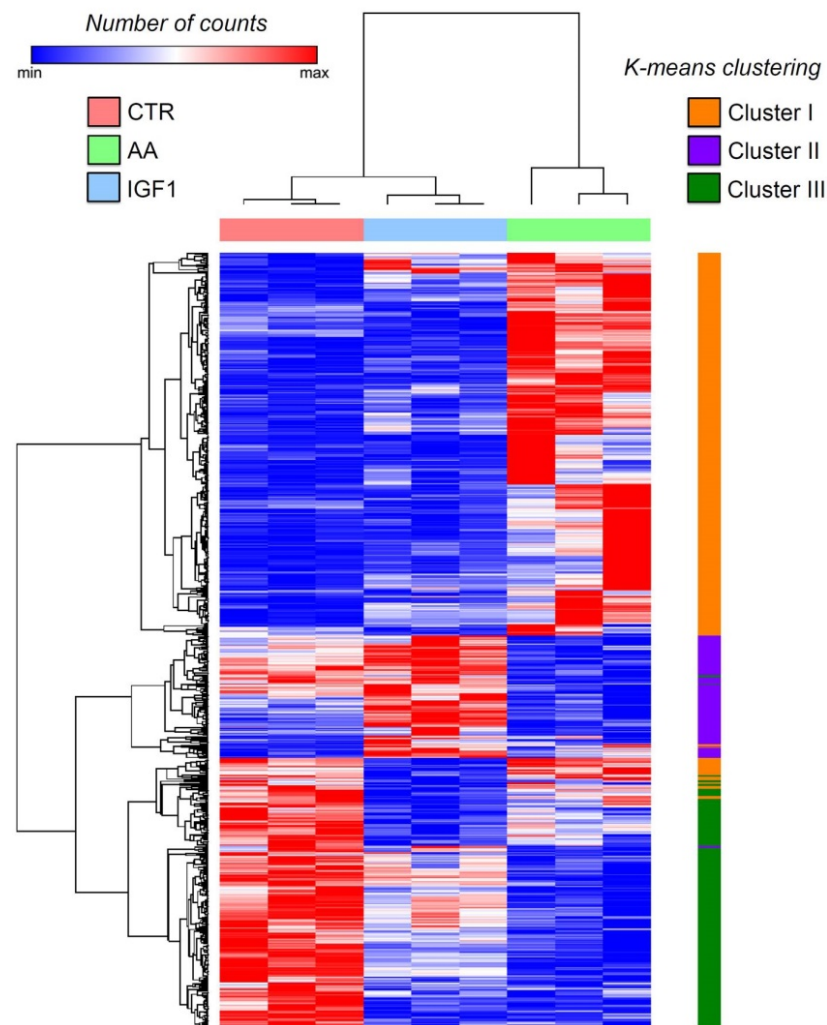


Figure 2. Transcriptome heatmap of pacu-cultured myotubes in CTR, AA, and IGF1 experimental groups. Heatmap showing gene expression according to the CTR, AA and IGF1 treatments by hierarchical clustering and non-hierarchical K-means clustering (K-means = 3). Heatmap shows the normalized read counts of differentially expressed genes, and one minus Pearson correlation was used as a metric for clustering.

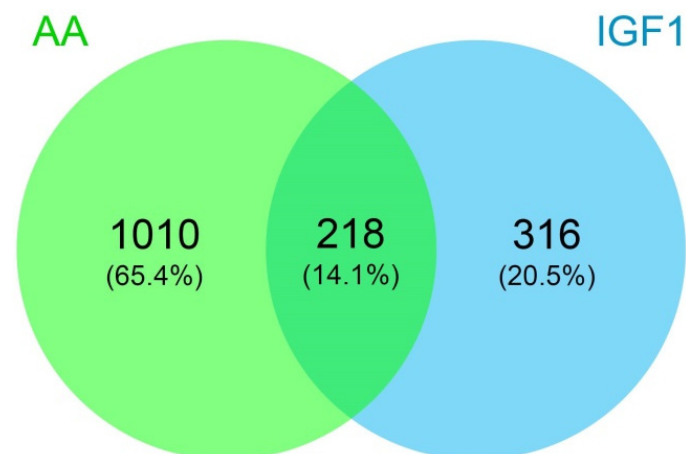


Figure 3. Venn diagram of genes differentially expressed in AA and IGF1 pacu-cultured myotubes. The Venn diagram showing different sets of differentially expressed genes considering the AA and IGF1 treatments, with 218 deregulated genes by both experimental groups.

A gene ontology enrichment analysis was performed to access the biological processes enriched by the DEGs in AA and IGF1-treated samples compared to the CTR group (Figure 4). Our results show that AA treatment induced the enrichment of many processes related to chromosomal alteration/mitosis (GO:0030261; GO:0000819; GO:0031112) and muscle differentiation (GO:0035914; GO:0045445; GO:0006941), while IGF1 modulated mostly IGF/PI3K signaling (GO:0043567; GO:0014068; GO:0008286), amino acids metabolism (GO:1901605; GO:0006526; GO:0015800), and matrix organization (GO:0030199) (Figure 4).

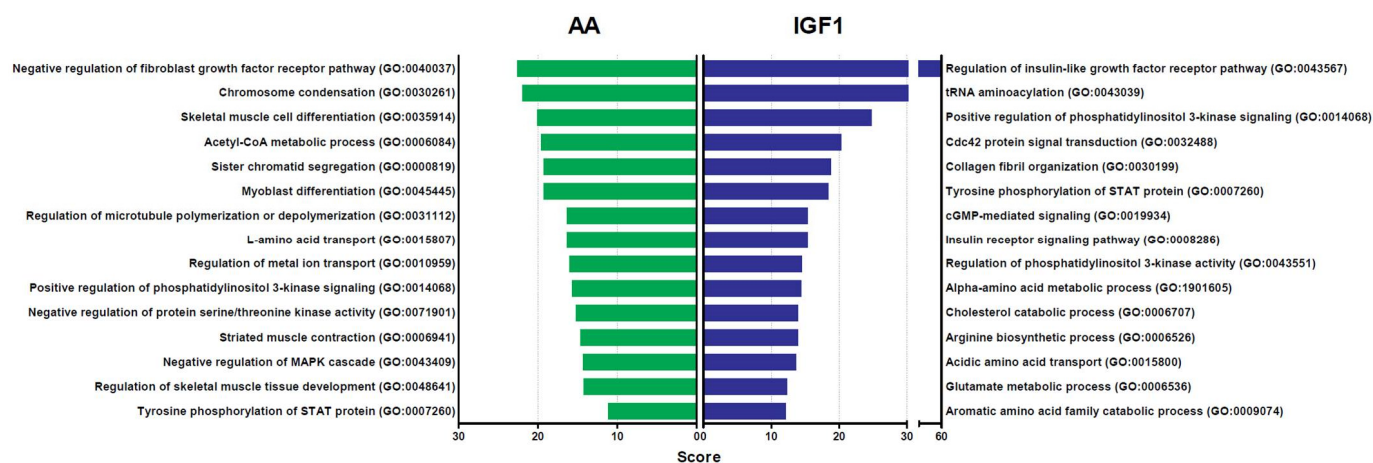


Figure 4. Gene ontology enrichment analysis of genes differently expressed in AA and IGF1 pacu-cultured myotubes. Biological processes were identified for up- and down-regulated genes in AA and IGF1 treatments compared to CTR group. Enrichment was defined as the 15 most significant terms according to the highest scores and *p*-values (<0.05).

2.3. AA and IGF1 Treatments Resulted in Differential Expressed miRNAs, and AA Induced Higher Number of Muscle-Specific miRNAs

The sequencing of pacu myotubes microRNAome yielded a total of 40,147,542 (CTR), 40,557,507 (AA) and 44,512,081 (IGF1) single-end reads per group (Supplementary Table S1). After trimming, 122,586,164 single-end reads (98% of the total) were successfully annotated into 3579 miRNA, and after normalization, the myotubes treated with AA or IGF1 showed, respectively, 11 and 8 differentially expressed miRNA compared to the CTR group (Supplementary Tables S1 and S4).

According to the microRNAome PCA plot, the AA pacu myotubes were grouped separately from CTR and IGF1 treatments, showing that the AA input had a more distinct effect on miRNA modulation, while the samples from CTR and IGF1 groups were similar to each other (Supplementary Figure S3). In fact, the different expression analysis showed that the muscle-specific miRNAs (*miR-1*, *-133*, *-206* and *-499*) were mainly up-regulated by AA treatment, with the presence of mature sequences derived from 3p or 5p strands. In addition, our results show different paralogous copies of *miR-133* (a, b and c) up-regulated by the AA treatment (Supplementary Table S4).

2.4. Omics Integration Showed Complex Molecular Networks, with High *marcksb/miR-29b* Interaction in AA and *mmp14b/miR-338-5p* Interaction in IGF1

After miRNA target prediction, we found interaction molecular networks with strong relationships between the differentially expressed genes from the transcriptome, with differentially expressed miRNAs from the microRNAome. These interaction networks show several up- and down-regulated genes, co-expressed according to the literature, with potential binding sites for miRNAs altered by AA or IGF1 treatments (Supplementary Figure S4). Within the networks generated for AA treatment, we found *marcksb/miR-29b* interaction with high hybridization (MFE = −25.9 kcal/mol). Moreover, MARCKS is involved in myogenesis and muscle differentiation [55–60], and showed a number of

interactions with others DEG in transcriptome (Figure 5). In the IGF1 network, we found *mmp14b/miR-338-5p* interactions with high hybridization (MFE = -26 kcal/mol). MMP14 also showed interactions with other DEGs in the transcriptome, besides the involvement in muscle regeneration and fibrous tissue organization and development [61–64] (Figure 6). In addition, to complement our results and provide further insight, we used the counts obtained in our work to check the correlation between miRNA–target interactions already validated in the literature (Supplementary Figure S5).

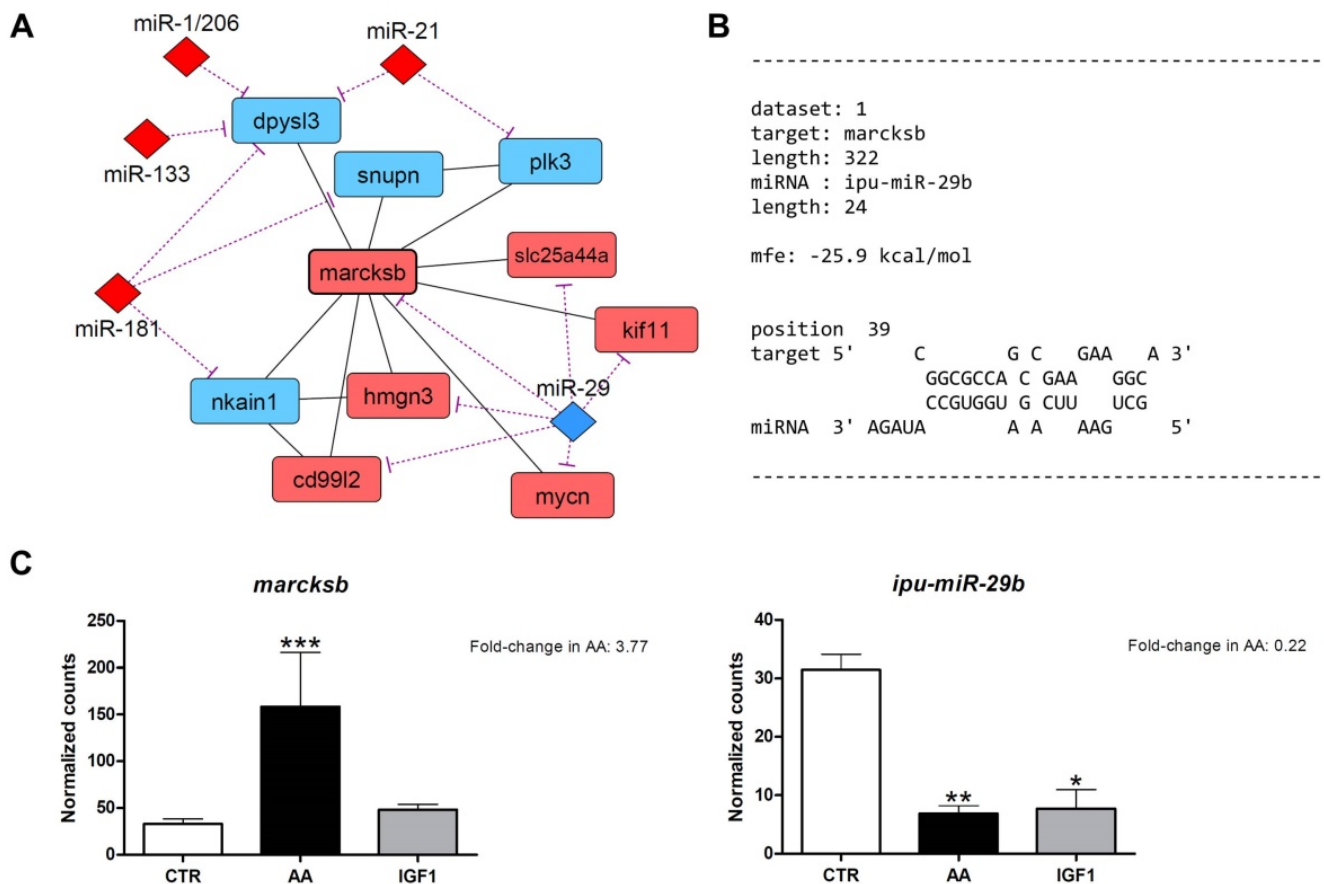


Figure 5. Identification of *marcksb* as potential target of *miR-29b* in AA pacu-cultured myotubes. (A) Interaction molecular network between *marcksb* (*myristoylated alanine rich protein kinase c substrate b*), *miR-29* and other differentially expressed genes and miRNAs. Up- and down-regulated genes are represented respectively by light red and light blue colors, and up- and down-regulated miRNAs are represented respectively by red and blue colors. Purple lines show interaction between miRNAs and genes, and black lines show interaction between the genes. (B) Bioinformatics prediction of the *marcksb/miR-29b* hybridization. The MFE (minimum free energy) value was within accepted range. (C) Gene expression of *marcksb* and *ipu-miR-29b* in CTR, AA and IGF1 groups according to the differential expression analyses. Expression is shown, as number of counts and values represents means \pm s.e.m. ($n = 3$ independent cell cultures). The fold-changes in AA group are shown in the graphs, and asterisks indicate significant differences between groups: *: p -adj < 0.05 ; **: p -adj < 0.01 ; ***: p -adj < 0.001 .

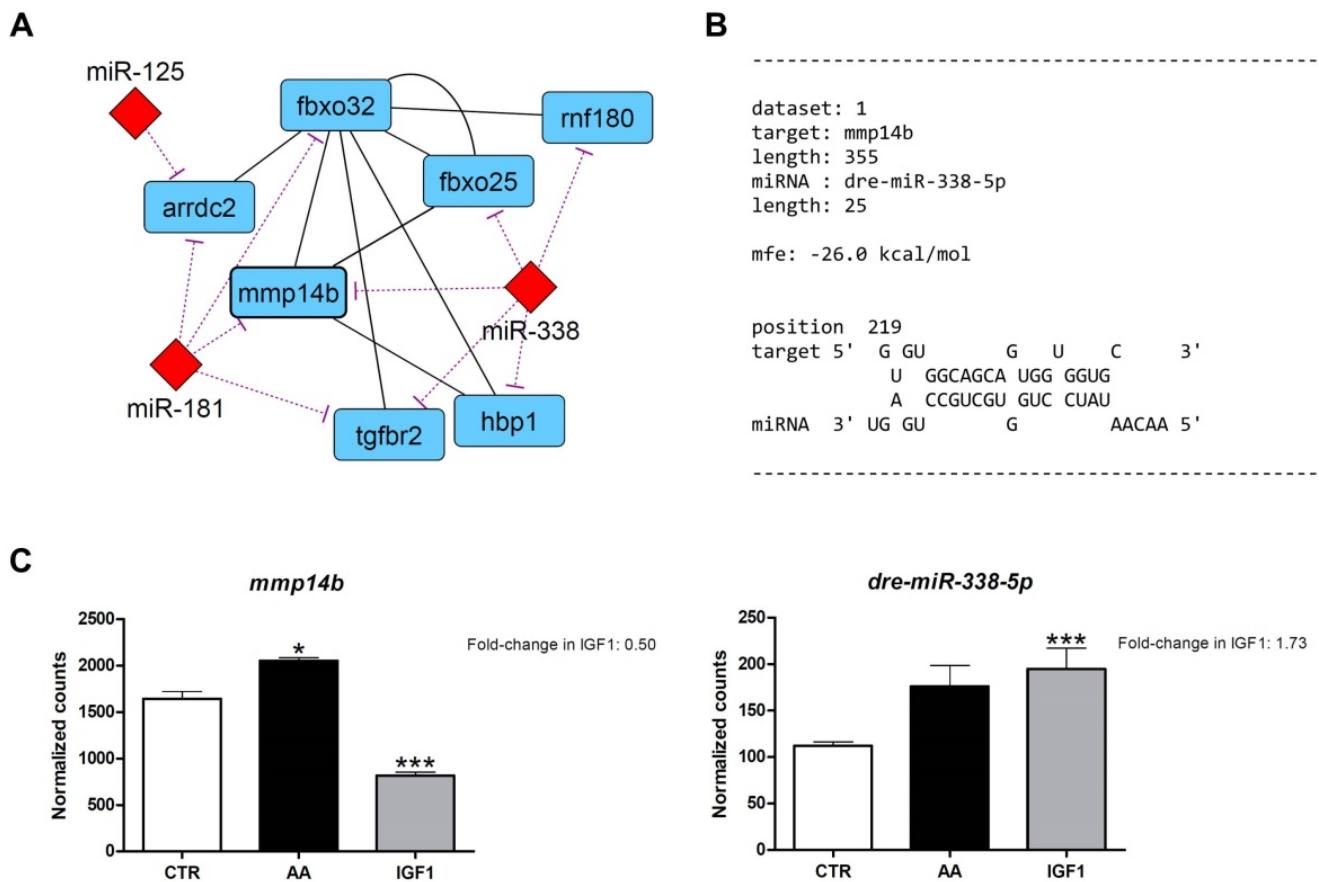


Figure 6. Identification of *mmp14b* as potential target of *miR-338-5p* in IGF1 pacu-cultured myotubes. (A) Interaction molecular network between *mmp14b* (*matrix metalloproteinase 14b*), *miR-338* and other differentially expressed genes and miRNAs. Down-regulated genes are represented by light blue color, and up-regulated miRNAs are represented by red color. Purple lines show interaction between miRNAs and genes, and black lines show interaction between the genes. (B) Bioinformatics prediction of the *mmp14b/miR-338-5p* hybridization. The MFE (minimum free energy) value was within accepted range. (C) Gene expression of *mmp14b* and *dre-miR-338-5p* in CTR, AA and IGF1 groups according to the differential expression analyses. Expression is shown as number of counts, and values represent means \pm s.e.m. ($n = 3$ independent cell cultures). The fold-changes in IGF1 group are shown in the graphs, and asterisks indicate significant differences between groups: *: p -adj < 0.05; ***: p -adj < 0.001.

2.5. Inverse Expression Pattern Was Observed between *marcksb* and *miR-29b*, and between *mmp14b* and *miR-338-5p*, Both In Vitro and In Vivo

To validate and further explore our results, we evaluate the gene expression of *marcksb*, *miR-29b*, *mmp14b*, *miR-338-5p*, and other genes selected from AA and IGF1 networks (Supplementary Table S5). We used in vitro pacu myotubes treated with amino acids or IGF1, and in vivo muscles from pacus submitted to fasting (4 days) and re-feeding (3 days). The *marcksb* transcription was increased in myotubes treated with AA (fold-change = 2.23; $p < 0.05$) compared to CTR and IGF1, and increased in the re-fed fish (fold-change = 1.30; $p < 0.01$) compared to the fasting period. The expression of *mycn* did not show statistical differences between experimental groups. On the other hand, *miR-29b* expression was decreased in AA, despite the lack of statistical differences, and in IGF1, compared to CTR (fold-change = 0.30; $p < 0.05$). Similarly, *miR-29b* showed up-regulation after fasting (fold-change = 35.7; $p < 0.05$) and down-regulation after refeeding (fold-change = 1.64; $p < 0.05$) (Figure 7).

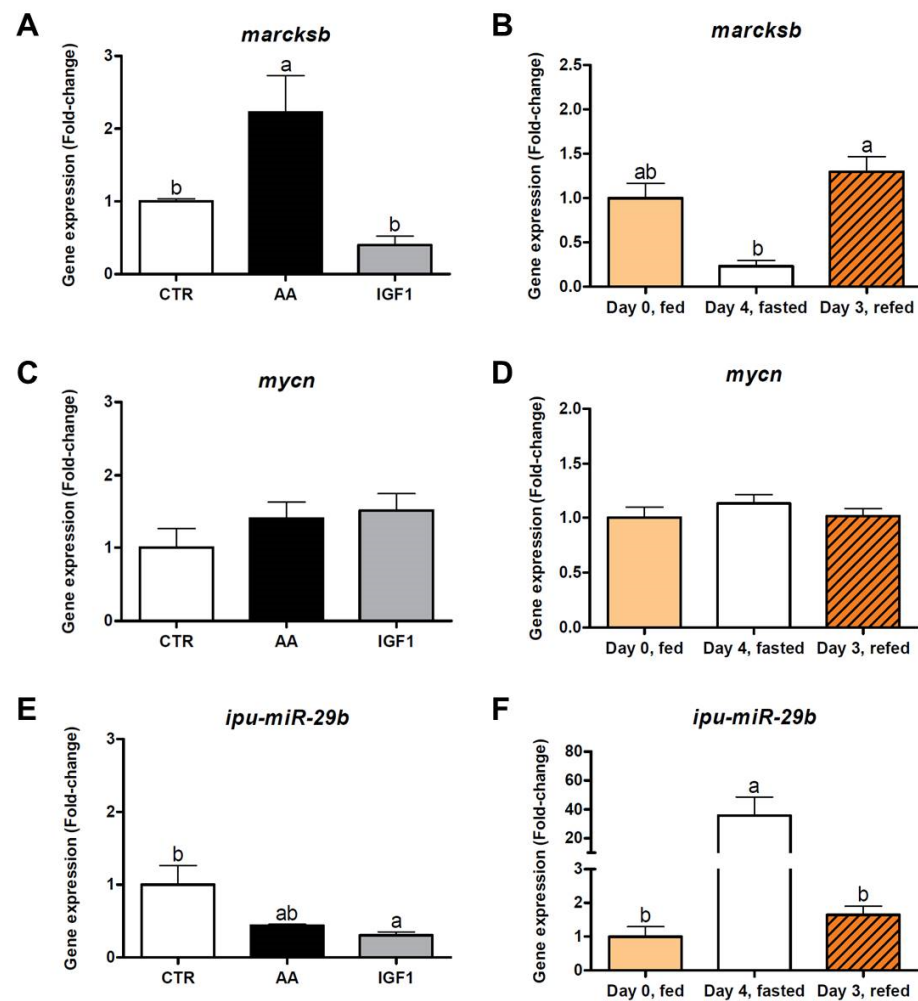


Figure 7. (A,C,E) In vitro and (B,D,F) in vivo relative expression of *marcksb*, *mycn* and *miR-29b*. Relative gene expression of *marcksb* (*myristoylated alanine rich protein kinase C substrate b*), *mycn* (*n-myc proto-oncogene protein*) and *ipu-miR-29b* by qPCR. Validation was performed from CTR, AA, and IGF1 myotubes (in vitro samples; $n = 4$ independent cell cultures), and from fish muscles before fasting (Day 0, fed), after 4 days of fasting (Day 4, fasted), and 3 days of re-feeding (Day 3, refed) (in vivo samples; $n = 6$). Values represent means \pm s.e.m. Letters indicate significant differences between groups. Parametric data were analyzed by one-way ANOVA test, followed by Tukey's multiple comparisons test, while non-parametric data were analyzed by a Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test ($p < 0.05$).

The expression of *mmp14b*, *fbxo25* and *tgfbr2* was decreased in myotubes treated with IGF1 compared to other groups (fold-change = 0.32 for *mmp14b*, fold-change = 0.36 for *fbxo25* and fold-change = 0.50 for *tgfbr2*; $p < 0.01$), results corroborated by the increased transcription of these genes after fasting (fold-change = 4.61 for *mmp14b*, fold-change = 13.5 for *fbxo25* and fold-change = 2.13 for *tgfbr2*; $p < 0.05$), and decreased transcription after re-feeding (fold-change = 1.04 for *mmp14b* and fold-change = 1.00 for *fbxo25*; $p < 0.01$). In contrast, the *miR-338-5p* showed up-regulation in IGF1 compared to CTR (fold-change = 3.35; $p < 0.05$), while the fish showed decreased transcription after fasting (fold-change = 0.59; $p < 0.05$), and a slight increase after re-feeding, despite the lack of statistical difference (Figure 8).

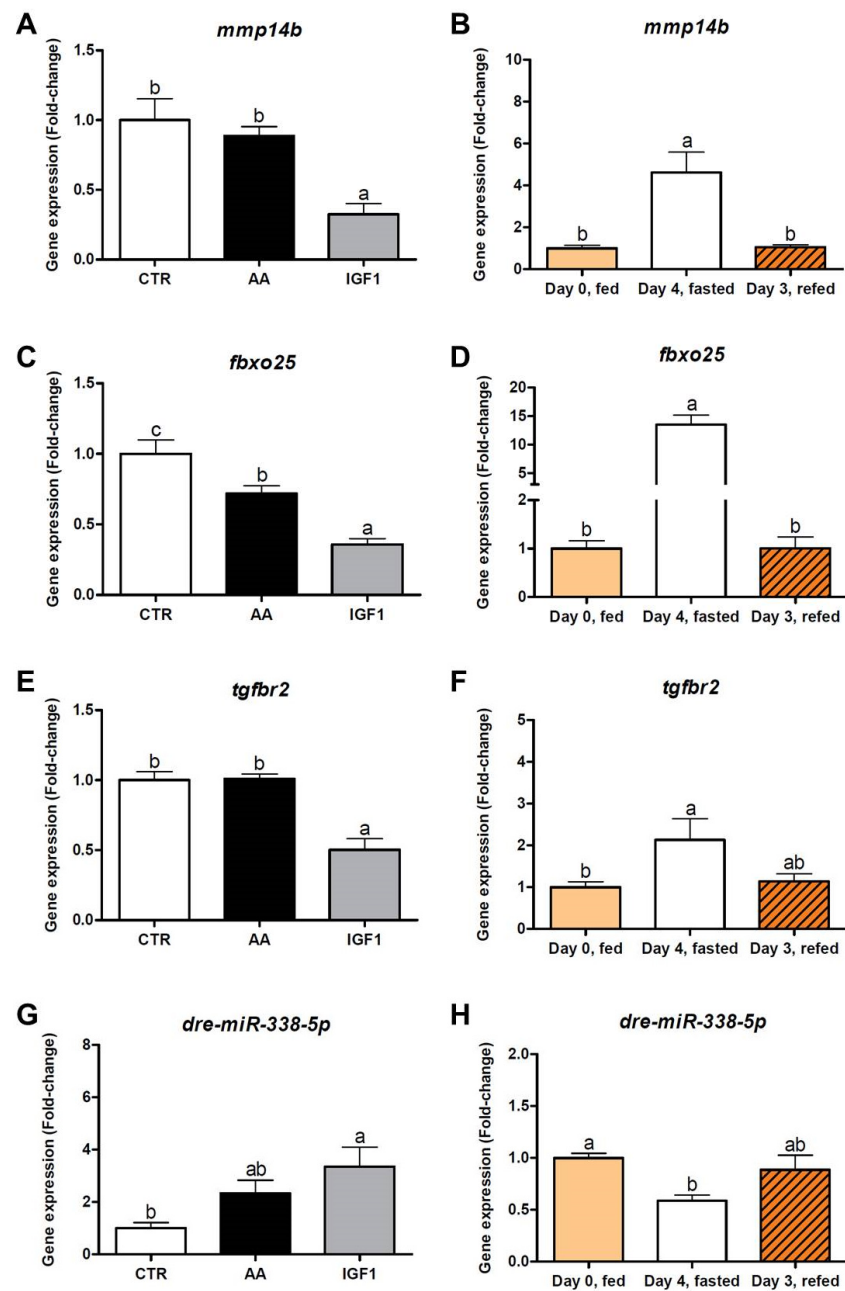


Figure 8. (A,C,E,G) In vitro and (B,D,F,H) in vivo relative expression of *mmp14b*, *fbxo25*, *tgfb2* and *miR-338-5p*. Relative gene expression of *mmp14b* (matrix metalloproteinase 14b), *fbxo25* (f-box protein 25), *tgfb2* (tgf-beta receptor type-2) and *dre-miR-338-5p* by qPCR. Validation was performed from CTR, AA and IGF1 myotubes (in vitro samples; $n = 4$ independent cell cultures), and from fish muscles before fasting (Day 0, fed), after 4 days of fasting (Day 4, fasted), and 3 days of re-feeding (Day 3, refed) (in vivo samples; $n = 6$). Values represent means \pm s.e.m. Letters indicate significant differences between groups. Parametric data was analyzed by one-way ANOVA test, followed by Tukey's multiple comparisons test, while non-parametric data were analyzed by the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test ($p < 0.05$).

In addition, to complement our results, we checked the correlation between *marcksb/miR-29b* and *mmp14b/miR-338-5p* interactions. Both showed significant negative correlation indexes ($\rho = -0.35$ and $\rho = -0.62$, respectively; $p < 0.05$) (Supplementary Figure S6).

3. Discussion

Research on fish skeletal muscle growth has enormous importance in fish farming production and development, with this tissue representing the main product of the aquaculture industry [1,7]. Hyperplastic and/or hypertrophic muscle growth involve the proliferation and differentiation of myoblasts and their subsequent fusion into myotubes, steps recapitulated by the fish myoblast cell cultures [38,39,41]. In addition, fish muscle growth is influenced by different inputs that lead to increased protein synthesis, strongly regulated by the IGF/PI3K/MTOR axis. Among them, the IGF1 itself and several amino acids are the most studied factors that promote muscle growth [41].

Different studies have used the fish myoblast cell cultures to examine anabolic pathways in muscle [11–13,44,65]. Díaz et al. (2009) detected *glut4* up-regulation (*insulin-responsive glucose transporter type 4*) in both myoblasts and myotubes after treatment with INS (insulin) and IGF1 [66]. Moreover, IGF1 and INS supplementation to trout myocytes promoted increased protein synthesis and decreased proteolysis, whereas the administration of leucine only reduced protein degradation [44]. In addition, the lack of amino acids increases autophagosome formation, the expression of autophagy genes [67], and the transcription of *fbxo32/mafbox* and *murfl* (*muscle-specific ring finger protein 1*) [68], but there is evidence that amino acids can act as positive or negative regulators of protein turnover in fish muscle. Cleveland and Radler (2019) showed that leucine and phenylalanine directly regulate proteolysis in rainbow trout-cultured muscle cells, with leucine as a central regulator of protein turnover, while an excess of lysine and valine increased rates of protein degradation [69]. On the other hand, Azizi et al. (2016) observed that lysine deficiency down-regulated the expression of IGF signaling components and MRFs in gilthead sea bream myocytes [70].

In our study, we obtained a higher amount of DEGs in AA-treated myotubes (1228), with much fewer de-regulated genes in IGF1-treated cells (534) (Supplementary Tables S1 and S2), which could be an indicative that AA treatment was more effective or potent than the pro-growth condition, compared to the IGF1 group. However, we must consider that the strong regulation of AA treatment may result from the medium composition, which includes several amino acids with unique or overlapping roles in muscle growth and metabolism [69], representing a collection of anabolic factors, and not a single factor as the IGF1. According to the heatmap, there is a gene expression signature specific to each experimental group, CTR (Cluster III), AA (Cluster I), or IGF1 group (Cluster II) (Figure 2). Considering the distinct molecular repertoires that are mobilized in each pro-growth condition, the identification of the genes in each cluster (Supplementary Table S3) could be of interest for research focusing on AA or IGF1 treatment. Our results provided important large-scale data from isolated fish muscle cells treated with the most used inputs to increase myogenesis and muscle growth [41], something not yet investigated, to the best of our knowledge. In addition, we identified 218 genes with up- or down-regulated transcription in both AA and IGF1 treatments (Figure 3; Supplementary Table S3). Among these genes, we found the down-regulation of *igfbp1a* (*insulin-like growth factor-binding protein 1*; fold-change = 0.31 in AA and 0.35 in IGF1) and up-regulation of *igfbp5a* (*insulin-like growth factor-binding protein 5*; fold-change = 2.34 in AA and 2.16 in IGF1), both with defined roles in skeletal muscle.

Despite having structural similarities, IGFBPs exert different functions according to the physiological conditions and cell types [71–73]. In teleost fish, as well as in mammals, the highest expression of *igfbp1* occurs in the liver under normal conditions [74,75], and in skeletal muscle under low nutrient availability. To overcome this catabolic condition, IGFBP1 possibly sequesters IGFs from IGFs, prioritizing metabolic processes associated with cell survival instead of muscle growth [72]. In this sense, Rolland et al. (2015) described that the low amino acid diet promotes the up-regulation of *igfbp1* in rainbow trout, a process reversed when the anabolic environment is recovered [76]. Similarly, the down-regulation of *igfbp1a* in both the AA and IGF1 treatments of our study indicates the activation of anabolic pathways and the continuity of myogenic processes. On the

other hand, studies have shown that *igfbp5* has great importance in myogenesis, muscle growth and gill functions, regulating IGFs and calcium ion influx [77–79]. Atlantic salmon muscle cells had high expression of *igfbp5* paralogs (*igfbp5a* and *igfbp5b*) in response to amino acids, possibly stimulating the cell cycle [13], and gilthead sea bream muscle cells showed increased *igfbp5* transcription under treatment with amino acids and IGFs [70,80], similar to our data, results that corroborate and reinforce the importance of this gene in pro-growth conditions.

Moreover, our results also showed that individual AA and IGF1 treatments modulated different signaling pathways. AA samples showed the enrichment of biological processes related to chromosomal changes/mitosis and muscle differentiation, while IGF1 samples induced IGF/PI3K signaling, the metabolism of amino acids, and matrix organization (Figure 4). These same biological processes were enriched in each treatment considering the exclusive genes in heatmap clusters. Corroborating our data, studies showed that AA stimulates protein synthesis during myogenesis by themselves [11,12], through the direct activation of the MTOR complex, without affecting upstream components such as PI3K, but IGF1 only stimulates protein synthesis if AA are also present [13,14]. In fact, our results indicate that PI3K signaling is less enriched in AA myotubes, and that IGF1 requires the activation of amino acids metabolism to stimulate protein synthesis. It seems that IGF1 has an upstream effect to induce muscle growth, in accordance with its role as a binding factor at the muscle cell membrane [81], stimulating protein synthesis via an increase in PI3K signaling. On the other hand, the AA treatment appears to have a downstream effect on muscle growth, increasing myogenesis through cell proliferation/mitosis and differentiation. It is not clear why IGF1 alone fails to stimulate myogenic pathways such as AA. A hypothesis would be that amino acids are more relevant and consistent during the MTOR integration of nutritional and hormonal signals to regulate protein synthesis and cell proliferation [82–84]. The amino acids may facilitate IGF1 function, and their absence in IGF1 treatment possibly inhibited, or did not activate, components of the IGF and myogenic systems, similar to the results of Azizi et al. (2016) [70]. However, as discussed, this broader effect of AA treatment may result from the presence of several different amino acids in the culture medium.

The miRNAs also regulate all steps of myogenesis [29–32,85,86], through the silencing of mRNAs [16–18]. In our study, we observed, respectively, 11 and 8 differentially expressed miRNAs in AA and IGF1 samples (Supplementary Tables S1 and S4), with the majority of the AA up-regulating muscle-specific miRNAs (*miR-1*, -133, -206 and -499), which could also indicate the higher potency of AA treatment as a pro-growth input. Both in mammals and teleost fish, the *miR-1* and -206 belong to the same miRNA family and are involved in muscle development by stimulating myoblast differentiation [29,30,34], while the myoblast proliferation is regulated by *miR-133* [29,34]. On the other hand, *miR-499* participates in the specification and maintenance of the slow-twitch muscle fiber phenotype, with increased expression in slow muscle cells [31,32,34,36,87,88]. Our work showed significant negative correlation between miRNAs and validated targets involved with myogenesis and muscle growth (Supplementary Figure S5), and the high enrichment of myogenic processes in AA myotubes could be explained by the up-regulation of several muscle-specific miRNAs. The favored cell differentiation was stimulated by *miR-1* and *miR-206* (fold-change = 1.25 and 2.39 in AA), while myoblast proliferation/mitosis was probably regulated by the many paralogous copies of *miR-133* (fold-change = 1.75 in AA), which also showed different active strands (5p and 3p) (Supplementary Table S4). The different copies of *miR-133* (*-133a*, *-133b* and *-133c*) and their specific functions in muscle growth constitute an interesting research field, leading to improvements in biological knowledge, and the potential to apply this in aquaculture.

Rather than individual genes and miRNAs, both AA and IGF1 treatments also activated large sets of molecular components, demonstrated by the strong relationship and high complexity of the interaction networks (Supplementary Figure S4). Within such networks, we found two interesting genes: *marcksb* (fold-change = 3.77 in AA), which is related

to myogenesis and muscle differentiation; and *mmp14b* (fold-change = 0.5 in IGF1), which is related to matrix organization and development (Figures 5 and 6). These de-regulated genes showed high affinity with the miRNAs *miR-29b* (fold-change = 0.22 in AA) and *miR-338-5p* (fold-change = 1.73 in IGF1), respectively. Validation through qPCR corroborated the results of differential gene expression, with increased *marcksb* expression and decreased *mmp14b* expression by pro-growth stimuli both in vitro and in vivo (Figures 7 and 8), besides a significant negative correlation between these genes and miRNAs (Supplementary Figure S6).

The MARCKS is an actin-binding protein that translocates from plasma membrane to cytosol and vice versa, depending on its phosphorylation state, which is regulated mainly by protein kinase C [55,60]. Studies showed that MARCKS translocation regulates muscle cell adhesion, spreading [56], differentiation and fusion [57,58], in addition to the control of cytoskeleton dynamics [89]. Moreover, the blocking of MARCKS resulted in abnormalities in the skeletal muscle of zebrafish, with an increased number of nuclei and curve-shaped fibers [59]. Our work showed that AA treatment stimulated the enrichment of muscle differentiation processes, consistent with the up-regulation of *marcksb* by AA in in silico (Figure 5A,C), in vitro (Figure 7A), and in vivo re-fed pacus (Figure 7B). Interestingly, other well-characterized genes of myoblast fusion were also up-regulated by the AA in our in silico analyses, such as *myogenin* (fold-change = 2.02) and *myomaker* (fold-change = 2.12), indicating that *marcksb* could be a new option and a possible molecular marker of fish muscle cell differentiation in pro-growth conditions. In contrast, *miR-29b* was down-regulated by both AA and IGF1 in in silico (Figure 5A,C), in vitro (Figure 7E) and in vivo re-fed pacus (Figure 7F). In fact, *miR-29b* is commonly up-regulated in multiple types of muscle atrophy, as induced by denervation, dexamethasone, fasting, ageing or cachexia, conditions attenuated after the inhibition of this miRNA [90,91]. The reduced expression of *miR-29b* in our AA treatment probably allowed the effects of *marcksb*, and favored the environment for myogenesis and muscle growth. To obtain further information, we also evaluated the expression of *mycn*, a proto-oncogene required for cell proliferation which inhibits myogenic differentiation [92]. Despite the up-regulation of *mycn* in AA transcriptome (fold-change = 2.56) and the connection with *marcksb* in the molecular network (Figure 5A), we did not find statistical differences between the groups, in vitro or in vivo (Figure 7C,D), which reinforces a more active role of *marcksb* and enhanced muscle differentiation.

MMP14 is a collagenase and a member of the matrix metalloproteinase family, which is not fully characterized in skeletal muscle. Ohtake et al. (2006) demonstrated that MMP14 is a major contributor to the progression of myogenesis through the degradation of extracellular matrix (ECM) components. In addition, MMP14-deficient mice showed smaller and more heterogeneous muscle fibers with compromised integrity [62]. Human muscle satellite cells also showed the expression of this metalloproteinase, which is necessary for in vitro cellular invasion through collagen I [61], highlighting the relevance of MMP14 activity for muscle cell migration and ECM remodeling, which are particularly important for muscle regeneration and growth [63]. In our study, we observed the down-regulation of *mmp14b* by IGF1 in silico (Figure 6A,C), in vitro (Figure 8A) and in vivo re-fed pacus (Figure 8B). Although controversial, these results make sense considering that IGF1 mainly enriched processes related to IGF/PI3K signaling, and not myogenic mechanisms. In fact, *mmp14b* was up-regulated in the AA transcriptome (Figure 6C). As discussed, IGF1 treatment was possibly less effective as a pro-growth condition compared to the AA group, suggesting that the cells were focusing on protein turnover rather than muscle proliferation and differentiation. On the other hand, *miR-338-5p* was up-regulated by IGF1 in in silico (Figure 5A,C), in vitro (Figure 8G) and in vivo re-fed pacus (Figure 8H). To the best of our knowledge, no study has evaluated this miRNA in fish skeletal muscle. Lei et al. (2017) have shown roles of *miR-338-5p* in suppressing the proliferation and migration of glioblastoma cells through the inhibition of EFEMP1, a regulator of matrix metalloproteinases [93],

and Nielsen et al. (2014) observed an up-regulation of *miR-338-3p* in circulation after 1 h of acute exercise [94], allowing us to draw a parallel with the pro-growth effect of IGF1.

For a deeper understanding of our *in silico* results, we also evaluated the expression of other de-regulated genes that showed an interaction with *mmp14b* and could also be regulated by *miR-338-5p*. In association with *mmp14b*, we found the decreased expression of *fbxo25* and *tgfbr2* after the pro-growth stimuli, both *in vitro* and *in vivo* (Figure 8C–F). The FBXO25 is classified as an E3 ubiquitin ligase with high homology to FBXO32 in fish [95]. We previously demonstrated the increased expression of *fbxo25* during fasting and down-regulation during re-feeding in pacu muscle and cultured cells [42,96], and this same molecular scenario was observed in fasted and re-fed rainbow trout [97]. In the present work, a pronounced reduction in *fbxo25* expression was observed in IGF1, indicating that the protein breakdown should be stopped, so that anabolism and muscle growth take place in the treatment. The TGF β pathway and its downstream components are well known as myogenic inhibitors, with MSTN (myostatin) widely studied in fish muscle development [98]. The TGF β signaling starts with the binding of the ligand to type 1 and 2 membrane receptors, forcing their assembly into a complex that initiates the phosphorylation cascade [99]. In this sense, the activation of *tgfbr2* was associated with *myod* and *myog* down-regulation in C2C12 cells, and the *tgfbr2* inhibition by miRNA resulted in a reversed effect [100]. In addition, Accornero et al. (2014) showed that the blocking of TGF β signaling through TGFBR2 mutant attenuated muscular dystrophy and injury, and improved muscle regeneration and satellite cell numbers in mice [101], indicating a negative regulation by *tgfbr2* in muscle growth. In the present work, the down-regulation of *tgfbr2*, both *in vitro* and *in vivo*, demonstrates that the suppression of TGF β signaling may be necessary for fish muscle growth regulated by IGF1. Our results suggest that IGF1-induced the expression of *miR-338-5p*, which possibly decreased the expression of *mmp14b*, *fbxo25* and *tgfbr2*, resulting in positive effects for protein synthesis and anabolism, but suppressing the progression of myogenesis to avoid excessive cell energy expenditure.

4. Materials and Methods

4.1. Fish and Sample Collection

All experiments and procedures were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu (protocol number 1184; 14 June 2019) and of the Federal University of Goiás (UFG), Goiânia (protocol number MB 026/21; 20 April 2021). The experiments were also conducted following the ARRIVE guidelines [102].

Fish were farmed at 28 °C under 12 h light:12 h dark photoperiod in storage tanks of 0.5 m³ equipped with water circulation system. For *in vitro* experiments, juvenile pacus (5–20 g, *n* = 20 per culture) were fed *ad libitum* once a day with a commercial diet, remaining 24 h in fasting before the experiments. For *in vivo* experiments, juvenile pacus (10–15 g, *n* = 6 per group) were submitted to fasting/re-feeding protocol, with a commercial diet. Fast-twitch muscles were collected from the epaxial region before the fasting protocol (Day 0), after 4 days of fasting (Day 4), and after 3 days of re-feeding (Day 3). All fish were euthanized with an excess of benzocaine (≥ 250 mg/L; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) prior to body weight (g) measuring and muscle collection.

4.2. Isolation and Myoblast Cell Cultures

The myoblasts were isolated and cultured according to the protocol described by Fauconneau and Paboeuf (2000) [103]. The fast-twitch muscles were collected from the epaxial region and mechanically dissociated with scalpels. To release the muscle cells, the fragments were enzymatically digested with 0.2% collagenase type I (C9891) and 0.1% trypsin (T4799) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cell suspension was filtered in cell strainers (Corning, New York, NY, USA), allowing for the removal of debris,

centrifuged, and the cell pellet was resuspended in DMEM medium (DMEM (D7777), 9 mM NaHCO₃ (S5761), 20 mM HEPES (H3375), pH 7.4), with 1% antibiotics (A5955) and 10% fetal bovine serum (F7524) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The cells were diluted at a concentration of 2×10^6 cells/mL and plated in 6-wells plates, previously treated with poly-L-lysine (P6282) and laminin (L2020) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which have high affinity for the myoblasts. The myoblasts were incubated at 28 °C, with the medium changed every day, and the myoblasts morphology was monitored regularly under a microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The results were achieved from 3 independent cell cultures.

4.3. Amino Acids and IGF1 Treatments

After 8 days of cell culture (myotube formation), cells were incubated for 12 h with free amino acid medium (Earle's balance salt solution 1× (E7510), 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES, Vitamin Mix 1× (M6895), 1% antibiotics and 4 g/L D-glucose (G8270)—Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to reduce gene expression to basal levels. The pacu myotubes were incubated for additional 24 h in free amino acid medium (CTR group), medium with amino acids (AA group) (DMEM, 9 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES and 1% antibiotics—Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), or medium with recombinant IGF1 (IGF1 group) (free amino acid medium supplemented with IGF1 from gilthead sea bream at 100 ng/mL—ProSpec, Rehovot, Israel). The treatments were performed according to the protocol described by Bower and Johnston (2010) and Garcia de la serrana and Johnston (2013) [13,14]. Although minor differences, the final media composition between the groups differed, essentially with respect to the presence of amino acids or IGF1.

4.4. RNA Extraction and Sequencing

Total RNA was extracted from the myotubes immediately after the treatments, using TRIzol[®] Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's guidelines. RNA quantification and purity were estimated by spectrophotometry using 260/280 and 260/230 ratios (NanoVue[™] Plus GE Healthcare, Chicago, IL, USA), and only samples with ratios >2.0 were used. The RNA integrity was evaluated through capillary electrophoresis using the 2100 Bioanalyzer System (Agilent, Santa Clara, CA, USA), and samples with RNA integrity number (RIN) >9.5 were used.

The generation of DNA libraries and sequencing of mRNAs and miRNAs were performed by LC Sciences (Houston, TX, USA). Transcriptome was obtained through the NovaSeq 6000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with 150 base pairs, paired-end, and 6 GB data per sample. microRNAome was obtained through the HiSeq 4000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with 50 base pairs, single-end, and 7–10 million reads per sample. The resulting large-scale sequencing data were processed through the GNU/Linux operating system, based on the Linux Mint 18.1 distribution (www.linuxmint.com, accessed on 3 May 2020).

4.5. Transcriptome and microRNAome Analyses

The quality of the sequencing was evaluated through the software FastQC version 0.11.8 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc, accessed on 3 May 2020), and the software Trimmomatic [104] was used for adapters removal and filtering of the reads by quality, using a phred score >33. Considering the mature miRNA size (~22 nucleotides), only reads more than 17 nucleotides in length were maintained for the microRNAome.

For the transcriptome, the paired-end reads were de novo assembled using the Trinity software [105,106], and the contigs were annotated using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [107] and OmicsBox software (version 1.4.12, BioBam Bioinformatics; <https://www.biobam.com/omicsbox>, accessed on 3 May 2020). Sequences were blasted against the Ostariophysi fish proteome database (*Astyanax mexicanus*, *Danio rerio* and *Pygocentrus nattereri*) and downloaded from the Ensembl Genome Browser 89 (<http://www.ensembl.org/index.html>, accessed on 3 May 2020), using BLASTx with an

e-value cut-off of 10^{-3} . The annotated transcriptome was used to map the contigs for each sample, using the Bowtie2 aligner [108]. For the microRNAome, the Bowtie2 aligner was used for the annotation and mapping steps based on the mature miRNA list of teleost fish (*Astatotilapia burtoni*, *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Takifugu rubripes*, *Gadus morhua*, *Ictalurus punctatus*, *Metriaclyma zebra*, *Neolamprologus brichardi*, *Oryzias latipes*, *Oreochromis niloticus*, *Pundamilia nyererei*, *Salmo salar* and *Tetraodon nigroviridis*) available in miRBase version 22.1 (www.mirbase.org, accessed on 3 May 2020), allowing us to obtain an expression profile of known miRNAs.

Tables with the contig counts were submitted to differential expression analyses using the Bioconductor/R software with the DESeq2 package [109,110]. Genes and miRNAs counts were normalized by the median of the ratios method, with the counts divided by sample-specific size factors. Considering the number of counts between the samples, only genes and miRNAs with counts mean ≥ 10 were maintained. The genes were considered differentially expressed with adjusted p -value ≤ 0.05 and $\text{Log}_2(\text{Fold-change}) \leq -1$ and ≥ 1 (2-fold). The miRNAs were considered differentially expressed with adjusted p -value ≤ 0.05 and $\text{Log}_2(\text{Fold-change}) \leq -0.55$ and ≥ 0.55 (1.5-fold). All the raw and processed data of transcriptome and microRNAome analyses are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets under the accession number GSE192683.

4.6. Principal Component Analysis, Heatmap, Venn Diagram and Gene Ontology Enrichment Analysis

A principal component analysis (PCA) related to gene and miRNAs analysis was performed using the number of normalized counts in \log_2 scale in Bioconductor/R software with the DESeq2 package [109,110]. The heatmap was created using Morpheus software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>, accessed on 18 August 2020) [111] with the normalized number of counts in the transcriptome. The hierarchical clustering was performed using one minus Pearson correlation as a metric and average linkage method. Non-hierarchical K-means clustering, obtained using the same metric, was used to better define different clusters of genes among the expression data. The Venn diagram was obtained in the Venny 2.1 software (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, accessed on 18 August 2020) and used to show sets of DEGs appearing in one or both AA vs. CTR and IGF1 vs. CTR comparisons. A gene ontology (GO) enrichment analysis was performed using the FishEnrichr database [112,113]. Up- and down-regulated genes were used to identify over-represented gene ontology terms of biological processes based on the annotation for *Danio rerio*. The Fisher exact was used as test type and, for each comparison, we considered the 10–15 most enriched terms according to the highest scores and lowest p -values (≤ 0.05).

4.7. miRNA target Prediction and Interaction Molecular Networks

The prediction of target mRNAs of the differentially expressed miRNAs was performed using TargetScanFish 6.2 [114], by searching for the presence of 8mer and 7mer sites that match the seed region of each miRNA. Interaction molecular networks were generated with the Cytoscape software [115], based on the *Danio rerio* annotation, using the GeneMANIA plugin [116], in order to show the level of the relationship between genes and miRNA, and the potential altered signaling pathways.

The miRNA target predictions were further evaluated by computational approaches, using the TransDecoder version 5.5.0 software [106] to identify the open reading frame and the ExUTR version 0.1.0 [117] to extract the 3' untranslated regions of the mRNAs' sequences. RNAhybrid version 2.1.2 [118] was used with the default parameters to predict miRNA target interaction, providing the minimum free energy (MFE) of hybridization and potential binding sites through nucleotide base complementarity. We selected miRNA target interactions with $\text{MFE} \leq -25$ kcal/mol. In addition, we used the number of counts to analyze the correlation between miRNAs and genes that are well-validated according to the literature. The correlation index and statistical significance between miRNA and their

targets were estimated using a Pearson correlation test, and the graphs were constructed using the ggplot2 R package [119].

4.8. Genes and miRNAs Validation by qPCR

For qPCR validation, we selected genes and miRNAs from the molecular networks which showed better MFE values of hybridization. We used cultured pacu myotubes kept in free amino acid medium, treated with amino acids or IGF1, as described (in vitro samples; $n = 4$), and pacu skeletal muscles before fasting, after 4 days of fasting and 3 days of re-feeding (in vivo samples; $n = 6$). Extracted RNA was treated with DNase I, Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to eliminate any possible contaminating genomic DNA from the samples, and reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For miRNA expression, each cDNA was amplified using the TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the TaqMan[®] MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which contains primers and specific probes to *miR-29b*, *miR-338-5p* and *U6 snRNA* (*U6 small nuclear RNA*). For the *marcksb* (*myristoylated alanine rich protein kinase C substrate b*), *mycn* (*n-myc proto-oncogene protein*), *mmp14b* (*matrix metalloproteinase 14b*), *fbxo25* (*f-box protein 25*), *tgfbr2* (*tgf-beta receptor type-2*), *ppia* (*peptidylprolyl isomerase a*) and *rpl13* (*ribosomal protein l13*) mRNAs, each cDNA was amplified using the GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) and primers synthesized by Exxtend (Paulinia, Brazil). The primers were designed to work at 60 °C and amplify 50–200 bp regions, expanding exon–exon boundaries when possible, using Primer3 [120]. Potential hairpins, self-dimers or cross-dimers were estimated using NetPrimer software (Premier Biosoft, San Francisco, CA, USA). All qPCR were compliant with the Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time (MIQE) guidelines [121]. The reactions were performed in duplicate, with the following conditions: 95 °C 10 min, 40 cycles at 95 °C 15 s and 65 °C 1 min, in a QuantStudio[™] 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Primer specificity was confirmed by the presence of a single-peak dissociation curve. Relative expression was estimated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [122]. The *U6 snRNA*, *ppia* and *rpl13* were selected for the normalization of expression after their stability was tested through geNorm software [123]. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 Software, as well as the construction of graphs. After a Kolmogorov–Smirnov normality test, parametric data were further analyzed by a one-way ANOVA test, followed by Tukey's multiple comparisons test, while non-parametric data were analyzed by Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test. In addition, we used the fold-change values (both in vitro and in vivo experiments) to analyze and confirm the correlation between *marcksb/miR-29b* and *mmp14b/miR-338-5p*. Correlation index and statistical significance between miRNA and their targets were estimated using a Pearson correlation test, and the graphs were constructed using the ggplot2 R package [119].

5. Conclusions

We obtained transcriptomic and microRNAomic data from pacu-cultured myotubes submitted to AA and IGF1 treatments. These pro-growth inputs modulated different sets of genes, and AA seems to be more effective, giving the higher number of differentially expressed genes and miRNAs. In addition, AA treatment enriched processes related to chromosomal alteration/cell mitosis and muscle differentiation, while IGF1 modulated upstream PI3K signaling, and needed to stimulate amino acids metabolism to induce muscle growth. The AA samples also showed the up-regulation of muscle-specific miRNAs, which appeared to be involved in myogenic events, especially *miR-1*, *-133* and *-206*.

In addition, both AA and IGF1 down-regulated *igfbp1a* and up-regulated *igfbp5a*, interesting genes, of which the transcriptions are modulated independently of the growth treatment. These genes represent potential molecular markers and excellent candidates to be evaluated in different conditions of muscle growth, including the gain and/or loss of function assays and other customized molecular techniques. Moreover, we identified

networks linking *marcksb* and *miR-29b* in AA myotubes, and *mmp14b* and *miR-338-5p* in IGF1-treated cells. These genes and miRNAs were involved in fish myogenesis and muscle growth, and could influence the way in which AA and IGF1 inputs regulate muscle physiology and metabolism.

Our results allowed the better understanding and new insights of fish muscle growth regulation by important pro-growth inputs. Together, these findings may support future research and contribute to improvements in aquaculture programs, aiming to increase muscle mass, enhance growth rate, and/or better feed conversion efficiency, as well as background information for the development and advancement of in vitro meat production.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23031180/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, B.O.S.D., B.T.T.Z., M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; methodology, B.O.S.D., B.T.T.Z., E.S.P., E.A.M., J.B. and D.G.d.l.s.; validation, B.O.S.D., B.T.T.Z. and E.S.P.; formal analysis, B.O.S.D., B.T.T.Z., E.S.P., E.A.M., J.B. and D.G.d.l.s.; investigation, B.O.S.D., B.T.T.Z. and E.S.P.; resources, J.B., M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; data curation, B.O.S.D., B.T.T.Z., M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; writing—original draft preparation, B.O.S.D., B.T.T.Z., E.S.P., M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; writing—review and editing, B.O.S.D., B.T.T.Z., E.S.P., E.A.M., J.B., M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; visualization, B.O.S.D., B.T.T.Z., E.S.P., M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; supervision, M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; project administration, M.D.-P.-S. and D.G.d.l.s.; funding acquisition, B.O.S.D. and M.D.-P.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (<https://fapesp.br/>, accessed on 18 August 2020), grant numbers #2018/24575-6 and #2018/26428-0. This study was also financed by the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; CNPq), grant numbers #306678/2021-7 and #403305/2021-7, and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES)–Finance Code 001, grant number #88887.482392/2020-00. Funding was granted to B.O.S.D., B.T.T.Z. and M.D.-P.-S. D.G.d.l.s. is a Serra Húnter Tenure Track Lecturer.

Institutional Review Board Statement: All experiments and procedures were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu (protocol number 1184; 14 June 2019) and of the Federal University of Goiás (UFG), Goiânia (protocol number MB 026/21; 20 April 2021).

Data Availability Statement: The raw and processed data of transcriptome and microRNAome analyses have been deposited on the Gene Expression Omnibus (GEO) DataSets, under the accession number GSE192683. All the produced data of the other analysis are contained within this article, or in the supplementary material.

Acknowledgments: We would like to thank the Institute of Biosciences at the São Paulo State University (UNESP), Botucatu, to host the present research in its laboratory facilities. We also thank Bruno Evaristo de Almeida Fantinatti for his valuable discussions. Daniel Garcia de la serrana is a Serra Húnter Tenure Track Lecturer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Johnston, I.A. Genetic and Environmental Determinants of Muscle Growth Patterns. In *Muscle Development and Growth*; Johnston, I.A., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2001; pp. 141–186.
2. Sanger, A.M.; Stoiber, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In *Muscle Development and Growth*; Johnston, I.A., Ed.; Fish Physiology; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2001; pp. 187–250.
3. Johnston, I.A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.* **2006**, *209*, 2249–2264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sandri, M. Signaling in Muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology* **2008**, *23*, 160–170. [[CrossRef](#)]
5. Bonaldo, P.; Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* **2013**, *6*, 25–39. [[CrossRef](#)]

6. Glass, D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 1974–1984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Johnston, I.A.; Bower, N.I.; Macqueen, D.J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J. Exp. Biol.* **2011**, *214*, 1617–1628. [[CrossRef](#)]
8. Jiao, S.; Ren, H.; Li, Y.; Zhou, J.; Duan, C.; Lu, L. Differential regulation of IGF-I and IGF-II gene expression in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *373*, 107–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Lawlor, M.A.; Rotwein, P. Coordinate control of muscle cell survival by distinct insulin-like growth factor activated signaling pathways. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 1131–1140. [[CrossRef](#)]
10. Zanou, N.; Gailly, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: Interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70*, 4117–4130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Seiliez, I.; Gabillard, J.-C.; Skiba-Cassy, S.; Garcia, S.D.; Gutierrez, J.; Kaushik, S.; Panserat, S.; Tesseraud, S. An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2008**, *295*, R329–R335. [[CrossRef](#)]
12. Vélez, E.J.; Lutfi, E.; Jiménez-Amilburu, V.; Riera-Codina, M.; Capilla, E.; Navarro, I.; Gutiérrez, J. IGF-I and amino acids effects through TOR signaling on proliferation and differentiation of gilthead sea bream cultured myocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, *205*, 296–304. [[CrossRef](#)]
13. Bower, N.I.; Johnston, I.A. Transcriptional regulation of the IGF signaling pathway by amino acids and insulin-like growth factors during myogenesis in Atlantic salmon. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11100. [[CrossRef](#)]
14. Garcia, S.D.; Johnston, I.A. Expression of Heat Shock Protein (Hsp90) Paralogues Is Regulated by Amino Acids in Skeletal Muscle of Atlantic Salmon. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74295. [[CrossRef](#)]
15. Bizuayehu, T.T.; Babiak, I. MicroRNA in Teleost Fish. *Genome Biol. Evol.* **2014**, *6*, 1911–1937. [[CrossRef](#)]
16. Ge, Y.; Chen, J. MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 441–448. [[CrossRef](#)]
17. Bartel, D.P.; Chen, C.-Z. Micromanagers of gene expression: The potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 396–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Filipowicz, W.; Bhattacharyya, S.N.; Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 102–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Goljanek-Whysall, K.; Sweetman, D.; Münsterberg, A.E. microRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clin. Sci.* **2012**, *123*, 611–625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. van Rooij, E.; Liu, N.; Olson, E.N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* **2008**, *24*, 159–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Biyashev, D.; Veliceasa, D.; Topczewski, J.; Topczewska, J.M.; Mizgirev, I.; Vinokour, E.; Reddi, A.L.; Licht, J.D.; Revskoy, S.Y.; Volpert, O.V. miR-27b controls venous specification and tip cell fate. *Blood* **2012**, *119*, 2679–2687. [[CrossRef](#)]
22. Flynt, A.S.; Thatcher, E.J.; Burkewitz, K.; Li, N.; Liu, Y.; Patton, J.G. miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *J. Cell Biol.* **2009**, *185*, 115–127. [[CrossRef](#)]
23. Giraldez, A.J.; Mishima, Y.; Rihel, J.; Grocock, R.J.; Van Dongen, S.; Inoue, K.; Enright, A.J.; Schier, A.F. Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. *Science* **2006**, *312*, 75–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Huang, C.W.; Li, Y.H.; Hu, S.Y.; Chi, J.R.; Lin, G.H.; Lin, C.C.; Gong, H.Y.; Chen, J.Y.; Chen, R.H.; Chang, S.J.; et al. Differential expression patterns of growth-related microRNAs in the skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 4266–4279. [[CrossRef](#)]
25. Staton, A.A.; Knaut, H.; Giraldez, A.J. miRNA regulation of Sdf1 chemokine signaling provides genetic robustness to germ cell migration. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 204–211. [[CrossRef](#)]
26. Wienholds, E.; Kloosterman, W.P.; Miska, E.; Alvarez-Saavedra, E.; Berezikov, E.; de Bruijn, E.; Horvitz, H.R.; Kauppinen, S.; Plasterk, R.H.A. MicroRNA Expression in Zebrafish Embryonic Development. *Science* **2005**, *309*, 310–311. [[CrossRef](#)]
27. Yan, B.; Guo, J.-T.; Zhao, L.-H.; Zhao, J.-L. microRNA expression signature in skeletal muscle of Nile tilapia. *Aquaculture* **2012**, *364–365*, 240–246. [[CrossRef](#)]
28. Yin, V.P.; Thomson, J.M.; Thummel, R.; Hyde, D.R.; Hammond, S.M.; Poss, K.D. Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 728–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chen, J.-F.; Mandel, E.M.; Thomson, J.M.; Wu, Q.; Callis, T.E.; Hammond, S.M.; Conlon, F.L.; Wang, D.-Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 228–233. [[CrossRef](#)]
30. Chen, J.-F.; Tao, Y.; Li, J.; Deng, Z.; Yan, Z.; Xiao, X.; Wang, D.-Z. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* **2010**, *190*, 867–879. [[CrossRef](#)]
31. McCarthy, J.J. The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **2011**, *39*, 150–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. van Rooij, E.; Quiat, D.; Johnson, B.A.; Sutherland, L.B.; Qi, X.; Richardson, J.A.; Kelm, R.J.; Olson, E.N. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 662–673. [[CrossRef](#)]
33. Bower, N.I.; Johnston, I.A. Paralogs of Atlantic salmon myoblast determination factor genes are distinctly regulated in proliferating and differentiating myogenic cells. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *298*, R1615–R1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Duran, B.O.S.; Fernandez, G.J.; Mareco, E.A.; Moraes, L.N.; Salomão, R.A.S.; Gutierrez de Paula, T.; Santos, V.B.; Carvalho, R.F.; Dal-Pai-Silva, M. Differential microRNA Expression in Fast- and Slow-Twitch Skeletal Muscle of *Piaractus mesopotamicus* during Growth. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0141967. [[CrossRef](#)]

35. Duran, B.O.S.; Góes, G.A.; Zanella, B.T.T.; Freire, P.P.; Valente, J.S.; Salomão, R.A.S.; Fernandes, A.; Mareco, E.A.; Carvalho, R.F.; Dal-Pai-Silva, M. Ascorbic acid stimulates the in vitro myoblast proliferation and migration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Duran, B.O.S.; Dal-Pai-Silva, M.; Garcia, S.D. Rainbow trout slow myoblast cell culture as a model to study slow skeletal muscle, and the characterization of mir-133 and mir-499 families as a case study. *J. Exp. Biol.* **2020**, *223*, jeb216390. [[CrossRef](#)]
37. Froehlich, J.M.; Galt, N.J.; Charging, M.J.; Meyer, B.M.; Biga, P.R. In vitro indeterminate teleost myogenesis appears to be dependent on Pax3. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2013**, *49*, 371–385. [[CrossRef](#)]
38. Gabillard, J.C.; Sabin, N.; Paboeuf, G. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell Tissue Res.* **2010**, *342*, 471–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Garcia, S.D.; Codina, M.; Capilla, E.; Jiménez-Amilburu, V.; Navarro, I.; Du, S.-J.; Johnston, I.A.; Gutiérrez, J. Characterisation and expression of myogenesis regulatory factors during in vitro myoblast development and in vivo fasting in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2014**, *167*, 90–99. [[CrossRef](#)]
40. Seiliez, I.; Sabin, N.; Gabillard, J.-C. Myostatin inhibits proliferation but not differentiation of trout myoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *351*, 220–226. [[CrossRef](#)]
41. Vélez, E.J.; Lutfi, E.; Azizi, S.; Montserrat, N.; Riera-Codina, M.; Capilla, E.; Navarro, I.; Gutiérrez, J. Contribution of in vitro myocytes studies to understanding fish muscle physiology. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *199*, 67–73. [[CrossRef](#)]
42. Zanella, B.T.T.; Magiore, I.C.; Duran, B.O.S.; Pereira, G.G.; Vicente, I.S.T.; Carvalho, P.L.P.F.; Salomão, R.A.S.; Mareco, E.A.; Carvalho, R.F.; Gutierrez de Paula, T.; et al. Ascorbic acid supplementation improves skeletal muscle growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles: In vivo and in vitro studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2995. [[CrossRef](#)]
43. Castillo, J.; Codina, M.; Martínez, M.L.; Navarro, I.; Gutiérrez, J. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2004**, *286*, R935–R941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cleveland, B.M.; Weber, G.M. Effects of insulin-like growth factor-I, insulin, and leucine on protein turnover and ubiquitin ligase expression in rainbow trout primary myocytes. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2010**, *298*, R341–R350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Latimer, M.; Sabin, N.; Cam, A.L.; Seiliez, I.; Biga, P.; Gabillard, J.C. miR-210 expression is associated with methionine-induced differentiation of trout satellite cells. *J. Exp. Biol.* **2017**, *220*, 2932–2938. [[CrossRef](#)]
46. Qian, X.; Ba, Y.; Zhuang, Q.; Zhong, G. RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. *Omi. A J. Integr. Biol.* **2014**, *18*, 98–110. [[CrossRef](#)]
47. Amaral, I.P.G.; Johnston, I.A. Insulin-like growth factor (IGF) signalling and genome-wide transcriptional regulation in fast muscle of zebrafish following a single-satiating meal. *J. Exp. Biol.* **2011**, *214*, 2125–2139. [[CrossRef](#)]
48. Bower, N.I.; Garcia, S.D.; Johnston, I.A. Characterisation and differential regulation of MAFbx/Atrogin-1 α and β transcripts in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 265–271. [[CrossRef](#)]
49. Garcia, S.D.; Vieira, V.L.A.; Andree, K.B.; Darias, M.; Estévez, A.; Gisbert, E.; Johnston, I.A. Development Temperature Has Persistent Effects on Muscle Growth Responses in Gilthead Sea Bream. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51884. [[CrossRef](#)]
50. Seiliez, I.; Médale, F.; Aguirre, P.; Larquier, M.; Lanneretonne, L.; Alami-Durante, H.; Panserat, S.; Skiba-Cassy, S. Postprandial regulation of growth- and metabolism-related factors in zebrafish. *Zebrafish* **2013**, *10*, 237–248. [[CrossRef](#)]
51. Almeida, F.L.A.; Pessotti, N.S.; Pinhal, D.; Padovani, C.R.; de Leitão, N.J.; Carvalho, R.F.; Martins, C.; Portella, M.C.; Dal Pai-Silva, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron* **2010**, *41*, 997–1004. [[CrossRef](#)]
52. Ganassi, M.; Badodi, S.; Quiroga, H.P.O.; Zammit, P.S.; Hinits, Y.; Hughes, S.M. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Johansen, K.A.; Overturf, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* **2005**, *7*, 576–587. [[CrossRef](#)]
54. Zammit, P.S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *72*, 19–32. [[CrossRef](#)]
55. Amri, M.E.; Fitzgerald, U.; Schlosser, G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration. *J. Biomed. Sci.* **2018**, *25*, 43. [[CrossRef](#)]
56. Disatnik, M.H.; Boutet, S.C.; Pacio, W.; Chan, A.Y.; Ross, L.B.; Lee, C.H.; Rando, T.A. The bi-directional translocation of MARCKS between membrane and cytosol regulates integrin-mediated muscle cell spreading. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4469–4479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kim, S.S.; Kim, J.H.; Kim, H.S.; Park, D.E.; Chung, C.H. Involvement of the theta-type protein kinase C in translocation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) during myogenesis of chick embryonic myoblasts. *Biochem. J.* **2000**, *347*, 139. [[CrossRef](#)]
58. Kim, S.S.; Kim, J.H.; Lee, S.H.; Chung, S.S.; Bang, O.S.; Park, D.; Chung, C.H. Involvement of protein phosphatase-1-mediated MARCKS translocation in myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 2465–2473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Ott, L.E.; Mcdowell, Z.T.; Turner, P.M.; Law, J.M.; Adler, K.B.; Yoder, J.A.; Jones, S.L. Two myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) paralogs are required for normal development in zebrafish. *Anat. Rec.* **2011**, *294*, 1511–1524. [[CrossRef](#)]

60. Poussard, S.; Dulong, S.; Aragon, B.; Brustis, J.J.; Veschambre, P.; Ducastaing, A.; Cottin, P. Evidence for a MARCKS-PKAlpha complex in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 711–721. [[CrossRef](#)]
61. Lund, D.K.; Mouly, V.; Cornelison, D.D.W. MMP-14 is necessary but not sufficient for invasion of three-dimensional collagen by human muscle satellite cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *307*, C140–C149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ohtake, Y.; Tojo, H.; Seiki, M. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3822–3832. [[CrossRef](#)]
63. Snyman, C.; Niesler, C.U. MMP-14 in skeletal muscle repair. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2015**, *36*, 215–225. [[CrossRef](#)]
64. Taylor, S.H.; Yeung, C.Y.C.; Kalson, N.S.; Lu, Y.; Zigrino, P.; Starborg, T.; Warwood, S.; Holmes, D.F.; Canty-Laird, E.G.; Mauch, C.; et al. Matrix metalloproteinase 14 is required for fibrous tissue expansion. *Elife* **2015**, *4*, e09345. [[CrossRef](#)]
65. Castillo, J.; Ammendrup-Johnsen, I.; Codina, M.; Navarro, I.; Gutiérrez, J. IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2006**, *290*, R1683–R1690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Díaz, M.; Vraskou, Y.; Gutiérrez, J.; Planas, J.V. Expression of rainbow trout glucose transporters GLUT1 and GLUT4 during in vitro muscle cell differentiation and regulation by insulin and IGF-I. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **2009**, *296*, R794–R800. [[CrossRef](#)]
67. Seiliez, I.; Gabillard, J.C.; Riflade, M.; Sadoul, B.; Dias, K.; Avérous, J.; Tesseraud, S.; Skiba, S.; Panserat, S. Amino acids downregulate the expression of several autophagy-related genes in rainbow trout myoblasts. *Autophagy* **2012**, *8*, 364–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Vélez, E.J.; Azizi, S.; Verheyden, D.; Salmerón, C.; Lutfi, E.; Sánchez-Moya, A.; Navarro, I.; Gutiérrez, J.; Capilla, E. Proteolytic systems' expression during myogenesis and transcriptional regulation by amino acids in gilthead sea bream cultured muscle cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187339. [[CrossRef](#)]
69. Cleveland, B.M.; Radler, L.M. Essential amino acids exhibit variable effects on protein degradation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2019**, *229*, 33–39. [[CrossRef](#)]
70. Azizi, S.; Nematollahi, M.A.; Amiri, B.M.; Vélez, E.J.; Lutfi, E.; Navarro, I.; Capilla, E.; Gutiérrez, J. Lysine and Leucine Deficiencies Affect Myocytes Development and IGF Signaling in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147618. [[CrossRef](#)]
71. Garcia, S.D.; Fuentes, E.N.; Martin, S.A.M.; Johnston, I.A.; Macqueen, D.J. Divergent regulation of insulin-like growth factor binding protein genes in cultured Atlantic salmon myotubes under different models of catabolism and anabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2017**, *247*, 53–65. [[CrossRef](#)]
72. Garcia, S.D.; Macqueen, D.J. Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins of Teleost Fishes. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 1. [[CrossRef](#)]
73. Kajimura, S.; Duan, C. Insulin-like growth factor-binding protein-1: An evolutionarily conserved fine tuner of insulin-like growth factor action under catabolic and stressful conditions. *J. Fish Biol.* **2007**, *71*, 309–325. [[CrossRef](#)]
74. Kamei, H.; Lu, L.; Jiao, S.; Li, Y.; Gyrupe, C.; Laursen, L.S.; Oxvig, C.; Zhou, J.; Duan, C. Duplication and diversification of the hypoxia-inducible IGFBP-1 gene in zebrafish. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3091. [[CrossRef](#)]
75. Maures, T.J.; Duan, C. Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology* **2002**, *143*, 2722–2731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Rolland, M.; Dalsgaard, J.; Holm, J.; Gómez-Requeni, P.; Skov, P.V. Dietary methionine level affects growth performance and hepatic gene expression of GH-IGF system and protein turnover regulators in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed plant protein-based diets. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *181*, 33–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Breves, J.P.; Fujimoto, C.K.; Phipps-Costin, S.K.; Einarsdottir, I.E.; Björnsson, B.T.; McCormick, S.D. Variation in branchial expression among insulin-like growth-factor binding proteins (igfbps) during Atlantic salmon smoltification and seawater exposure. *BMC Physiol.* **2017**, *17*, 2. [[CrossRef](#)]
78. Dai, W.; Bai, Y.; Hebda, L.; Zhong, X.; Liu, J.; Kao, J.; Duan, C. Calcium deficiency-induced and TRP channel-regulated IGF1R-PI3K-Akt signaling regulates abnormal epithelial cell proliferation. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 568–581. [[CrossRef](#)]
79. Kusakabe, M.; Ishikawa, A.; Ravinet, M.; Yoshida, K.; Makino, T.; Toyoda, A.; Fujiyama, A.; Kitano, J. Genetic basis for variation in salinity tolerance between stickleback ecotypes. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 304–319. [[CrossRef](#)]
80. Azizi, S.; Nematollahi, M.A.; Amiri, B.M.; Vélez, E.J.; Salmerón, C.; Chan, S.J.; Navarro, I.; Capilla, E.; Gutiérrez, J. IGF-I and IGF-II effects on local IGF system and signaling pathways in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured myocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2016**, *232*, 7–16. [[CrossRef](#)]
81. Wood, A.W.; Duan, C.; Bern, H.A. Insulin-Like Growth Factor Signaling in Fish. *Int. Rev. Cytol.* **2005**, *243*, 215–285. [[CrossRef](#)]
82. Glass, D.J. PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2010**, *346*, 267–278. [[CrossRef](#)]
83. Kim, E. Mechanisms of amino acid sensing in mTOR signaling pathway. *Nutr. Res. Pract.* **2009**, *3*, 64. [[CrossRef](#)]
84. Meijer, A.J. Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2057S–2062S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Hitachi, K.; Tsuchida, K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front. Physiol.* **2014**, *4*, 408. [[CrossRef](#)]
86. Wang, X.H. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2013**, *16*, 258–266. [[CrossRef](#)]
87. Nachtigall, P.G.; Dias, M.C.; Carvalho, R.F.; Martins, C.; Pinhal, D. MicroRNA-499 expression distinctively correlates to target genes sox6 and rod1 profiles to resolve the skeletal muscle phenotype in Nile tilapia. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119804. [[CrossRef](#)]
88. Wang, X.; Ono, Y.; Tan, S.C.; Chai, R.J.; Parkin, C.; Ingham, P.W. Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development* **2011**, *138*, 4399–4404. [[CrossRef](#)]

89. Yarmola, E.G.; Edison, A.S.; Lenox, R.H.; Bubb, M.R. Actin Filament Cross-linking by MARCKS: Characterization of two actin-binding sites within the phosphorylation site domain. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22351–22358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Li, J.; Chan, M.C.; Yu, Y.; Bei, Y.; Chen, P.; Zhou, Q.; Cheng, L.; Chen, L.; Ziegler, O.; Rowe, G.C.; et al. miR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–15. [[CrossRef](#)]
91. Li, J.; Wang, L.; Hua, X.; Tang, H.; Chen, R.; Yang, T.; Das, S.; Xiao, J. CRISPR/Cas9-Mediated miR-29b Editing as a Treatment of Different Types of Muscle Atrophy in Mice. *Mol. Ther.* **2020**, *28*, 1359–1372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Pandey, P.R.; Chatterjee, B.; Olanich, M.E.; Khan, J.; Miettinen, M.M.; Hewitt, S.M.; Barr, F.G. PAX3-FOXO1 is essential for tumour initiation and maintenance but not recurrence in a human myoblast model of rhabdomyosarcoma. *J. Pathol.* **2017**, *241*, 626–637. [[CrossRef](#)]
93. Lei, D.; Zhang, F.; Yao, D.; Xiong, N.; Jiang, X.; Zhao, H. MiR-338-5p suppresses proliferation, migration, invasion, and promote apoptosis of glioblastoma cells by directly targeting EFEMP1. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *89*, 957–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Nielsen, S.; Åkerström, T.; Rinnov, A.; Yfanti, C.; Scheele, C.; Pedersen, B.K.; Laye, M.J. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87308. [[CrossRef](#)]
95. Tacchi, L.; Bickerdike, R.; Secombes, C.J.; Pooley, N.J.; Urquhart, K.L.; Collet, B.; Martin, S.A.M. Ubiquitin E3 ligase atrogin-1 (Fbx-32) in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Sequence analysis, genomic structure and modulation of expression. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *157*, 364–373. [[CrossRef](#)]
96. Gutierrez de Paula, T.; Zanella, B.T.T.; De Almeida Fantinatti, B.E.; De Moraes, L.N.; Duran, B.O.S.; De Oliveira, C.B.; Salomão, R.A.S.; Da Silva, R.N.; Padovani, C.R.; Dos Santos, V.B.; et al. Food restriction increase the expression of mTORC1 complex genes in the skeletal muscle of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177679. [[CrossRef](#)]
97. Cleveland, B.M.; Weber, G.M. Effects of triploidy on growth and protein degradation in skeletal muscle during recovery from feed deprivation in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2013**, *166*, 128–137. [[CrossRef](#)]
98. Dal-Pai-Silva, M.; Zanella, B.T.T.; Duran, B.O.S.; Almeida, F.L.A.; Mareco, E.A.; de Paula, T.G. Cellular and molecular features of skeletal muscle growth and plasticity. In *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*; Baldisserotto, B., Urbinati, E.C., Cyrino, J.E.P., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 163–183.
99. Massagué, J. How cells read TGF- β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 169–178. [[CrossRef](#)]
100. Ding, Z.; Lin, J.; Sun, Y.; Cong, S.; Liu, S.; Zhang, Y.; Chen, Q.; Chen, J. miR-122-5p negatively regulates the transforming growth factor- β /Smad signaling pathway in skeletal muscle myogenesis. *Cell Biochem. Funct.* **2020**, *38*, 231–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Accornero, F.; Kanisicak, O.; Tjondrokoesoemo, A.; Attia, A.C.; McNally, E.M.; Molkenin, J.D. Myofiber-specific inhibition of TGF β signaling protects skeletal muscle from injury and dystrophic disease in mice. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 6903–6915. [[CrossRef](#)]
102. Kilkenny, C.; Browne, W.J.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000412. [[CrossRef](#)]
103. Fauconneau, B.; Paboef, G. Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.* **2000**, *301*, 459–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)]
105. Grabherr, M.G.; Haas, B.J.; Yassour, M.; Levin, J.Z.; Thompson, D.A.; Amit, I.; Adiconis, X.; Fan, L.; Raychowdhury, R.; Zeng, Q.; et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 644–652. [[CrossRef](#)]
106. Haas, B.J.; Papanicolaou, A.; Yassour, M.; Grabherr, M.; Blood, P.D.; Bowden, J.; Couger, M.B.; Eccles, D.; Li, B.; Lieber, M.; et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1494–1512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [[CrossRef](#)]
108. Langmead, B.; Salzberg, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 357–359. [[CrossRef](#)]
109. Anders, S.; McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Okoniewski, M.; Smyth, G.K.; Huber, W.; Robinson, M.D. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1765–1786. [[CrossRef](#)]
110. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Starruß, J.; de Back, W.; Bruschi, L.; Deutsch, A. Morpheus: A user-friendly modeling environment for multiscale and multicellular systems biology. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1331–1332. [[CrossRef](#)]
112. Chen, E.Y.; Tan, C.M.; Kou, Y.; Duan, Q.; Wang, Z.; Meirelles, G.; Clark, N.R.; Ma'ayan, A. Enrichr: Interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinform.* **2013**, *14*, 128. [[CrossRef](#)]
113. Kuleshov, M.V.; Jones, M.R.; Rouillard, A.D.; Fernandez, N.F.; Duan, Q.; Wang, Z.; Koplev, S.; Jenkins, S.L.; Jagodnik, K.M.; Lachmann, A.; et al. Enrichr: A comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W90–W97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Ulitsky, I.; Shkumatava, A.; Jan, C.H.; Subtelny, A.O.; Koppstein, D.; Bell, G.W.; Sive, H.; Bartel, D.P. Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development. *Genome Res.* **2012**, *22*, 2054–2066. [[CrossRef](#)]

115. Cline, M.S.; Smoot, M.; Cerami, E.; Kuchinsky, A.; Landys, N.; Workman, C.; Christmas, R.; Avila-Campilo, I.; Creech, M.; Gross, B.; et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2366–2382. [[CrossRef](#)]
116. Montojo, J.; Zuberi, K.; Rodriguez, H.; Kazi, F.; Wright, G.; Donaldson, S.L.; Morris, Q.; Bader, G.D. GeneMANIA Cytoscape plugin: Fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2927–2928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Huang, Z.; Teeling, E.C. ExUTR: A novel pipeline for large-scale prediction of 3'-UTR sequences from NGS data. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Krüger, J.; Rehmsmeier, M. RNAhybrid: MicroRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W451–W454. [[CrossRef](#)]
119. Wickham, H. *Ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016.
120. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 611–622. [[CrossRef](#)]
122. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
123. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, research0034.1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Conclusões gerais

Neste trabalho, caracterizamos molecularmente células musculares *in vitro* de pacu e destacamos as principais discrepâncias desse modelo experimental em relação ao tecido *in vivo*. Além disso, aplicamos esse modelo na avaliação do mecanismo de ação dos fatores pró-crescimento Igfl e aminoácidos.

Quanto ao capítulo I, observamos que as principais diferenças moleculares entre os modelos *in vitro* e *in vivo* foram relacionadas à proliferação e diferenciação celular, estabelecimento de matriz extracelular e comunicação célula-célula, sendo estes processos mais enriquecidos no modelo *in vitro*, e processos de obtenção de energia, sendo que no modelo *in vivo* esses processos foram mais diversos. Ainda, foi possível identificar possíveis processos de comunicação entre o músculo esquelético e outros tecidos que podem ser afetados molecularmente a partir do isolamento e cultivo das células musculares de pacu em cultura. Nossos dados permitem delinear estratégias que possam garantir o sucesso do modelo *in vitro* e aproximá-lo do modelo *in vivo*, além de elucidar e caracterizar o perfil molecular do músculo esquelético de peixes tanto especificamente da célula muscular como do tecido muscular como um todo, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novos artifícios para maximizar a produção na aquicultura de forma sustentável.

Quanto ao capítulo II, observamos que os aminoácidos tiveram um efeito direto e terminal no crescimento muscular, estimulando processos de proliferação e diferenciação das células musculares, enquanto o tratamento com Igfl teve um efeito inicial e indireto, estimulando a síntese de proteínas e componentes de sua própria via de sinalização. Ainda, identificamos genes chaves modulados por esses fatores pró-crescimento que podem ser utilizados futuramente como possíveis marcadores moleculares da modulação do crescimento muscular por fatores específicos.

Em conjunto, os achados obtidos reforçam a importância da cultura de células *in vitro* como ferramenta para o estudo do músculo esquelético de peixes, destacando as possíveis limitações e vieses do modelo. Ademais, nossos dados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para melhor manutenção de células musculares de peixes, o que pode ser aplicado na produção de carne desses animais em ambiente *in vitro* e na melhoria e maximização dos processos e produção em aquicultura

7. Apêndice – atividades complementares

7.1. Artigos publicados

Mareco EA, de la Serrana DG, de Paula TG, **Zanella BTT**, da Silva Duran BO, Salomão RAS, de Almeida Fantinatti BE, de Oliveira VHG, Dos Santos VB, Carvalho RF, Dal-Pai-Silva M. Transcriptomic insight into the hybridization mechanism of the Tambacu, a hybrid from *Colossoma macropomum* (Tambaqui) and *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 2023; 45:101041. doi: 10.1016/j.cbd.2022.101041.

de Paula TG, **Zanella BTT**, de Moraes LN, Valente JS, Nascimento-Oliveira JI, Mareco EA, Fernandez GJ, Dal-Pai-Silva M. Degree of piRNA sharing and Piwi gene expression in the skeletal muscle of *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Colossoma macropomum* (tambaqui), and the hybrid tambacu. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2022; 264:111120. doi: 10.1016/j.cbpa.2021.111120.

Duran BOS*, **Zanella BTT***, Perez ES, Mareco EA, Blasco J, Dal-Pai-Silva M, Garcia de la Serrana D. Amino Acids and IGF1 Regulation of Fish Muscle Growth Revealed by Transcriptome and microRNAome Integrative Analyses of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Myotubes. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(3):1180. doi: 10.3390/ijms23031180. *mesmo nível de contribuição.

Perez ÉS, Cury SS, **Zanella BTT**, Carvalho RF, Duran BOS, Dal-Pai-Silva M. Identification of Novel Genes Associated with Fish Skeletal Muscle Adaptation during Fasting and Refeeding Based on a Meta-Analysis. *Genes (Basel)*. 2022; 13(12):2378. doi: 10.3390/genes13122378.

Zanella BTT, Magiore IC, Duran BOS, Pereira GG, Vicente IST, Carvalho PLPF, Salomão RAS, Mareco EA, Carvalho RF, Paula TG, Barros MM, Dal-Pai-Silva M. Ascorbic Acid Supplementation Improves Skeletal Muscle Growth in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) Juveniles: In Vivo and In Vitro Studies. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(6):2995. doi: 10.3390/ijms22062995.

Fantinatti BEA, Perez ES, **Zanella BTT**, Valente JS, de Paula TG, Mareco EA, Carvalho RF, Piazza S, Denti MA, Dal-Pai-Silva M. Integrative microRNAome analysis of skeletal muscle of *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Piaractus mesopotamicus* (pacu), and the hybrid tambacu, based on next-generation sequencing data. *BMC Genomics*. 2021; 22(1):237. doi: 10.1186/s12864-021-07513-5.

Valente JS, Perez ÉS, **Zanella BTT**, Gutierrez de Paula T, Alcantara Dos Santos SA, Duran BOS, Carvalho RF, Justulin LA, de Almeida Fantinatti BE, Dal-Pai-Silva M. Maternal protein restriction changes structural and metabolic gene expression in the skeletal muscle of aging offspring rats. *Histol Histopathol.* 2021; 36(8):853-867. doi: 10.14670/HH-18-337.

Duran BOS, Garcia de la Serrana D, **Zanella BTT**, Perez ES, Mareco EA, Santos VB, Carvalho RF, Dal-Pai-Silva M. An insight on the impact of teleost whole genome duplication on the regulation of the molecular networks controlling skeletal muscle growth. *PLoS One.* 2021;16(7):e0255006. doi: 10.1371/journal.pone.0255006

Perez ES, Duran BOS, **Zanella BTT**, Dal-Pai-Silva M., 2023. Understanding fish muscle biology in indeterminate growth species: pacu (*Piaractus mesopotamicus*), as a model. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*; 285:111502. doi: 10.1016/j.cbpa.2023.111502.

7.2. Artigos submetidos – em revisão

Valente JS, Colombelli K, Pereira LL, Perez ES, **Zanella BTT**, Delgado A, Bosqueiro JR, Padovani CR, Vechetti IV, Damasceno DC, Justulin LA, Dal-Pai-Silva M. Aerobic exercise attenuates changes in skeletal muscle glycolysis metabolism and glycogen content in offspring rats submitted to a maternal low protein diet – submetido para a revista *Life Sciences*.

7.3. Formação complementar

2021 - Docência no ensino superior: fundamentos e práticas pedagógicas. - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

2020 - Speaking to inform: Discussing complex ideas with clear explanations. - University of Washington.

2020 - Data Science Toolbox. - Johns Hopkins University.

2020 - Preparo e Padronização de Soluções Químicas. - Instituto de Biociências de Botucatu.

7.4. Participação em projetos de extensão

2022 - Descomplicando: da célula ao organismo animal

2022 – Cursinho pré-vestibular Athena

7.5. Atividades didáticas

2021 – 2022 Estágio docência realizado na disciplina de Histologia Básica e Comparada do Curso de Graduação em Ciências Biológicas – Integral.

2022 – Aula ministrada para o curso de graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré: Extração de DNA e RNA, PCR, Eletroforese, Sequenciamento e Bioinformática.

2020 – Aula ministrada para o Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada: Cultura Celular de Mioblastos de Peixes.

7.6. Participação em comissões avaliadoras

2021 - Avaliação de trabalhos na modalidade Ciências Biológicas no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

2020 - Participação em banca de Victor Hugo Garcia de Oliveira. Caracterização do transcriptoma do músculo estriado esquelético de juvenis e adultos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Oeste Paulista.

2020 - Participação em banca de Pollyana Coelho dos Santos, Identificação de genes parálogos no transcriptoma do músculo estriado esquelético de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Oeste Paulista.

7.7. Coorientação de alunos

2018 – 2020 Isabele Cristina Magiore - Iniciação científica

2019 – 2022 Guilherme Gutierrez Pereira - Iniciação científica

2021 – atual Mirely Francine dos Santos Barbosa - Iniciação científica

2022 – 2023 Ana Carolina Souza Fria - Iniciação científica

2022 Thaynara Lima Cassineli - PIBIC EM

2021 Gustavo Ferreira da Silva - Capacitação em aquisição de competências específicas

2022 Victor Seiji Oyamada Capacitação em aquisição de competências específicas

7.8. Apresentação de trabalhos e participação em eventos científicos

2022 Gutierrez, G.P.; Pai-Silva, M.D.; Barbosa, M.F.S.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Identificação de genes associados ao crescimento do músculo esquelético de peixes a partir de meta-análise. Apresentação de Trabalho/Congresso – XXXIV CIC Unesp.

2022 Barbosa, M.F.S.; Pai-Silva, M.D.; Gutierrez, G.P.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Associação dos genes ribossomais com o crescimento e manutenção do músculo esquelético de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Apresentação de Trabalho/Congresso – XXXIV CIC Unesp.

2022 Perez, E.S.; **Zanella, B.T.T.**; Fantinatti, B.E.A.; Nóbrega, R.H., Duran, B.O.S.; Pai-Silva, M.D. Determinate and indeterminate muscle growth of fish: a transcriptomic approach. Apresentação de Trabalho/Congresso - XX Workshop de Genética.

2022 Brachmann, J.E.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S.; Serrana, D.G.; Dal-Pai-Silva, M.; Duran, B.O.S. Caracterização do transcriptoma e microRNAoma de células musculares do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com aminoácidos e IGF1. Apresentação de Trabalho/Congresso – 19º Conpeex.

2021 **Zanella, B.T.T.**; Duran, B.O.S.; Perez, E.S.; Mareco, E.A.; Dal-Pai-Silva, M. Transcriptional profile of fish isolated muscle cells treated with amino acids and Igfl. Apresentação de Trabalho/Congresso - XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology.

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

2021 **Zanella, B.T.T.**; Duran, B.O.S.; Perez, E.S.; Mareco, E.A.; Dal-Pai-Silva, M. Amino acids are more efficient than IGF1 in stimulating pathways of development and growth in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) muscle cells. Apresentação de Trabalho/Congresso - 9º Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes.

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

2021 **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S.; Duran, B.O.S.; Dal-Pai-Silva, M. Perfil transcricional de células musculares isoladas: caracterização em relação ao modelo in vivo. Apresentação de

Trabalho/Congresso - XXXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.

2021 Barbosa, M.F.S.; Pai-Silva, M.D.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Metabolismo glicolítico como preferência de células musculares em modelos in vitro. Apresentação de Trabalho/Congresso - XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

2021 Gutierrez, G.P.; Pai-Silva, M.D.; **Zanella, B.T.T.**; Perez, E.S. Meta-análise como ferramenta para identificação de alvos moleculares no músculo esquelético de peixes. Apresentação de Trabalho/Congresso - XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp.

2022 Participação como ouvinte no 2º Simpósio Brasileiro de Biologia Muscular.

2022 Participação como expositora no XIV Venha Conhecer o IB. Expositora do Projeto de extensão: Descomplicando da Célula ao Organismo Animal.

2021 Participação como ouvinte no 1º Simpósio Brasileiro de Biologia Muscular.

2021 Participação como ouvinte no ACS on Campus - Sao Paulo State University (UNESP).

2021 Participação como ouvinte no Fórum de avaliação do ensino remoto no IBB.

2021 Participação como ouvinte no I Encontro de Extensão Universitária no IBB.

2020 Participação como ouvinte no evento Metodologias ativas em tempo de ensino remoto.