

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Investigação de mecanismos genéticos associados às vias de formação
de ossos intermusculares no Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

EMILY BRONZE DOS SANTOS

BOTUCATU-SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Investigação de mecanismos genéticos associados às vias de formação
de ossos intermusculares no Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

Candidata: Emily Bronze dos Santos

Orientador: Danillo Pinhal

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, para obtenção do título de mestre pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética.

BOTUCATU-SP

2020

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Emily Bronze dos.

Investigação de mecanismos genéticos associados às vias de formação de ossos intermusculares no Tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Emily Bronze dos Santos. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Danillo Pinhal

Capes: 20204000

1. Peixes de água doce. 2. Pesqueiros. 3. MicroRNAs. 4. Expressão gênica. 5. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Piscicultura; RT-qPCR; miRNA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de mais nada ao meu bom e amado Deus, pela Sua infinita misericórdia que tem me sustentado até aqui e que permitiu que tudo isso fosse possível.

Aos meus pais e irmãos por todo suporte e por serem minha base, em especial a minha mãezinha que sempre acreditou principalmente nos momentos mais difíceis, por sonhar junto comigo e me apoiar em tudo, dona Val à senhora não só a minha gratidão, mas também todo o meu amor.

Ao meu orientador Prof Dr. Danillo Pinhal, pela imensa oportunidade, por contribuir com a minha formação e por confiar a mim esse projeto incrível o qual eu tenho muito orgulho em dizer que fiz parte.

Aos meus amigos/irmãos Junior, Brenda, Lara e Railane que mesmo estando na Bahia se mantiveram tão presentes ao longo desses anos que sem dúvidas o amor diário, as conversas, conselhos e todo o incentivo de vocês foram fundamentais.

Aos meus amigos baianos lindos que compõem a família “pipoco” que a UESC me deu e que levarei pra vida, Geiseane Amaral, Julyanna Castro, Rebeca Quinto, Carla Araújo, Mariana Câmpelo, Jemile Viana, Thomas Vieira e Bianca Lopes, obrigada por todo incentivo e paciência ouvindo os meus podcasts das experiências vividas no Sudeste até aqui, por viverem tudo isso junto comigo, e por sempre acreditarem que eu conseguiria chegar ao final com êxito, amo vocês.

A minha grande amiga Thayná Barreto, que juntas compartilhamos todas as experiências na nossa missão pós-graduação longe de casa, aprendemos, crescemos, sorrimos e principalmente choramos juntas. Obrigada por ser minha alma gêmea, e por ser essa mulher incrível, te amo.

Às amigas Aryele Sampaio, Beatriz Jacinto, Rafaela Cicarelli e Dona Malvina que Botucatu me presenteou e que são tão especiais que tonaram essa cidade ainda mais amada por mim, à vocês minha eterna gratidão pelas conversas infinitas e por tornarem tudo mais leve e divertido. Levarei vocês pra sempre comigo.

Aos integrantes e amigos do Laboratório LGEM, Arthur, Felipe, Natascha, Lucas e Talita, que me receberam e acolheram tão bem, pela vivência e trocas

diárias, agradeço a cada um de vocês pelo carinho e atenção comigo do começo ao fim.

Ao Dr. Luiz Augusto Bovolenta (Chokito) por me ajudar na reta final com os dados do sequenciamento, tornando-os possíveis de estar neste trabalho, minha eterna gratidão por toda paciência nas explicações.

Ao Prof Dr. Rogério de Oliveira, por toda ajuda com as análises estatísticas e pela disponibilidade em ajudar sempre que foi necessário.

Ao Prof Dr. Alexandre Hilsdorf por toda colaboração primordial, e ao Dr. Caio Perazza, pela ajuda principalmente na minha adaptação em Porto Velho-RO e com a diafanização dos alevinos. Foi um imenso prazer trabalhar com vocês.

Ao Uelinton (Veio), sua esposa Fran que me receberam não só em sua casa, mas em sua família, e a todos da piscicultura Biofish em Porto Velho-RO, que foram tão acolhedores e prestativos, tornando os meses de coletas menos solitários e mais divertidos. Sem dúvidas foi uma experiência extraordinária.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Código de financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2018/11795-8, cujo o apoio financeiro foi essencial para realização dessa pesquisa.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação em especial ao Davi, pela competência e por ser sempre prestativo.

Ao conselho do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), aos funcionários do Departamento de Genética, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à UNESP por toda infraestrutura cedida para a realização deste projeto, foi um prazer fazer parte disso.

Meus profundos agradecimentos a todos que contribuíram de maneira direta e indireta com a minha formação e realização deste trabalho.

“... Seja forte e corajoso”.

Josué 1:9

Resumo

Diversas espécies de peixes de importância na aquicultura mundial possuem ossos intermusculares (IBs) ou espinhas, como são popularmente conhecidos. Esses IBs são uma característica comercialmente indesejável por reduzir a palatabilidade dos peixes, sendo necessária sua remoção para a produção do filé, o que resulta em impactos econômicos e de frescor do produto. O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é uma espécie dulcícola neotropical da ordem Characiformes que apresenta grande potencial para a aquicultura, mas que, no entanto, possui a desvantagem de gerar os IBs. Recentemente, numa população cultivada de tambaqui, foram reportados indivíduos com ausência de IBs, sugerindo que variantes genéticas e/ou epigenéticas estejam associadas à geração do fenótipo mutante. O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos moleculares associados à formação dos ossos intermusculares, de modo a contribuir para a geração de animais com maior valor econômico agregado. Para isso foi analisada a expressão de genes codificadores e genes não codificadores associados às vias de formação dos IBs, além da caracterização temporal de formação dos IBs durante o desenvolvimento. Com base na literatura, foram inicialmente selecionados para estudo três genes candidatos à atuação nas vias de ossificação intramembranosa: *bmp4*, *runx2* e *mstn*. Estes foram avaliados na F1 quanto à expressão no intervalo de crescimento que compreende desde o início até a completa formação dos IBs, nos comprimentos 18, 20, 23 e 26mm. Inicialmente foi realizada a desova com as matrizes que apresentaram o fenótipo mutante desejado (sem IBs) e um grupo controle (com IBs), seguido do cultivo dos alevinos e monitoramento dos mesmos para determinação do momento de início da ossificação dos IBs ou verificação de ausência destes. Posteriormente foi realizada a coleta de tecidos da região próxima ao pedúnculo caudal seguida da extração de RNA e síntese de cDNA desses indivíduos para subsequente análise de perfis de expressão gênica por qPCR. Concomitantemente, foi realizada a fixação e diafanização de alevinos em diferentes fases do desenvolvimento para a caracterização morfológica dos IBs. O RNA total foi isolado das matrizes mutante e controle para sequenciamento em larga escala de miRNAs (miRNA-Seq). Como resultados verificou-se que os IBs no tambaqui são formados a partir de 15 mm de comprimento total, anterior ao previamente reportado para outros teleósteos. A análise comparativa de expressão do *bmp4* revelou diferença significativa entre mutantes e controle, havendo uma diminuição na expressão na F1 dos grupos mutantes, principalmente nos comprimentos considerados de ativa mineralização óssea (i.e., 20 e 23mm). O *runx2b* também apresentou diferença significativa entre mutantes e controle, porém o pico de diminuição de expressão ocorreu nos animais com 20mm de comprimento. Por outro lado, a *mstn* apresentou, um aumento significativo de expressão nos mutantes sem IBs na comparação aos animais controle, sugerindo possível envolvimento desses genes nas vias associadas a formação dos IBs. O miRNA-seq revelou a expressão de miRNAs importantes para a regulação de vias de formação óssea, incluindo os atuantes na regulação dos três genes codificantes alvo analisados, além da detecção de novos miRNAs exclusivamente expressos apenas nos tambaquis mutantes sem IBs. Este é um dos primeiros estudos onde avaliou-se a expressão de genes envolvidos na formação óssea em espécie de peixe neotropical, cujos espécimes foram obtidos pelo acasalamento de matrizes mutantes sem IBs. Adicionalmente trata-se da primeira análise do microRNAoma completo para investigação do fenótipo mutante sem ossos intermusculares. Esses dados inéditos gerados fornecem subsídios para trabalhos futuros visando a produção de linhagens de tambaqui sem IBs, com grande potencial para melhoria de produtividade na aquicultura.

Abstract

Several species of fish with importance in aquaculture worldwide have intermuscular bones (IBs) or spines, as they are popularly known. These IBs are a commercially undesirable characteristic because they reduce the palatability of the fish, requiring their removal for production of the fillet, which results in economic and freshness impacts of the product. Tambaqui, *Colossoma macropomum*, is a neotropical sweet species of the order Characiformes that has great potential for aquaculture, but which has the disadvantage of generating IBs. Recently, in a cultivated population of tambaqui, individuals with absence of IBs have been reported, suggesting that genetic and/or epigenetic variants are associated with the generation of the mutant phenotype. The objective of this work was to investigate the molecular mechanisms associated with the formation of intermuscular bones, in order to contribute to the generation of animals with greater added economic value. For this purpose, the expression of coding genes and non-coding genes associated with the pathways of IBs formation was analyzed, in addition to the temporal characterization of the formation of IBs during development. Based on the literature, three candidate genes were initially selected for study in the intramembranous ossification pathways: *bmp4*, *runx2* and *mstn*. These were evaluated for expression in the growth interval that comprises from the beginning until the complete formation of the IBs, in lengths 18, 20, 23 and 26 mm. Initially, the spawning was carried out with the matrices that present the desired mutant phenotype (without IBs) and a control group (with IBs), followed by the cultivation of fingerlings and their monitoring to determine the time of ossification beginning of the IBs or absence of these. Subsequently, tissue was collected from the region close to the caudal peduncle followed by RNA extraction and cDNA synthesis of these individuals for subsequent analysis of gene expression profiles by qPCR. Concomitantly, the fixation and diaphanization of fingerlings at different stages of development was carried out for the morphological characterization of IBs. The total RNA was isolated from the mutant and control matrices for large-scale sequencing of miRNAs (miRNA-Seq). As a result, it was found that the IBs in tambaqui are formed from a total length of 15 mm, prior to previously reported. The comparative analysis of *bmp4* expression revealed a significant difference between mutants and control, with a decrease in the expression of the mutant groups, mainly in the lengths considered to be active bone mineralization (i.e., 20 and 23 mm). *Runx2b* also showed a significant difference between mutants and control, but the peak of decreased expression occurred in animals with 20 mm in length. On the other hand, *mstn* showed a significant increase in expression in mutants without IBs compared to control animals, suggesting possible involvement of these genes in the pathways associated with the formation of IBs. MiRNA-seq revealed the expression of miRNAs important for the regulation of bone formation pathways, and others potentially active in the regulation of the three coding genes analyzed in RT-qPCR, in addition to the detection of new miRNAs exclusively expressed only in mutant tambaquis without IBs. This is the first study to evaluate the expression of genes involved in bone formation in neotropical species, whose specimens originated from the mating of mutant matrices without IBs. Additionally, it is the first analysis of the complete microRNAoma to investigate the mutant phenotype without intermuscular bones. These unprecedented data provide subsidies for future work to produce tambaqui strains without IBs, with great potential for improving productivity in aquaculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplares de tambaqui exibindo a variabilidade nos padrões de coloração corpórea existentes na espécie.....	13
Figura 2: Diferentes morfologia de IBs.....	16
Figura 3: Via de sinalização/regulação descrevendo alguns genes relacionados à formação dos IBs.....	19
Figura 4: Esquema ilustrando a via canônica da biogênese de microRNAs.....	21
Figura 5: Esquema dos acasalamentos realizados com as matrizes de tambaquis.....	23
Figura 6: Primeira etapa da desova com extrusão manual e coleta dos gametas.....	25
Figura 7: Etapas de criação dos alevinos.....	25
Figura 8: Região onde foi realizada a secção e retirada do tecido muscular.....	26
Figura 9: Regiões dos <i>primers</i> dos genes alvo selecionados na piranha.....	28
Figura 10: Animais diafanizados.....	33
Figura 11: Medidas de todos os indivíduos, de diferentes tamanhos, a partir do pedúnculo caudal até a extremidade da cabeça.....	33
Figura 12: Animal para demonstrar a presença e ausência dos ossos intermusculares mineralizados.....	34
Figura 13: Sequência temporal em diferentes estágios de desenvolvimento dos IBs partindo da parte posterior para a anterior do corpo.....	35
Figura 14: RNA total extraído do cruzamento controle e dos cruzamentos com fenótipo sem IBs.....	35
Figura 15: Amplificação dos genes alvos a partir de cDNA como molde.....	36
Figura 16: gráfico de expressão relativa geral do gene <i>bmp4</i> independente da família ao longo de todos os estágios de desenvolvimento dos IBs.....	37
Figura 17: Gráficos de expressão relativa média do gene <i>bmp4</i> entre as famílias teste 1 e 2 e a família controle.....	37
Figura 18: Gráfico de expressão relativa média do gene <i>bmp4</i> entre a família 3 e a família controle	38
Figura 19: Gráfico de expressão relativa média do gene <i>runx2</i> ao longo de todos os estágios selecionados.....	39

Figura 20: Gráficos de expressão relativa média do gene <i>runx2</i> entre a família controle e a família2 em cada comprimento analisado.....	40
Figura 21: Gráficos de expressão relativa média do gene <i>mstn</i> ao longo de todos os estágios selecionados.....	42
Figura 22: Distribuição de comprimento de miRNAs em tambaquis com e sem IBs, indicando pico no comprimento 22 nt.....	44
Figura 23: Gráfico de dispersão indicando todos os miRNAs encontrados no sequenciamento.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequências de <i>primers</i> utilizadas para análises de expressão.....	27
Quadro 2: Sequências de <i>primers</i> utilizados como normalizadores.....	28
Quadro 3: Sequências de miRNAs encontrados e descritos no banco de dados....	47
Quadro 4: Sequências de miRNAs encontrados mas não descritos	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 A piscicultura no cenário econômico Brasileiro	11
1.2 Características gerais do Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	12
1.3 Ossos Intermusculares (IBs)	14
1.4 Genes codificantes associados à formação óssea	17
1.5 A regulação gênica por microRNAs	20
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Reprodução dos tambaquis e cultivo dos alevinos	23
3.2 Coleta dos Tecidos	25
3.3 Isolamento de RNA total e síntese de cDNA	26
3.4 Amplificação de cDNA utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR)	27
3.5 Quantificação da expressão relativa dos genes alvo por PCR em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).	28
3.6 Análise estatística	29
3.7 Fixação e diafanização dos alevinos	30
3.8 Sequenciamento de miRNAs	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 IBs surgem em etapas iniciais do desenvolvimento do tambaqui	32
4.2 Qualidade do RNA total extraído	35
4.3 Amplificação dos primers desenhados	35
4.4 Expressão relativa dos genes alvo	36
4.5. miRNAs sequenciados	43
4.5.1 Características Gerais	43
4.5.2 Identificação de miRNAs conservados	44
4.5.3 Identificação de miRNAs diferentemente expressos	45
5. CONCLUSÕES	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8. APÊNDICES	

1. INTRODUÇÃO

1.1 A piscicultura no cenário econômico Brasileiro

A piscicultura é um dos destaques da economia brasileira, com produção de 758 mil toneladas no ano de 2019, aumento de 4,9% em relação ao ano anterior. Segundo a Associação Brasileira de Piscicultura, a produção gerou uma receita de 5 bilhões de reais, criando aproximadamente 1 milhão de empregos diretos e indiretos ao longo de toda a cadeia produtiva, e segue se destacando no mercado nacional e internacional (Peixe BR, 2019).

A piscicultura também promoveu um grande impacto no comércio internacional do Brasil. Quando analisados os dados de exportações, a piscicultura teve um crescimento de 33% só na primeira metade deste ano. Os dados divulgados são animadores principalmente do ponto de vista econômico é o que revela a a segunda edição trimestral de 2020 do informativo sobre comércio exterior da piscicultura realizados pela Embrapa-TO junto com a Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR) utilizando dados fornecidos pelo Comex stat, portal ligado ao Ministério da Economia, (Portal EMBRAPA-TO, 2020).

No último ano, além do crescimento na produção, houve também um aumento nas exportações de produtos derivados e do filé congelado, principais produtos de comércio. Dentre os países que mais importam produtos derivados da piscicultura brasileira, destacam-se os EUA, em primeiro lugar, seguidos do Chile e China. Juntos esses países são responsáveis pela importação de dois terços de toda produção aquícola brasileira (Embrapa-TO, 2019). O tambaqui ocupa o terceiro lugar como espécie mais exportada entre os meses de janeiro e julho de 2020, mostrando seu alto potencial econômico também no cenário internacional (Embrapa-TO, 2020).

Dentre as espécies cultivadas, destacam-se a tilápia nilótica e suas variedades, que representam 57% da produção total do país, seguida dos curimatás. Dentre os peixes nativos, que representam cerca de 38% da produção nacional, destacam-se o tambaqui (*Colossoma macropomum*) terceira espécie mais produzida no país (IBGE,2020), e seus híbridos, tambacú e tambatinga, seguidos

por outras espécies com um percentual de produção em torno dos 5% (Peixe BR, 2019).

Os maiores produtores de tambaqui atualmente estão na região brasileira conhecida por Amazônia Legal, região banhada pela bacia Amazônica. O Estado de Rondônia se destaca pela maior produção nacional, seguido pelo Mato Grosso (centro-oeste) e Maranhão, representante da região nordeste e Amazônia; juntos esses estados representam mais de 60% da produção nacional dessa espécie (IBGE,2019).

1.2 Características gerais do Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) é uma espécie onívora pertencente à ordem dos Characiformes, que inclui diversos peixes de interesse comercial. Esta espécie dulcícola nativa da região norte apresenta uma ampla distribuição na América do Sul e em toda a região conhecida como Amazônia legal, sendo também encontrado nos rios do centro-oeste e nordeste do Brasil. Pode chegar a 90cm de comprimento e pesar até 30kg, sendo considerado o segundo maior peixe de escamas da América do sul, ficando atrás apenas do pirarucu (*Arapaima gigas*) (Santos et al., 2013).

O tambaqui apresenta um corpo considerado romboide e volumoso com a musculatura bem desenvolvida desde o dorso até a cauda, (Araújo-Lima e Gouldinng, 1998). Possui nadadeira caudal bifurcada e nadadeira anal bem desenvolvida, com cabeça relativamente pequena em relação ao corpo; a boca possuiu lábios bem desenvolvidos e com presença de dentes fortes e resistentes capaz de triturar sementes e frutas (Araújo-Lima e Gouldinng, 1998, Santos et al., 2006).

Embora exiba usualmente coloração parda na região dorsal e manchas escuras na parte ventral do corpo, sua coloração pode variar de acordo com o ambiente. Em águas mais claras o tambaqui pode apresentar coloração verde oliva, como acontece na região banhada pelo rio Madeira. Já em águas mais escuras como as do rio Negro, o peixe pode ser observado com uma cor mais escura, e ainda em rios de águas brancas ou barrentas, como na região do rio Amazonas, os tambaquis tendem a exibir uma coloração amarelada (Baldiasseroto; Gomes, 2005; Santos et al., 2006) (Figura 1).



Figura 1. Exemplos de tambaqui exibindo a variabilidade nos padrões de coloração corpórea existentes na espécie. (a) coloração característica de animais que habitam águas mais claras; (b) coloração característica de animais que habitam águas mais escuras; (c) coloração típica de animais que habitam águas brancas ou barrentas.

O tambaqui possui uma alta popularidade devido às suas características zootécnicas favoráveis, como rápido crescimento, alta adaptabilidade (o que facilita a produção de alevinos e a engorda), rusticidade, tolerância às variações de temperaturas dos sistemas de cultivo e ao manuseio, e facilidade de comercialização graças ao elevado valor econômico de sua carne (Penna et al., 2005; Garcez e Freitas 2010). Juntas, essas características garantem ao tambaqui a primeira colocação no ranking nacional de produção dentre as espécies neotropicais (Paula, 2009; Mendonça et al., 2009).

Em seu ambiente natural a espécie atinge a maturidade sexual entre 3 a 4 anos de idade, em cativeiro a maturação ocorre, geralmente, de maneira precoce, podendo ser observada a partir dos 6 meses de idade (Almeida et al., 2016). Possui desova total dos gametas e apresenta dimorfismo no padrão de tamanho entre machos e fêmeas, sendo que as fêmeas são maiores e mais pesadas que os machos (Mello et al., 2015).

Por ser um peixe de piracema (migração reprodutiva), o tambaqui costuma desovar uma vez durante o período de chuvas, o que não é possível quando cultivados em cativeiro (Garcez e Freitas, 2010). Nesse caso a sua desova só ocorre através da prática de reprodução induzida por hipofisacção, que se trata do estímulo hormonal exógeno responsável por realizar a maturação dos gametas, implementada no manejo para que ocorra a espermiacção e ovulação (Woynarovich, 1986; Streit Jr et al., 2012; Lima et al., 2013b).

O cultivo de tambaqui ocorre em diferentes sistemas, sendo alguns deles em viveiros escavados, tanques-rede e barragens, fazendo uso de rações balanceadas de acordo com as características específicas da espécie para uma produção bem sucedida (Dairiki et al., 2011).

Nos últimos anos, estudos fisiológicos, ecológicos e genéticos têm sido direcionados ao tambaqui (Hashimoto et al., 2012). Porém poucos deles têm se dedicado à investigação de genes ou proteínas com potencial biotecnológico desta espécie. Por ainda apresentar um genoma desconhecido e poucos dados disponíveis para pesquisas moleculares, os estudos de análise funcional gênica ainda são escassos (Gomes et al., 2017).

1.3 Ossos Intermusculares (IBs)

O sistema ósseo dos peixes é metabolicamente ativo e complexo, sempre em remodelação contínua ao longo de toda a vida. É constituído por ossos e cartilagem que possuem diversas funções fisiológicas, com destaque para a sustentação estrutural do corpo, locomoção e o desenvolvimento. Os ossos também fornecem substrato para a fixação muscular, protegem órgãos vitais e constituem-se num dos maiores reservatórios de íons disponíveis no corpo (Owen 1866; Bird et al., 2003).

O desenvolvimento esquelético em peixes ósseos (teleósteos) segue o padrão evolutivo conservado dos vertebrados, consistindo morfológicamente nos ossos da cabeça, esqueleto interno e escamas (no caso de algumas espécies) (Huyseune, 2000; Witten et al., 2004). Nesses organismos foram identificados dois padrões de formação óssea: (I) a ossificação endocondral, na qual as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos podendo posteriormente formar cartilagem e a partir daí ser substituída por osso; e a (II) ossificação intramembranosa, onde as células se diferenciam diretamente em osteoblastos sem a fase de formação da cartilagem (Hall, 1988., Wagner, 2002).

Diversos teleósteos, incluindo o tambaqui, apresentam como característica morfológica a presença de ossos intermusculares (IBs) ou “espinhas” (Gemballa et al., 2003). As espinhas se assemelham a tendões e são produzidas por ossificação do tipo intramembranosa dentro do miosepto (Patterson e Johnson 1995). Nie et al, (2019) corroboraram essa proposição por evidências baseadas em análises

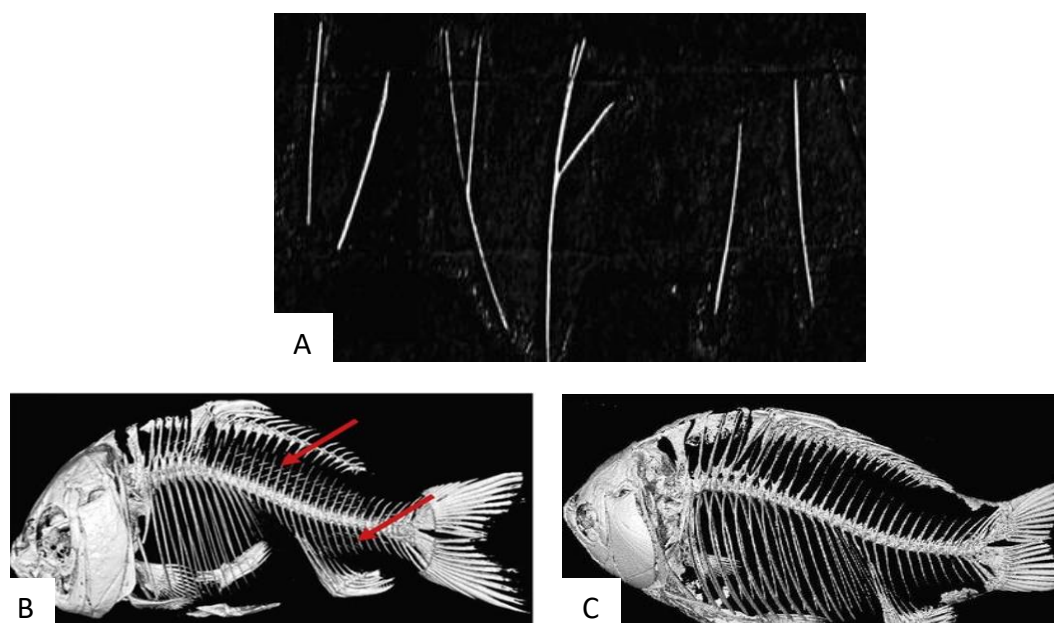
histológicas que mapearam o a formação dos IBs durante etapas do desenvolvimento.

O processo de ossificação e distribuição dos IBs ocorre de maneira diferente do esqueleto axial. Ao contrário da costela que se desenvolve a partir de uma população de células mesenquimais derivadas do somito ventral, os IBs desenvolvem-se diretamente da condensação mesenquimal do tecido conjuntivo. Estas células são primordialmente diferenciadas em osteoblastos e em seguida inicia-se o processo de mineralização. A formação dos IBs ocorre posteriormente à fixação do esqueleto axial (Bird et al., 2003; Wan et al., 2015).

Entretanto, os IBs são uma característica comercialmente indesejável por reduzirem a palatabilidade dos peixes, sendo necessária sua remoção para a produção do filé, o que resulta em impactos econômicos e a diminuição do frescor do produto. (Gemballa & Britz, 1998; Bird & Mabee, 2003; Yap et al., 2007).

Em geral os IBs se desenvolvem e ossificam da região posterior para a anterior do corpo, o que pode variar em diferentes espécies. Em relação ao local de fixação, são classificados em: (i) epineurais, os quais se encontram acima do septo horizontal, região onde são fixados os arcos neurais; (ii) epipleurais, os quais se localizam abaixo do septo horizontal, fixando-se na região das costelas; e (iii) epicentrais, os quais se encontram no septo horizontal (Patterson & Johnson., 1995; Gemballa & Britz., 1998; Danos & Ward., 2012).

Morfologicamente existem diferentes formas de IBs, sendo os mais conhecidos os não bifurcados (I), os bifurcados com extremidade desigual (┐) e os bifurcados com extremidade equivalente (Y) (Li et al., 2013), sendo os últimos encontrados no tambaqui (figura 2)



Dong et al., 2017

Figura 2. Em A diferentes morfologias dos IBs, perfazendo os padrões não bifurcado em “I”, bifurcado equivalente “Y” e bifurcado desigual “T”. Estrutura óssea em B da espécie de carpa comum (as setas vermelhas indicam os IBs na região muscular dorsal e caudal superior e inferior), e em C espécie de tilápia que naturalmente não apresenta IBs.

Ainda que as funções dos IBs não estejam totalmente elucidadas, acredita-se que eles estejam associados à sustentação corporal, contração, transmissão de força, fortalecimento da conexão entre os sarcômeros, conexão dos músculos aos ossos do esqueleto axial e diferentes modos de natação (Nursall, 1956; Xie, 2010; Gemballa & Britz, 1998; Danos & Ward, 2012; Yao et al., 2015).

Estudos relacionados aos IBs, em sua grande maioria, buscam compreender sua morfologia, abundância e distribuição em diversas espécies de peixes teleósteos (Jiang, 2008; Fang et al., 2013). Alguns estudos avaliaram a relação genética no desenvolvimento dessas estruturas, retratando potencial influência de ploidia variável em kinguio (*Carassius auratus*) (Li et al., 2013) e herança ginogenética em carpa-capim (*Ctenopharyngodon idellus*) (Xu et al., 2015)

Uma análise mais elaborada avaliando o perfil de expressão geral de mRNAs e miRNAs em resposta ao desenvolvimento ósseo intermuscular foi realizada por

Wan e colaboradores (2015 e 2016) na carpa chinesa *Megalobrama amblycephala*, gerando um grande banco de dados e indicações de genes putativamente envolvidos na regulação desses ossos.

Nie et al. (2017), analisaram a ossificação dos IBs com base em dados histológicos, transcriptômicos-proteômicos. Foram identificados uma série de proteínas envolvidas no processo de formação e potenciais inibidores que retardaram a formação desses ossos em *zebrafish* (*Danio rerio*). Esses achados colaboraram para uma melhor compreensão de alguns dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos IBs.

Em estudo publicado recentemente por Nie et al., (2020), os autores obtiveram resultados significativos através do nocaute genético do gene *esclerexia* (*scxb*), considerado chave para a formação dos IBs. Ao ser silenciado os autores observaram marcante redução na formação dos IBs.

Nos tambaquis, indivíduos sem IBs foram recentemente reportados em cativeiro (PERAZZA et al., 2016). Estes não apresentaram nenhuma diferença morfológica externa, nem comportamental em relação aos outros animais que apresentam os IBs, podendo ser percebida a ausência dessas estruturas apenas por aparelhos de ultrassom e raio X.

Neste cenário, os indivíduos mutantes sem espinhas constituem-se em um modelo biológico valioso para o estudo dos mecanismos genéticos e epigenéticos, até então desconhecidos, associados a este fenótipo raro e de especial interesse para a aquicultura.

1.4 Genes codificantes associados à formação óssea

Com o rápido avanço no desenvolvimento de tecnologias de melhoramento genético, acredita-se na possibilidade de reduzir ou eliminar o crescimento dos IBs, por meio de silenciamento de genes, *knockout*. Os microRNAs (miRNAs) exercem um papel conhecido ao longo das diversas fases iniciais do desenvolvimento ontogenético, desde respostas fisiológicas a patológicas (HOBERT et al., 2008). Estes foram associados à regulação da diferenciação de osteoblastos, osteoclastos e células mesenquimais, proliferação dos condrócitos, sendo capazes de interferir

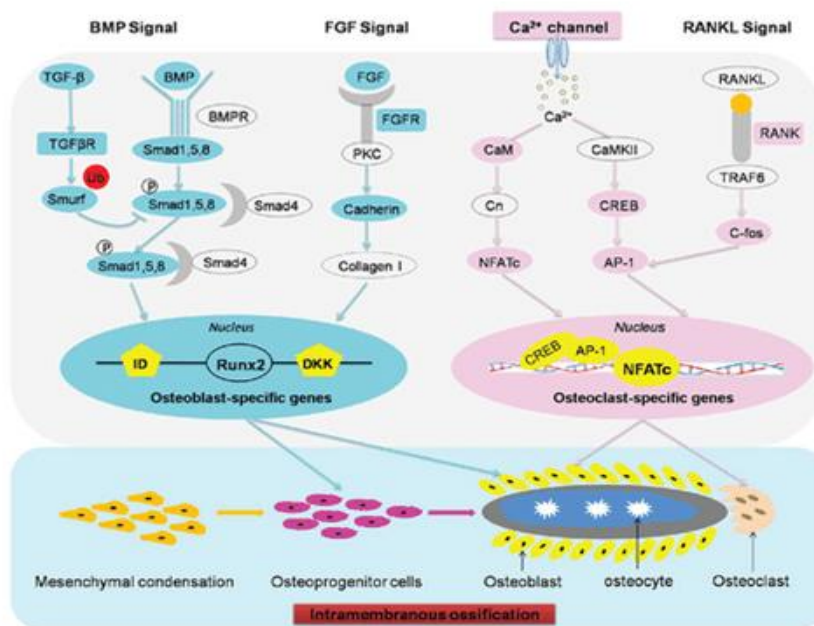
em todo o metabolismo ósseo de teleósteos (Papaioannou et al., 2014 ; Wan et al., 2015; Wan et al., 2016; Sun et al., 2016).

Dentre os genes reguladores chave no processo de mineralização óssea, o *runx2b* é essencial na diferenciação osteoblástica (Takeda et al., 2001; Yoshida et al., 2004; Huang et al., 2010). O *runx2b* é um fator de transcrição pertencente a uma família que contém outros três genes distintos (*CBFA/AML/PEBP α A*) que vão codificar proteínas com papéis fundamentais no controle transcricional de genes responsáveis pela diferenciação celular e na regulação de decisão do destino destas células (Westendorf e Hiebert, 1999). O *runx2b* vai agir como um interruptor principal para induzir a diferenciação osteoblástica em diferentes fases do desenvolvimento regulando genes alvos (Radhid et al., 2014).

Camundongos com deficiência no *runx2* apresentaram falta de ossificação intramembranosa e endocondral e tiveram ausência de diferenciação osteoblástica, assim como uma diminuição na diferenciação dos condrócitos (Komori et al., 1997). Liu e colaboradores (2017) realizando análises nos perfis de expressão de genes potencialmente associados ao desenvolvimento dos IBs, observaram não só o envolvimento do *runx2* na via de diferenciação osteoblástica como também sua atuação específica na via de formação dos IBs no *Megalobrama amblycephala*, corroborando assim com a importância do papel fundamental exercido por esse gene.

Adicionalmente, os tecidos muscular e ósseo estão intimamente associados quanto à anatomia e função, porém os mecanismos regulatórios de suas ações sinérgicas ainda não estão descritos. A miostatina (*mstn*) membro da superfamília TGF- β , é um gene inibidor do crescimento muscular (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997). Este gene atua também como regulador da expressão de genes importantes na formação óssea, promovendo aumento da expressão dos genes *sost*, *dkk1* e *rankl*, provocando a inibição da diferenciação de osteoblastos e por consequência a formação óssea (Qin et al., 2017). Considerando-se que os IBs são formados a partir da ossificação dentro do miosepto, ou seja, intimamente ligado ao tecido muscular, é possível também haver um envolvimento da miostatina na via de desenvolvimento dos IBs.

Apesar dos esforços, ainda não está elucidado como acontece a regulação dos ossos intermusculares em peixes, embora haja indícios de como essa via possa funcionar (Figura 3).



Liu et al.,2017

Figura 3. Via de sinalização/regulação proposta por Liu e colaboradores (2017), onde foram descritos alguns genes envolvidos nas vias de formação dos IBs.

As proteínas morfogenéticas ósseas (*bmps*) vêm sendo investigadas quanto à função na interação músculo-osso. Estas proteínas pertencem à superfamília de fator de crescimento transformador (TGF- β) e tem papel essencial durante a formação e manutenção dos ossos e cartilagens (Santori E Sandri, 2015). Zang e colaboradores (2018) caracterizaram os perfis de expressão de nove genes *bmp* nos diferentes estágios de desenvolvimento de IBs em *M. amblycephala*. Esses autores observaram que o gene *bmp4* apresentou expressão significativa em dois dos quatro estágios iniciais do desenvolvimento, justamente nas fases iniciais de ossificação, sugerindo sua atuação como estimuladores da formação dos IBs. Durante a análise de transcriptoma nos músculos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e da carpa comum (*Cyprinus Carpio*), Su e Dong (2018) verificaram uma baixa expressão da *bmp4* no

músculo de animais que não desenvolveram IBs, Por outro lado, alta expressão desse gene foi detectada em tecidos musculares contendo IBs, indicando que essa proteína pode desempenhar importante papel durante o processo de formação dos IBs.

1.5 A regulação gênica por microRNAs

MicroRNAs ou miRNAs são pequenos RNAs endógenos não-codificadores (~22 nucleotídeos) encontrados no genoma de animais, plantas e vírus (Xie et al., 2010; Lee et al., 2011). Dentre as espécies avaliadas, os miRNAs representam de 1 a 5% de todos os genes, o que os torna a classe de reguladores mais abundante no genoma (Zhao et al., 2007; Olena & Patton, 2010). Estas moléculas regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica por pareamento com sequências complementares de seus RNAs mensageiros (RNAm) alvo (Bartel, 2004).

Em termos funcionais, os miRNAs atuam desde a formação de heterocromatina até a regulação traducional (Chu & Rana, 2007; Filipowicz et al., 2008), sendo fundamentais em vários processos biológicos tais como controle do desenvolvimento, diferenciação, proliferação e morte celular (Liu e Olson, 2010; Christodoulou et al., 2010; Takacs & Giraldez, 2011). Outros estudos têm também associado o surgimento de miRNAs à evolução da complexidade dos organismos (Heimberg et al., 2010; Berezikov, 2011). Em geral, os miRNAs parecem trabalhar de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum.

A via canônica de ação dos miRNAs ocorre inicialmente pela associação do transcrito maduro gerado durante a biogênese (revisado por Bartel, 2018) com proteínas Argonautas para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Kim et al., 2009). Esse complexo interage com o transcrito de RNAm alvo, preferencialmente na região 3'UTR. A interação miRNA-RNAm alvo ocorre através do pareamento simples de Watson e Crick, no qual geralmente apresenta complementaridade total nas plantas e parcial nos animais (embora haja exceções) (Figura 4).

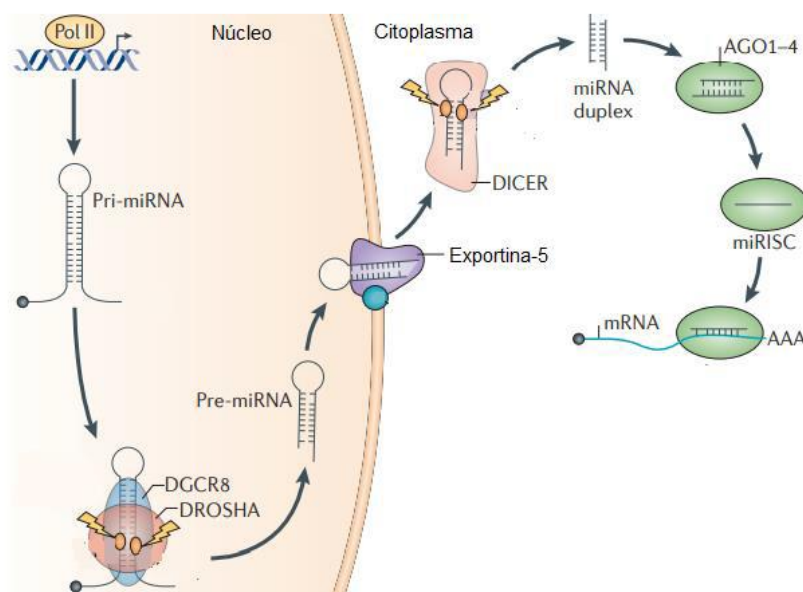


Figura 4. Esquema ilustrando a via canônica da biogênese de microRNAs (Lin & Gregory, 2015).

Entretanto, adicionalmente à região 3'UTR, diversos trabalhos também detectaram sítios de interação em éxons (Schnall-Levin et al., 2010; Reckzo et al., 2012; Hausser et al., 2013) e na região 5'UTR (Orom et al., 2008; Devlin et al., 2010; Zhou & Rigoutsos, 2014) da molécula de RNAm. A referida interação ocorre devido à complementaridade total (em plantas) ou parcial (em animais) de uma sequência de 5-7 nucleotídeos do miRNA e do RNA mensageiro alvo (Lee & Dutta, 2009). Estima-se que cada miRNA possa se ligar a até centenas de RNAs mensageiros e um único RNA mensageiro possa ter sua estabilidade ou tradução regulada por diversos miRNAs (Doench et al., 2004; Brennecke et al., 2005; Lim et al., 2005).

Atualmente, nos registros do miRBase, principal banco de dados de miRNAs, estão descritos cerca de 49.000 miRNAs maduros derivados de aproximadamente 38.500 precursores (pré-miRNAs), encontrados no genoma de mais de 200 espécies, (miRbase v22, Março/2020). Embora inúmeros genes de miRNAs tenham sido descritos no genoma dos Actinopterygii (teleósteos), o conjunto de miRNAs expressos e seus perfis de expressão permanecem desconhecidos para a absoluta maioria das cerca de 30.000 espécies de peixes, o maior grupo de vertebrados vivente.

Estudos voltados à identificação e caracterização de miRNAs em peixes têm permitido avanços significativos quanto à regulação epigenética pós-transcricional

nesses animais assim como em vertebrados de modo geral (Bizuyehu et al., 2014; Nachtigall et al., 2015; Pinhal et al., 2018). Dentre os teleósteos analisados, espécies economicamente relevantes na aquicultura, tais como a carpa, o salmão, a tilápia do Nilo, o pacu, dentre outras, tiveram o repertório de miRNAs caracterizado (revisado por Herkenhoff et al., 2018).

Entretanto dados disponíveis para o tambaqui são surpreendentemente escassos. O único trabalho disponível, avaliou os perfis de expressão de miRNAs em adultos, porém a análise foi restrita a amostras de pele e fígado (Gomes et al., 2017). Esta análise identificou a presença de 279 miRNAs expressos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes candidatos relacionados à formação dos ossos intermusculares (IBs) no tambaqui *Colossoma macropomum*.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar os perfis de expressão dos genes *runx2b*, *mstn* e *bmp4* durante diferentes fases do desenvolvimento em alevinos de tambaquis com e sem os ossos intermusculares (IBs).
2. Colaborar para melhor compreensão do funcionamento das vias de formação dos IBs
3. Identificar miRNAs envolvidos nas vias de formação dos IBs
4. Contribuir para aplicações futuras visando o desenvolvimento da aquicultura pela produção de animais com maior valor econômico agregado.
5. Colaborar para a ampliação do conhecimento sobre a biologia básica e aplicada de espécies de peixes Neotropicais

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com os princípios definidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), IB-UNESP, Campus de Botucatu. Protocolo número 1143.

3.1 Reprodução dos tambaquis e cultivo dos alevinos

O primeiro passo do projeto foi a produção dos alevinos a partir de diversos acasalamentos controlados. Nesse longo experimento (60 dias) foram utilizadas matrizes (n=3, dois machos e uma fêmea), devidamente identificadas e portadores do fenótipo de interesse sem IBs, e como controle (n=2, um macho e uma fêmea) com IBs. Esses exemplares utilizados na desova foram disponibilizados por uma piscicultura localizada na zona rural da cidade de Porto Velho-RO. O peso médio das fêmeas foi de 6,8 kg com comprimento aproximado de 57 cm; já os machos apresentaram cerca de 50 cm e pesavam em média 4,8 kg (Figura 5).

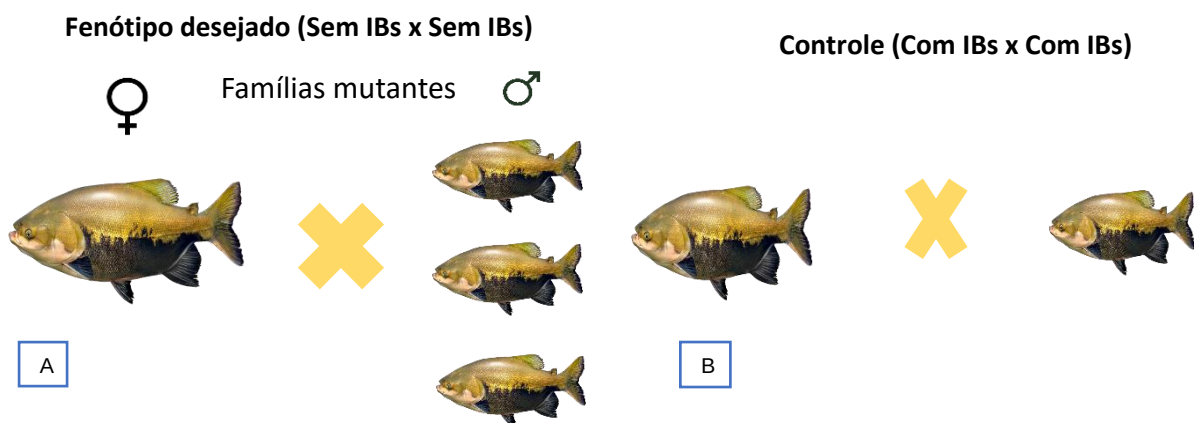


Figura 5. Esquema dos acasalamentos realizados, onde em A temos a formação das famílias (1, 2 e 3) com matrizes com fenótipos desejado (sem IBs), e em B a família controle que as matrizes apresentam IBs.

Na reprodução, o método de indução utilizado foi o extrato bruto de hipófise de carpa desidratada dissolvido em solução fisiológica. Nas fêmeas foram aplicadas duas doses com intervalo de 12 horas e os machos receberam uma única dose no momento em que as fêmeas receberam a segunda aplicação. A concentração utilizada foi a padrão de 0,8 mg/kg para as fêmeas, e os machos de 2,5-3,0 mg/kg

(Harvey & Carolsfeld, 1993). Após observado o padrão comportamental de ovulação nos indivíduos, foi realizada a extrusão por meio da pressão abdominal para induzir a saída dos oócitos pela papila genital (Figuras 6a e 6b). O mesmo mecanismo foi realizado para a retirada do sêmen, sendo ambos os gametas recolhidos em recipientes, misturados a seco e só posteriormente colocados em contato com a água em diferentes incubadoras de acordo com cada grupo reprodutivo.

No total foram realizados 4 acasalamentos controlados, sendo 3 deles entre parentais distintos portadores do fenótipo de interesse esperado (parentais sem IBs) e 1 acasalamento controle (parentais com IBs). Ao final obteve-se uma taxa de fertilização de aproximadamente 90%.

Após a eclosão, as larvas foram mantidas em incubadoras sob aeração constante por 8 dias e, em seguida, aproximadamente 250 indivíduos de cada grupo reprodutivo foram transferidos para as caixas maiores (500 L) (Figura 7a). As caixas continham um sistema de recirculação e filtragem, mantendo as condições adequadas de cultivo para a espécie (Sipaúba-Tavares et al., 2003). Parâmetros de qualidade da água como temperatura, compostos nitrogenados, acidez e limpeza dos filtros foram executados rotineiramente, e os animais foram alimentados 6 vezes ao dia *ad libitum*. O cultivo desses animais nas caixas de 500L foi realizado por aproximadamente 21 dias até atingirem o tamanho ideal e serem transferidos para os tanques rede (Figura 7b).

Foram montados 4 tanques rede dentro de um tanque de cultivo a céu aberto presentes no estabelecimento (20x10m), um para cada grupo reprodutivo, respectivamente (Figura 7c). Cada tanque rede media 2m² com espessura da rede de 3mm. Os animais foram transferidos de maneira gradativa para uma melhor aclimação e seguiram sendo monitorados nos tanques até começarem a atingir os comprimentos desejado para realização das coletas.



Figura 6: Primeira etapa da desova com extrusão manual e coleta dos gametas (a e b)



Figura 7: Etapas de criação dos alevinos, primeira etapa nas incubadoras (a), depois nas caixas de 500 L (b), e em seguida transferidos para os tanques rede (2m²) já montados dentro do tanque de criação a céu aberto 20x10m(c).

3.2 Coleta dos Tecidos

Para amostragem dos tecidos, os animais experimentais foram anestesiados com tricaína (MS-222) na concentração de 100 mg/L. Essa amostragem foi realizada em 4 estágios do crescimento: 18, 20, 23, 26mm de comprimento total, os quais compreendem etapas desde a formação inicial ao completo desenvolvimento dos IBs no pacú (*Piaractus mesopotamicus*), espécie filogeneticamente relacionada (Lopes et al., 2014).

De cada um dos comprimentos (18,20,23 e 26mm) foram coletados 6 alevinos, totalizando 24 indivíduos de cada um dos quatro grupos reprodutivos. Os animais foram medidos utilizando um paquímetro digital (Western), e buscando uma melhor precisão as medidas foram tomadas a partir do pedúnculo caudal até a extremidade da cabeça.

Amostras de tecido muscular, contendo tecido conjuntivo no miosepto, foram coletadas por secção da região do terço posterior da cauda, próximo ao pedúnculo caudal, desde a superfície até a região profunda da coluna vertebral, com presença e ausência de IBs (área inicial de formação óssea intermuscular) (Figura 8). As amostras foram preservadas em *RNA later* (Thermo Fisher Scientific) ainda em campo, trazidas ao laboratório e acondicionadas em ultrafreezer (-80°C).

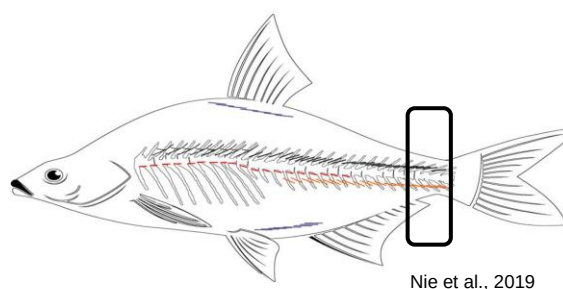


Figura 8: Região do terço posterior da cauda próximo ao pedúnculo caudal onde foi realizada a secção e retirada do tecido muscular. Fonte imagem: Nie et al., 2019.

3.3 Isolamento de RNA total e síntese de cDNA

Para a extração de RNA, amostras do tecido muscular dos diferentes cruzamentos dos grupos reprodutivos e nos variados estágios de desenvolvimento (N=6 por estágio, totalizando 24 amostras por grupo), foram maceradas utilizando o mixer previamente autoclavado e descontaminado com RNase AWAY® (Thermo Fisher Scientific). Utilizou-se intervalos curtos de 5 segundos, até a homogeneização da amostra, mantendo-se assim a integridade do RNA total isolado. A extração do RNA foi realizada pelo método TRIzol (GIBCO BRL). O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento *Nanodrop* (Agilent, EUA), somente foram utilizadas no estudo amostras puras ($A_{260}/A_{280nm} > 1,8$; $A_{260}/A_{230nm} > 2,0$). Sua integridade foi avaliada através do gel de agarose 1% onde foi possível observar por meio de transiluminador de luz ultravioleta as duas bandas que correspondem às subunidades ribossomais 28S e 18S além de uma fraca banda de baixo peso molecular correspondente aos pequenos RNAs. Para eliminar qualquer contaminação por DNA genômico, o RNA total foi purificado utilizando-se o kit TURBO DNA-free™ (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante.

Em seguida todas as amostras foram armazenadas à -80°C até a síntese de cDNA, que foi realizada utilizando-se o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologies, EUA).

3.4 Amplificação de cDNA utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A amplificação dos segmentos de cDNA foi feita utilizando-se iniciadores para as sequências dos alvos *mstn*, *runx2b* e *bmp4* (descritos no quadro 1). Considerando-se que o tambaqui não possui genoma sequenciado, esses *primers* foram inicialmente desenhados com base no genoma de espécie relacionada, a Piranha vermelha (*Pygocentrus nattereri*). As sequências utilizadas foram obtidas no GenBank utilizando-se a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (BLAST) (Altschul et al., 1990).

Quadro1: Sequências de *primers* utilizadas para análises de expressão

Genes	Par de <i>primers</i>	Referência
<i>runx2b</i>	F: CCCCTCCATGGTTTAATGAGCA	NCBI acesso: 017681647.1
	R: GTCTGTGGAACCTGGGAGGC	
<i>bmp4</i>	F: CTCGGCCCTCTTTTAGCGG	NCBI acesso: 017690923
	R: AGAGTCTTGTCATGGGTAGAGG	
<i>mstn</i>	F: CGCCATCAAGTCCCAGATCC	NCBI acesso: 017713514
	R: CGATGGGGTCGGGCTC	

Posteriormente, entretanto, tivemos acesso a sequências do genoma do tambaqui (fornecida por colaboradores), e verificou-se que boa parte dos *primers* desenhados com base na piranha são adequados para amplificação dos ortólogos da *mstn*, *runx2b* e *bmp4* do tambaqui (Figura 9).

Para a PCR foi adicionado 1,5 µL da mistura do cDNA de cada gene obtido por transcrição reversa, 2,5 µL de tampão de PCR; 0,75 µL de MgCl₂; 0,5 µL da mistura de desoxinucleotídeos a 0,4 mM cada (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,5 µL

de cada iniciador específico (*sense* e *antisense*) a 100 nM; e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (1 U/µL), completando um volume final na reação com 18,5 µL de água deionizada estéril. O resultado da amplificação foi observado após a eletroforese em gel de agarose a 1%.



Figura 9. Algumas das regiões dos *primers* dos alvos *runx2* e *mstn*, selecionados na piranha a partir da ferramenta BLAST e posteriormente alinhados com o sequenciamento do tambaqui.

3.5 Quantificação da expressão relativa dos genes alvo por PCR em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).

Foi feita a determinação da expressão relativa dos genes alvo avaliados em exemplares de tambaqui com e sem os IBs. Como normalizadores para as reações de Real Time PCR, foram utilizados sequencias dos genes *GAPDH* e *RPL19*, que são referências nesse tipo de tecido (quadro 2).

Quadro 2. Sequências de *primers* para genes utilizados como normalizadores

Genes	Par de <i>primers</i>	Referência
<i>GAPDH</i>	F: ACACACGACGACAAGACCAA	Paula, T. G. D, et al. 2017
	R: GTCCCTCTCGCTGAAAACCTG	
<i>RPL19</i>	F: GCAAACCTGGTGAAGGATGGT	Duran et al., 2015
	R: CTTGGACTCCCTGTAACGCC	

Para a otimização da quantidade de *primers* a ser usada nos ensaios de qPCR, testamos as concentrações 0,25; 0,4; 0,5 e 0,7uM de *primers* em amostras do tecido muscular de indivíduos da família controle. Avaliamos as curvas de dissociação – que mostram a especificidade dos *primers* e a ocorrência de dimerização - e a variação dos Cqs entre as diferentes concentrações, a fim de verificar a partir de que concentração o Cq não aumenta, o que indica quantidade ótima de primer a ser utilizada em cada reação. Nos testes de eficiência, realizamos diluições seriadas de cDNA molde e, após a reação, fizemos uma regressão entre os Cqs obtidos e o log das concentrações testadas (100ng, 50ng, 25ng, 12,5ng e 6,25ng). Utilizando a inclinação da reta da regressão (slope), calculamos a eficiência dos *primers*, sugerido por Michael W. Pfaffl, (2001).

As reações foram realizadas no sistema StepOne Plus Real-time PCR systems (Life Technologies, EUA) utilizando o mix Real Q Plus Master Mix green High Rox (Ampliqon, Dinamarca). Nos protocolos foram seguidas as orientações do fabricante. Os valores de Cq (ciclo de quantificação) foram calculados utilizando o software SDS 1.4, utilizando a configuração automática de baseline e um threshold de 0,2. O Cq é ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo baseline e o threshold (de acordo com o RDML, [HTTP://rdml.org](http://rdml.org)) (Lefever et al., 2009). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método de Cq comparativo $C_T (2^{-\Delta\Delta CT})$. Todos os experimentos de qRT-PCR foram realizados seguindo as orientações do MIQE (Minimum information for Publication of Quantitative Experiments; Bustin et al., 2009).

3.6 Análise estatística

Para as análises comparativas da expressão gênica nos grupos estudados, foram utilizados os valores médios das replicatas de cada indivíduo para aumentar a precisão das quantificações. Os dados foram analisados utilizando o ajuste de modelos lineares generalizados para a distribuição Gama, que possui flexibilidade para distribuição assimetrias em torno da média (Nelder et al., 1972). Os indivíduos foram analisados por meio da comparação dos grupos e ao longo do tempo, considerando que as diferenças foram estatisticamente significativas quando

o valor “p” do teste estatístico era menor que 5% (valor $p < 0.05$). Algumas comparações pareadas foram realizadas quando necessárias para avaliar os fatores de variação que possuíam mais de duas categorias, utilizando contraste dos parâmetros ajustados do modelo linear. O software estatístico utilizado para as análises foi o SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC, version 9.3).

3.7 Fixação e diafanização dos alevinos

Buscando melhor compreender o surgimento e o desenvolvimento dos ossos intermusculares, foi realizada a fixação de alevinos ao longo de todo o desenvolvimento inicial dos animais, até que todas as estruturas ósseas estivessem formadas para posterior diafanização (Taylor e Van Dyke, 1985).

Inicialmente, indivíduos de cada grupo experimental foram fixados utilizando o protocolo adaptado de Taylor e Van Dyke (1985). O primeiro passo foi a fixação em solução de formalina a 10% por 24 horas, seguida de lavagem em água destilada por 2 horas, desidratação em álcool em três soluções de concentração crescente (30%, 50% e 70%) por 24 horas cada. Concluídas essas etapas, as amostras foram mantidas em álcool 70% até a realização da coloração.

O passo seguinte foi a realização da coloração do tecido cartilaginoso com a imersão dos animais em solução de Azul de Alcian (Sigma Aldrich) (30% de azul de alcian diluído em 70% álcool absoluto e 30% ácido acético; 24 horas). Posteriormente, as amostras foram imersas em solução saturada de Borato (1h), e colocadas para digestão muscular com as enzimas Tripsina e Pancreatina (Sigma Aldrich) de 96-120 horas, até os animais apresentarem transparência. Após, foram transferidos para solução de despigmentação com H_2O_2 + solução saturada de Borato (6 gotas/100 ml) 48-60 horas. Na última etapa da diafanização, os ossos foram corados com Alizarina (Alizarina em solução de KOH 0.5%) por 24 horas.

As amostras já diafanizadas foram então preservadas em soluções crescentes de glicerina (solução de preservação Glicerina a 30% e 60% diluídas em KOH 2%, ambas por 24 horas) e depois mantidas em Glicerina + Timol até posterior medição e tomada de imagens (Figuras 5 a 7).

Foram diafanizados aproximadamente 40 animais em quatro lotes de diferentes cruzamentos. Os três primeiros lotes foram para ajustar o protocolo e no quarto lote o procedimento foi otimizado e os resultados satisfatórios.

3.8 Sequenciamento de miRNAs

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA) seguindo o procedimento do fabricante. A qualidade e a quantidade de RNA total foram analisadas no Bioanalyzer 2100 (Agilent, CA, EUA) com número RIN > 7,0. Aproximadamente 1 ug de RNA total foi usado para preparar uma pequena biblioteca de RNA de acordo com o protocolo de TruSeq Small RNA Sample Prep Kits (Illumina, San Diego, EUA).

E então foi realizado o sequenciamento de extremidade única de 50 pb em um Illumina Hiseq 2500 na LC Sciences (Hangzhou, China) seguindo o protocolo recomendado pelo fornecedor. O serviço foi contratado junto à empresa LC Sciences (Houston, Texas – USA), as amostras foram preparadas e enviadas de acordo com recomendações da própria empresa.

Leituras brutas foram submetidas a um programa interno, ACGT101-miR (LC Sciences, Houston, Texas, EUA) para remover dímeros adaptadores, lixo de baixa complexidade, famílias de RNA comuns (rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA) e repetições. Posteriormente, sequências únicas com comprimento em 18 ~ 26 nucleotídeos foram mapeadas para espécies precursoras específicas em miRBase 22.0 por meio do blast BLAST para identificar miRNAs conhecidos e novos miRNAs derivados de 3p e 5p.

A variação de comprimento em ambas as extremidades 3' e 5' e uma incompatibilidade dentro da sequência foram permitidas no alinhamento. O mapeamento de sequências únicas para espécies específicas de miRNAs maduros em *hairpin* foram identificados como miRNAs conhecidos. O mapeamento de sequências únicas para o outro braço do grampo de cabelo precursor de espécies específicas conhecidas, *hairpin* contendo miRNA maduro anotado, foram consideradas como novos candidatos a miRNA derivados de 5p ou 3p.

As sequências restantes foram mapeadas para outros precursores de espécies selecionadas (com a exclusão de espécies específicas) em miRBase 22.0 por meio

do BLAST, e os pré-miRNAs mapeados foram posteriormente mapeados contra os genomas de espécies específicas para determinar suas localizações genômicas. Os dois acima foram definidos como miRNAs conhecidos.

As sequências não mapeadas foram submetidas ao BLAST contra os genomas específicos e as estruturas *hairpin* de RNA contendo sequências foram preditas a partir das sequências de 80 nt usando o software RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Os critérios para a previsão da estrutura secundária foram: (1) número de nucleotídeos em *stem* (≤ 12) (2) número de pares de bases na região *stem* do *hairpin* predito (≥ 16) (3) corte de energia livre (kCal / mol ≤ -15) (4) comprimento do *hairpin* (*stem* para cima e para baixo + alça terminal ≥ 50) (5) comprimento do *hairpin* (≤ 20). (6) número de nucleotídeos em na bolha da região madura (≤ 8) (7) número de erros tendenciosos em uma protuberância na região madura (≤ 4) (8) número de bolhas tendenciosas na região madura (≤ 2) (9) número de erros na região madura (≤ 7) (10) número de pares de bases na região madura do *hairpin* previsto (≥ 12) (11) porcentagem do *stem* maduro (≥ 80).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IBs surgem em etapas iniciais do desenvolvimento do tambaqui

Após todos os animais serem devidamente medidos e fotografados, visualizou-se mais detalhadamente as estruturas ósseas através de um microscópio óptico (Figuras 10 e 11). Foi observado que os IBs começaram a surgir a partir do comprimento 15mm ainda na forma inicial de “I” e apenas na região frontal do tambaqui, e foram encontrados completamente formados a partir do comprimento 23mm, onde todos os animais apresentaram todos os IBs na sua conformação “Y” na parte ventral e dorsal do corpo.

Durante o procedimento também foram encontrados animais com o fenótipo almejado, sem IBs epineurais na região do lombo (Figuras 12A e 12B), tal como relatado por Perazza et al (2016). Essa informação foi importante para direcionar as etapas subsequentes voltadas à análise do perfil de expressão gênica.

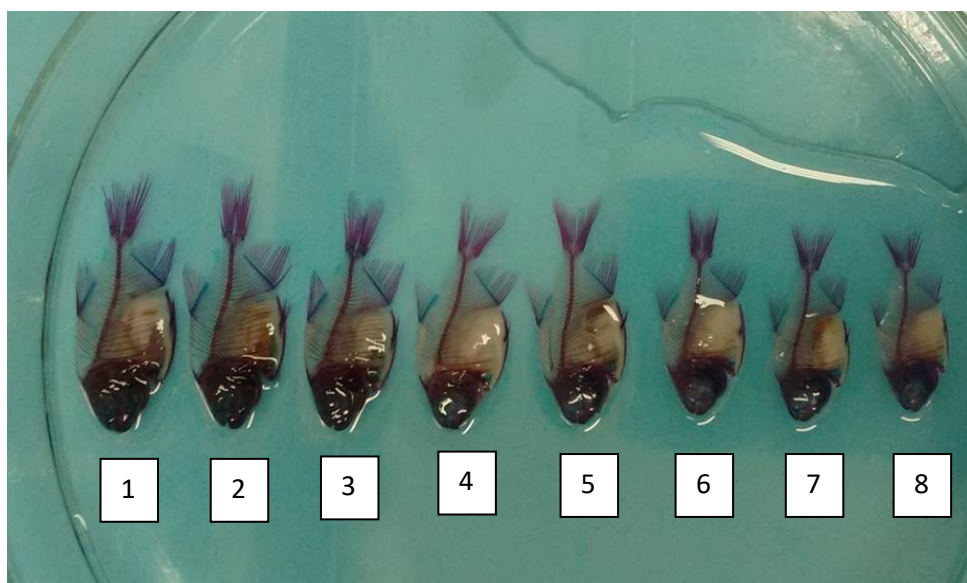


Figura 10. Animais diafanizados (fixados em Glicerina + Timol) por protocolo otimizado no presente estudo.



Figura 11. Medidas de todos os indivíduos, de diferentes tamanhos, a partir do pedúnculo caudal até a extremidade da cabeça.

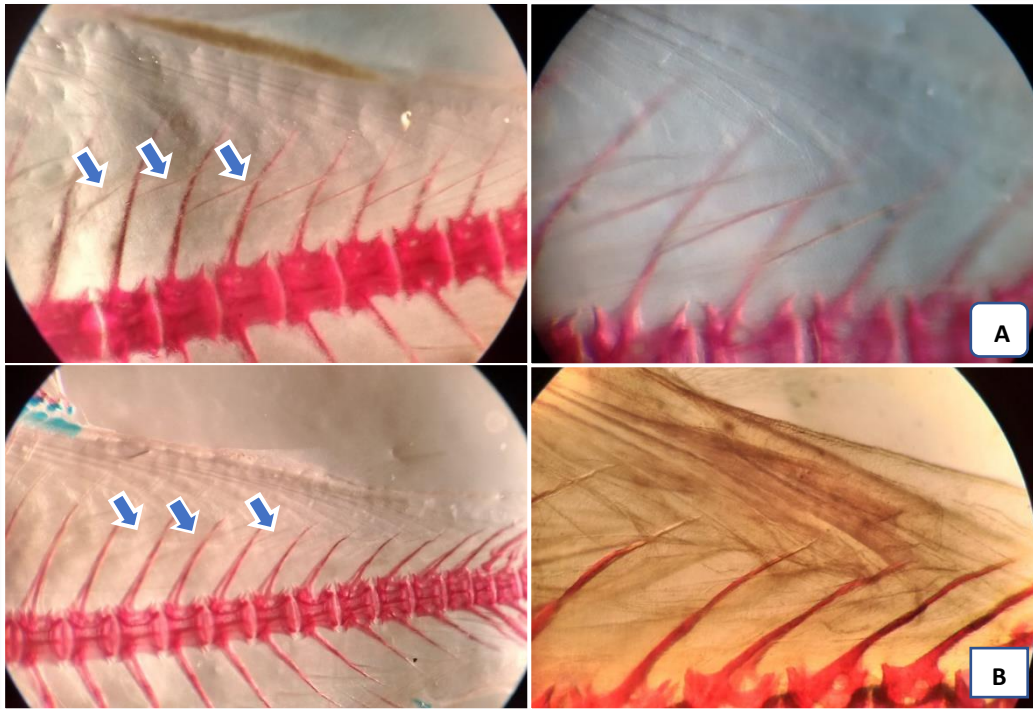


Figura 12: Animal para demonstrar os ossos intermusculares mineralizados (a), em (b) foto aproximada da região posterior caudal. Animal para demonstrar ausência de mineralização dos ossos intermusculares (b) em foto aproximada da região posterior caudal onde se inicia a formação dos IBs.

O tambaqui apresentou formação dos IBs após à formação do esqueleto principal, e o surgimento ocorreu a partir da região posterior para anterior do corpo (Figura13). O mesmo padrão foi encontrado anteriormente em algumas espécies de ciprinídeos, *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus gibelio*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Megalobrama amblycephala* e *Danio rerio* (Bing.,1962; Ke.,1965; Bird.,2003; Dong et al., 2006; Wan et al., 2014). Apesar do tambaqui pertencer ao grupo dos characiformes, esse mecanismo de formação se mostrou bem conservado entre diferentes grupos.

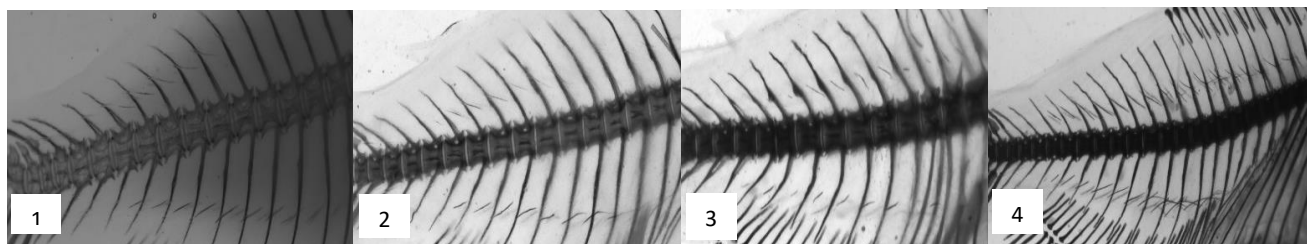


Figura 13: Sequencia temporal dos diferentes estágios de desenvolvimento dos IBs cujo aparecimento ocorre da porção posterior ( esquerda) para a anterior do corpo ( direita). Em 1 animal com 18 mm, em 2 com 20mm, 3 com 23mm e 26mm em 4.

4.2 Qualidade do RNA total extraído

As amostras extraídas apresentaram uma boa integridade, como pode ser verificado nas imagens dos géis de agarose 1% (Figuras 14A, B e C). A concentração e a pureza foram satisfatórias com valores de razão entre 1,8 - 2,0 para as absorvâncias medidas a 260 e 280 nm (Sambrook, 2002).

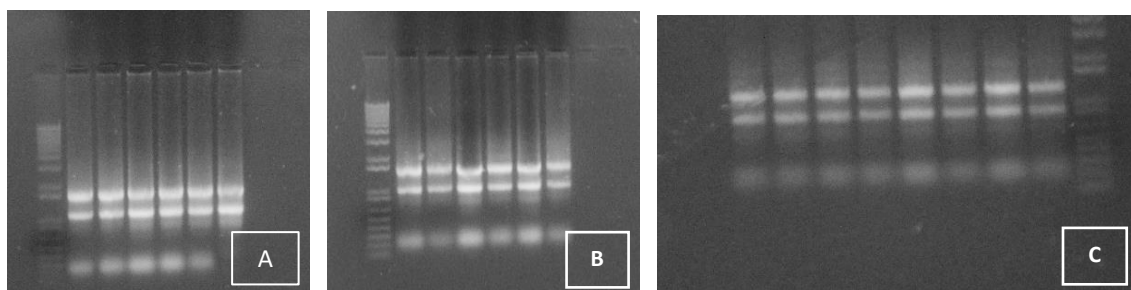


Figura 14: RNA total extraído do cruzamento controle (A) e dos cruzamentos com fenótipo sem IBs (B e C) em gel de agarose 1%. Os RNAs de todas as extrações apresentaram as duas subunidades intactas mostrando uma boa integridade.

4.3 Amplificação dos primers desenhados

Os produtos da PCR, realizada para avaliar a qualidade do cDNA sintetizado e os *primers* específicos, foram observados nas bandas correspondentes ao tamanho esperado, sendo a *mstn* em aproximadamente 800 pares de bases (pb) e o *runx2b* em 600 pb, no gel de agarose a 1% (Figura 15).

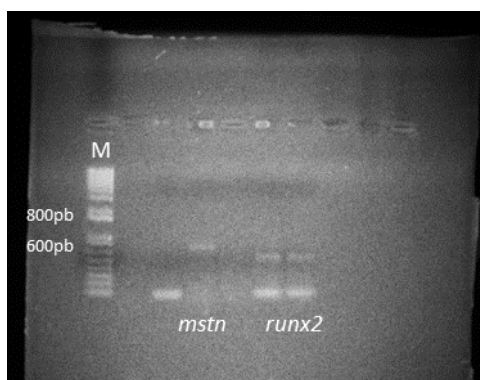


Figura15: Amplificação dos genes alvos (*mstn* e *runx2b*) a partir de cDNA como molde. Comprimento dos fragmentos comparado ao marcador de tamanho molecular 1Kb plus (M).

4.4 Expressão relativa dos genes alvo

Um dos genes alvo avaliado, considerado fundamental para melhor compreensão das vias de formação dos IBs foi o *bmp4*, o qual origina a proteína morfogenética óssea 4 (Bmp4). Nas famílias obtidas a partir de acasalamentos distintos, foi observado um aumento crescente na expressão principalmente na família controle ao longo do desenvolvimento dos IBs, onde a maior expressão relativa média foi observada no comprimento de 26mm, sendo até duas vezes superior à verificada no estágio inicial (18mm) onde os IBs da região dorsal começam a surgir (Figura16 A).

Esse aumento gradual entre os quatro estágios analisados ocorreu de maneira significativa, indicando que conforme os IBs se desenvolvem pode haver maior necessidade deste gene responsável pela sinalização na via.

Quando comparadas família controle e famílias teste, verificou-se que o gene *bmp4* apresentou uma diminuição na expressão, levando em consideração a expressão geral de cada família independente do comprimento. (Figura 16 B).

À medida que foi analisada a expressão dentro de cada comprimento, observou-se diminuição principalmente nos comprimentos 20mm e 23mm, entre a família controle e a família 1 (Figura 17 A). Na família 2 a diminuição ocorreu de maneira significativa no comprimento 23mm (Figura 17B), e apesar de não ter sido significativo, foi possível observar no gráfico uma tendência de diminuição na

expressão nesses mesmos comprimentos também entre a família 3 e a família controle (Figura 18).

Conjuntamente foi observado uma variação da expressão dentro de cada grupo reprodutivo, o que já era esperado, considerando que a variabilidade genética existente pode influenciar no comportamento individual de cada animal.

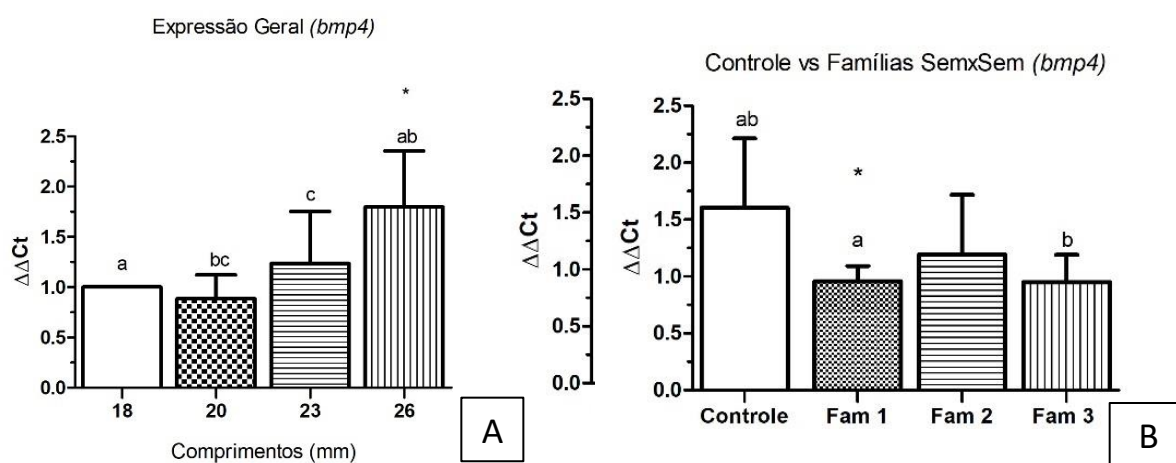


Figura16: Em A gráfico de expressão relativa geral do gene *bmp4* independente da família ao longo de todos os estágios de desenvolvimento dos IBs (18, 20, 23 e 26 mm). Em B expressão relativa das famílias teste (1, 2 e 3), independente dos comprimentos, comparados à controle. As letras a, b e c acima das barras de desvio indicam uma diferença significativa em $p < 0,05$; * indica indivíduos outliers.

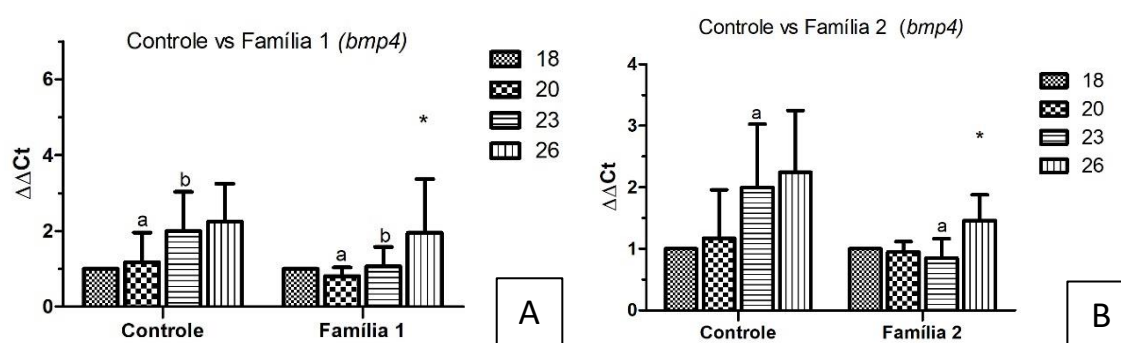


Figura 17: Gráficos de expressão relativa média do gene *bmp4* entre as famílias mutantes 1 (A) e 2 (B) e a família controle em cada comprimento analisado (18, 20, 23 e 26mm). As letras a e b indicam diferença significativa em $p < 0,05$.

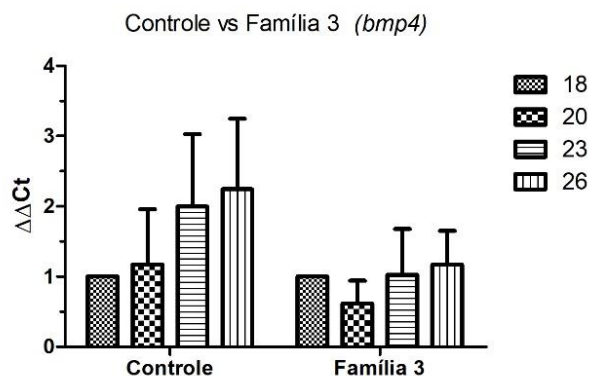


Figura 18: Gráfico de expressão relativa média do gene *bmp4* entre as famílias mutante 3 e a família controle em cada comprimento (18, 20, 23 e 26mm).

Em outras espécies de peixes, como em *M. amblycephala* (Zhang et al; 2017), o *bmp4* foi encontrado associado à formação dos IBs, mediante à sua expressão destacada no estágio considerado decisivo (23mm) para a ossificação intramuscular. Segundo Su e colaboradores (2017) o *bmp4* tem papel fundamental na ocorrência dos IBs, visto que foi encontrado tendo uma expressão maior no músculo da carpa, espécie que apresenta os IBs, enquanto que na tilápia que não tem a ossificação presente essa proteína teve uma expressão considerada muito baixa. Destacando que nos seis músculos avaliados o *bmp4* apresentou super expressão apenas em dois músculos cujos IBs estavam presentes.

O aumento transitório da *bmp4* observado no tambaqui pode ser necessário para que ocorra a diferenciação das células em osteoblastos funcionais, como também verificado em linhagens de células humanas, e se mostrou fundamental na sinalização de vias controladas pelos genes *wnts*, que são essenciais em diversos processos de desenvolvimento como proliferação, sobrevivência e diferenciação osteoblásticas (Gazzerro e Canalis., 2006).

Zhang e colaboradores (2017) sugeriu que a *bmp4* e outras proteínas membros da família, agem regulando positivamente, devido ao aumento da expressão desse gene ao longo dos estágios desenvolvimento na carpa chinesa (*M. amblycephala*). Esse gene também foi encontrado envolvido na estimulação da migração e/ou condensação de células da matriz óssea nos locais de crescimento dos IBs, e na diferenciação de osteoblastos, processos que contribuem para maturação dessas estruturas Cannalis et al (2003).

Wan & Cao (2005) destacaram que, apesar das *bmps* desempenharem diversos papéis ao longo do desenvolvimento ósseo, como diferenciação celular ainda na fase embrionária, apoptose e interações epitelial-mesenquimal, sua atividade nas vias de formações óssea, considerando toda a complexidade e especificidade dos sinais emitidos, ainda precisa ser melhor elucidada.

Recentemente Nie e colaboradores (2020), avaliando a expressão de genes envolvidos nas vias de formação dos IBs em *zebrafish* por meio de nocaute dos genes *escleraxia* (*scx*), um marcador importante na formação do tendão, relataram que o *bmp4* foi encontrado com uma baixa expressão em animais que tiveram seus IBs reduzidos em até 70%, sendo que este gene está associado a indução de maturação dos osteoblastos (Cannalis et al., 2003). Este dado reforça a ação de *scx* no desenvolvimento dos IBs.

Na análise da expressão média relativa do gene *runx2* foi verificado um aumento global na expressão deste gene entre os estágios de desenvolvimento iniciais investigados, independentemente do grupo experimental, sendo o maior pico encontrado no comprimento 26mm (Figura 19). Houve tendência de diminuição nas famílias teste, sendo que no comprimento 23mm o gene *runx2* apresentou-se pouco expresso de maneira notável nos indivíduos da família dois (Figura 20), e nas demais famílias foi possível notar também essa diminuição.

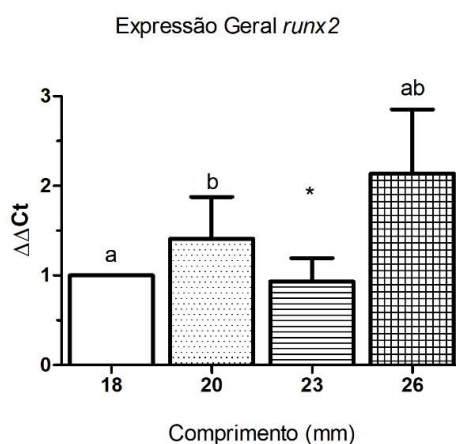


Figura 19: Gráfico de expressão relativa média do gene *runx2* ao longo de todos os estágios selecionados (18,20,23 e 26 mm) de desenvolvimento dos IBs, independente da família. As letras a e b indicam uma diferença significativa em $p < 0,05$.

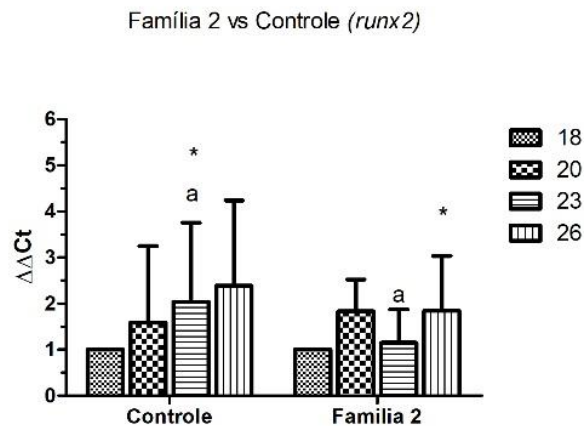


Figura 20: Gráficos de expressão relativa média do gene *runx2* entre a família controle e a família2 em cada comprimento analisado (18,20,23 e 26mm). A letra a indica diferença significativa em $p < 0,05$.

O papel do *runx2* é bem descrito, foi considerado um dos mais importantes fatores de transcrição responsável pela ativação de genes marcadores essenciais nas vias de diferenciação de osteoblastos (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Bruderer et al., 2014).

Zanatta et al (2012) correlacionaram a expressão do *runx2* ao controle da densidade de mineralização óssea em células humanas mostrando que esse gene é necessário em mais de uma via durante a formação/remodelação óssea.

Takarada e colaboradores (2016), mostraram que o *runx2* é essencial na ossificação intramembranosa em linhagens de células ósseas que tem como principal precursor o *osterix* um importante precursor de osteoblastos. Geralmente esses precursores diferenciam-se ainda mais em osteoblastos maduros, contribuindo assim para a formação do osso mineralizado (Nakashima et al., 2002; Maes et al., 2010), o que pode contribuir para o maior pico de expressão do *runx2* no comprimento 26mm no tambaqui, onde justamente os IBs estão bifurcados, assumem a conformação de Y e aumentam em tamanho.

Contrariamente ao esperado, Nie e colaboradores (2020) ao avaliarem os níveis de expressão do *runx2* em *zebrafish* – cujos genes *scx* foram nocauteados e os IBs reduzidos em número – não observaram diferença significativa entre os peixes selvagens e mutantes. Entretanto esses autores verificaram que o *runx2* fora regulado negativamente na parte dorsal dos animais que tiveram um dos ortólogos *scx* nocauteado.

Músculo e osso estão intimamente ligados tanto anatômica quanto funcionalmente. Os IBs são formados por meio da condensação mesenquimal por ossificação intramembranosa que ocorre no tecido conjuntivo dentro do miosepto (Patterson e Jhonson.,1995). Já se sabe que a atividade muscular desenvolve um papel importante no processo de homeostase entre a formação e reabsorção óssea, mantendo uma interação direta nessa regulação (Rittweger, 2000; Hamrick, 2012).

Analizamos a expressão relativa média da *miostatina* (*mstn*), um regulador negativo do crescimento muscular, nos diferentes estágios de desenvolvimento dos IBs nos grupos reprodutivos mutantes em relação ao controle.

Houve um aumento da expressão da *mstn* ao longo do desenvolvimento em todos os comprimentos, independentemente do cruzamento considerado (Figura 21A). Isso sugere que, conforme os IBs se desenvolvem dentro do miosepto, de certa forma, o crescimento do tecido muscular da região de interação pode ser inibido pela ação da *mstn*, permitindo o avanço dos IBs.

Quando analisada a diferença de expressão entre as famílias sem IBs (1, 2 e 3) em relação à família controle, observou-se que houve aumento significativo apenas na família 1 (Figura 21B).

As ações da miostatina (*mstn*) como regulador do crescimento muscular tem sido vastamente investigadas, mas o seu papel na regulação de massa óssea, regeneração e densidade ainda não são bem entendidos (Elkasrawy e Hamrick, 2013). Contudo, trabalhos sugerem que ela exerça um papel importante neste segundo cenário. A variação no pico de densidade mineral óssea durante estudos realizados em humanos, foi associado a polimorfismos encontrados nesse gene (Zhang et al., 2008).

Testes realizados para avaliar a influência da *mstn* na formação e regeneração de tendões, mostraram que os camundongos que tiveram o gene nocauteado apresentaram estruturas descritas como mais frágeis e menores (Mendias et al., 2008). Considerando que os mecanismos de desenvolvimento dos IBs ainda não estão completamente elucidados, e suas vias de formação assemelham-se às dos tendões, testes funcionais mais específicos serão necessários para uma melhor compreensão acerca da possível ação da *mstn* na formação dos IBs.

A *mstn* também foi encontrada estimulando a expressão de diversos reguladores negativos de desenvolvimento ósseo, *sost*, *rankl* e *dkk1*. Qin et al., (2017) também mostraram que a *mstn* é o primeiro sinal liberado pelo tecido muscular, que ao atingir exossomos derivados de osteócitos, reduz a expressão do miRNA-218 e esses exossomos quando transferidos para os osteoblastos podem provocar a inibição da sua diferenciação e possivelmente a remodelação óssea.

Durante o estudo realizado com densidade óssea femoral em camundongos, foi sugerido que a deficiência de *mstn* aumenta significativamente a densidade óssea (Hamrick, 2003). Browser et al., (2013), encontraram alterações nas respostas de células progenitoras ósseas de camundongos idosos, o que pode indicar um papel importante da *mstn* na proliferação dessas células influenciando no desenvolvimento do osso.

Os meios utilizados pela *mstn* na regulação e remodelação óssea ainda não estão completamente elucidados, mas Elkasrawy & Hamrick (2010) apontaram como sendo um fator anti-osteogênico, já que foi visto que ela pode suprimir a proliferação e provável sobrevivência dos osteo e condroprogenitores, atuando de maneira direta na diferenciação de células ósseas.

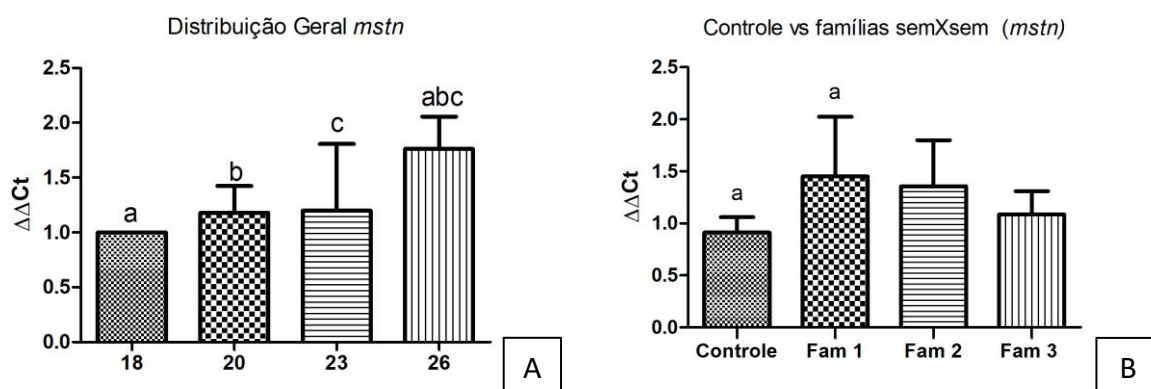


Figura 21: Gráficos de expressão relativa média do gene *mstn* ao longo de todos os estágios selecionados (18, 20, 23 e 26 mm) de desenvolvimento dos IBs, independente da família (1). Em 2, a expressão relativa das famílias teste (1, 2 e 3) em relação a controle. As letras a e b indicam diferença significativa em $p < 0,05$, e a letra c significância em $p < 0,01$.

4.5. miRNAs sequenciados

4.5.1 Características Gerais

Buscando identificar todos os miRNAs presentes no tambaqui, foram construídas bibliotecas de RNA a partir do tecido muscular coletado próximo à região das costelas e pedúnculo caudal dos animais com e sem os IBs. Todas as amostras sequenciadas apresentaram uma boa qualidade. As sequências de dados com ≥ 18 nt foram anotados no banco de dados Rfam para remover alguns tipos RNAs não codificantes (rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA) e possíveis fragmentos resultantes de degradação de mRNA. Posteriormente as sequências restantes contendo 18-30 nt, foram alinhadas com o banco de dados de miRNA, o miRbase, e aquelas que tiveram match foram consideradas miRNAs conservados de *Pygocentrus nattereri*.

O total de 11.126.017 leituras brutas foram geradas, e após descartadas as de baixa qualidade, um total de 9.699.190 pequenas leituras de RNA limpas foram mapeadas. Houve pouca diferença no comprimento dos pequenos RNAs gerados, sendo a maioria entre 20-22 nt ($>90\%$), principalmente com 22 nt (70%) (Figura 22), que é um comprimento característico de produtos derivados da Dicer (Bartel, 2004). Esses achados foram similares à distribuição de comprimentos encontrados no sequenciamento de miRNAs em outras espécies de peixes, tais como *Cyprinus carpio* (Zhu et al., 2012), *Megalobrama amblycephala* (Wan et al., 2016), *Ictalurus punctatus* (Xu et al., 2013), e o linguado japonês- *Paralichthys olivaceus* (Fu et al., 2011).

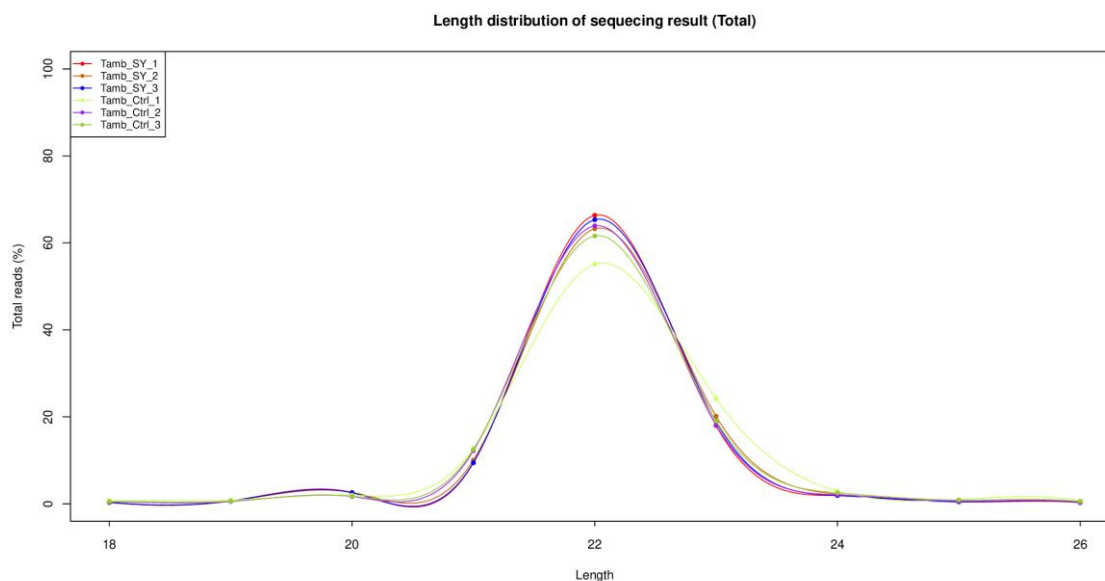


Figura 22: Distribuição de comprimento de miRNAs em tabaquis com IBs e sem IBs, indicando pico no comprimento 22 nt (~70%)

4.5.2 Identificação de miRNAs conservados

Devido à falta do genoma completo do tabaqui, após o processo de filtragem as sequências de Pré-miRNAs e miRNAs foram analisadas usando ACGT101-miR para detectar miRNAs conservados e novos utilizando os já descritos na plataforma do miRBase e alinhados ao genoma da piranha-vermelha (*Pygocentrus nattereri*) que é a espécie filogeneticamente mais próxima com genoma conhecido.

Após o agrupamento das sequências idênticas foi possível encontrar um total de 464 pré-miRNAs. Desses cerca de 70 miRNAs foram identificados e pertencem a 18 famílias distintas, os demais 301 pré-miRNAs foram considerados novos pré-miRNAs já que não foram encontrados no banco de dados.

Dentre os miRNAs encontrados no tabaqui, destacamos os mais abundantes, o miR-1 considerado específico de músculo e o miR-133 também envolvido na diferenciação e proliferação do tecido muscular esquelético (Chen et al., 2006). Nove miRNAs pertencentes à família let-7 foram também encontrados em alta frequência. Esse resultado é similar ao encontrado em outras espécies, o que reforça que os miRNAs da família let-7 desempenham papéis regulatórios importantes em processos biológicos (Nielsen et al., 2012, Mondol et al., 2012, Wang et al; 2012).

Dentre os 394 pré-miRNAs desconhecidos, 17 foram expressos apenas no grupo controle com IBs. Já entre os conhecidos, 9 foram expressos apenas no grupo controle.

4.5.3 Identificação de miRNAs diferentemente expressos

Foram encontrados um total de 207 miRNAs diferentemente expressos (82 *upregulated* e 125 *downregulated*) entre os tabaquis sem IBs e com IBs (ver Apêndice). Destes, 37 foram identificados no banco de dados miRBase, enquanto os demais (i.e., 137) foram considerados como novos (Figura 23).

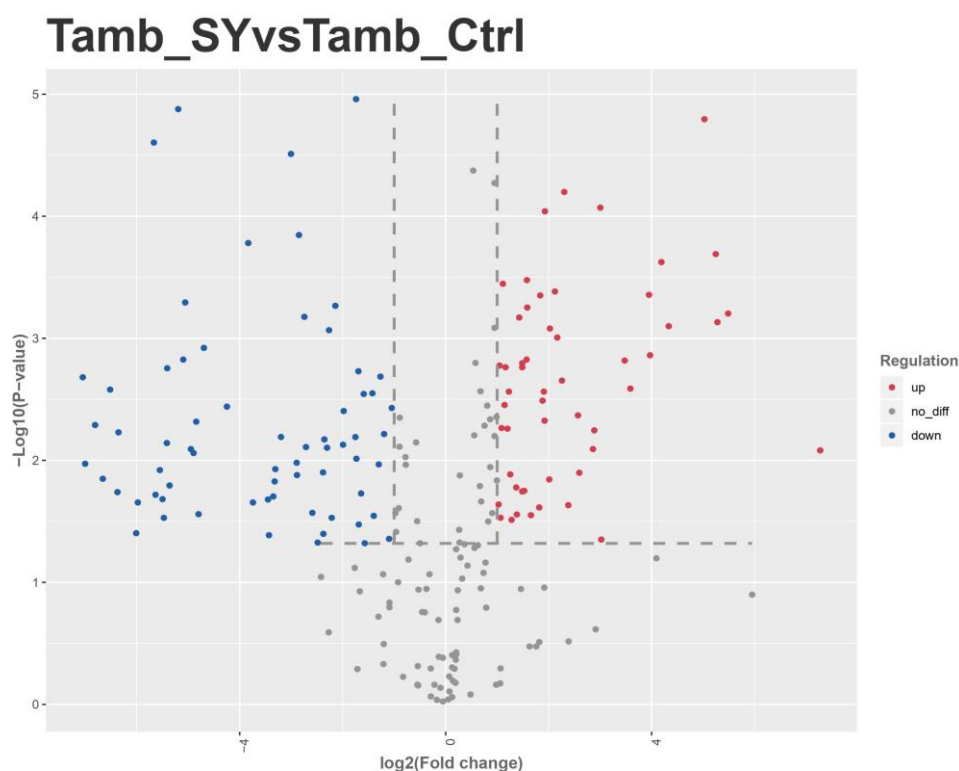


Figura 23: Gráfico de dispersão indicando todos os miRNAs encontrados no sequenciamento. Pontos em azul indicam os miRNAs *downregulated*; pontos em vermelho referem-se aos miRNAs *upregulated*; pontos em cinza correspondem aos miRNAs cuja expressão foi similar em ambos animais. A linha pontilhada horizontal indica p valor ($>0,05$), e a linha vertical demarca a separação entre os *downregulated* e os *upregulated*.

Dentre os miRNAs conservados e diferencialmente expressos, destaca-se o miR10-5p cuja expressão foi cerca de 10X superior no tabaqui sem IBs àquela observada no tabaqui com IBs. Outros miRNAs up-regulated no tabaqui sem IBs

e cujas funções regulatórias estão associadas à diferenciação de osteoblastos incluem miR-133a-3p, miR-100-5p e miR-125b (Quadro3).

Quadro 3: miRNAs destacados identificados e conservados que foram diferentemente expressos e encontrados em up-regulated nos animais sem IBs em relação aos com IBs

Nome	Sequência
miR10-5p	ACCCTGTAGAACCGAATTT
miR-133a-3p	TTGGTCCCCTTCAACCAGCTGT
miR-100-5p	AACCCGTAGATCCGAACCTTGTG
miR-125b	TCCCGGAGACCCTAACTTGTGA

Recentemente o miR-10-5p foi associado à regulação da diferenciação osteoblástica, caracterizando-se como um regulador negativo dessa via (Zhang et al., 2020). O bloqueio da expressão de miR-10-5p refletiu-se em um aumento significativo na diferenciação de osteoblastos levando à formação óssea *in vivo*. Considerando-se que este miRNA apresentou-se superexpresso no animal sem IBs, é possível que esteja contribuindo para a ausência de formação óssea no tecido estudado.

O mir-133a-3p inibe fortemente o *runx2b* (Zhang et al., 2011), principal fator de transcrição responsável por iniciar o processo de transcrição da linhagem osteoblástica (Wijnen et al., 2004 Rosen 2008). Esse miR foi inversamente expresso em relação ao *runx2b* no mutante sem IBs, sugerindo que possa atuar impedindo a diferenciação de osteoblastos.

Ensaio com osteoblastos em diferentes estágios de diferenciação foram realizados por Zeng et al. (2012), e quando superexpresso o miR-100 causou a inibição da diferenciação osteogênica, e no momento em que inibiu-se a sua ação, aumentou o potencial osteogênico das células. Este miR tem como alvos alguns membros da família BMP. Levando-se em consideração que o miR-100 foi encontrado altamente expresso no tambaqui sem IBs, é possível que esteja envolvido nas vias de formação das espinhas, ausentes nesse fenótipo mutante.

Analisando a expressão do miR-125b em células diferenciadas em osteoblastos induzidas por *bmp4*, Mizuno et al., (2008), sugeriram forte envolvimento desse miR na diferenciação de osteoblastos por meio da regulação da proliferação celular.

Entre os miRNAs não descritos e diferencialmente expressos, selecionamos alguns candidatos potencialmente atuantes nas vias de formação dos IBs, baseado em sua alta expressão comparado aos animais que apresentam os IBs. Destacamos o novo miRNA identificado nomeado PC-3p-678_3988, que apresentou uma média de leitura 10 vezes superior no tambaqui sem IBs., assim como os miRNAs novos PC-5p-255_18998, PC-5p-59_115607, PC-5p-67_105015 e PC-3p-1_11948913, cujos *heat maps* estão disponibilizados como material suplementar (ver Apêndice). Todos apresentaram-se *upregulated* e tiveram uma diferença de leituras encontradas relativamente alta no tambaqui sem IBs em comparação aos animais com essas estruturas. Esses miRNAs são bons candidatos para trabalhos futuros de caracterização do papel dos miRNAs na via de ossificação dos IBs (Quadro4).

Quadro 4: miRNAs identificados destacados, mas não descritos que foram diferentemente expressos e encontrados em up-reguleted nos animais sem IBs em relação aos com IBs.

Nome	Sequência
PC-3p-678_3988	ACAAATACGACTCTACAGGAAT
PC-5p-255_18998	TCTCCCAATCCTTGTACCAGTGT
PC-5p-59_115607	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG
PC-5p-67_105015	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
PC-3p-1_11948913	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT

5. CONCLUSÃO

Os ossos intermusculares (IBs) são estruturas consideradas indesejáveis na comercialização de peixes, por isso a importância de aplicações de tecnologias com objetivo de reduzir e até mesmo suprimir o nascimento dessas estruturas. Logo uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de regulação envolvidos no desenvolvimento dessas estruturas é fundamental. Padrões interessantes na expressão de genes considerados chave na via de formação desses IBs nos dão um norte do que pode está acontecendo nos alevinos originados do acasalamento entre as matrizes sem os IBs, e junto com miRNAs conservados e novos que foram identificados teremos subsídios para trabalhos futuros visando a produção de

linhagens de tambaqui sem IBs, com grande potencial para melhoria de produtividade na aquicultura.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas tecnologias vêm sendo empregadas para compreender como de fato se dá a formação dos ossos intermusculares (IBs). Este um dos primeiros estudos onde foi avaliada a expressão relativa de genes envolvidos na formação óssea em famílias de peixes em estágios de desenvolvimento inicial, originados do acasalamento de matrizes que não apresentam os IBs, e do primeiro miR-seq de tambaqui com fenótipo mutante desprovido dos ossos intermusculares em seu tecido muscular.

Destaca-se também que estamos investigando uma espécie neotropical e nativa do Brasil, com grande valor econômico agregado, em nível nacional e internacional.

Programas de melhoramento que visam reduzir ou até mesmo inibir o crescimento dos IBs estão sendo desenvolvidos por acasalamentos seletivos e direcionados, mas até então sem sucesso. Por este motivo, nossos achados podem contribuir para um melhor direcionamento nas técnicas de silenciamento que já estão sendo realizadas por nosso e por outros grupos de pesquisa.

Embora ainda não sejamos capazes de elucidar como se dá a herança e manifestação do fenótipo "sem IBs" nos tambaquis e demais peixes que os possuem, acreditamos que mecanismos moleculares sejam a chave e estamos no caminho para desvendá-los.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, F. L.; Lopes, J. S.; Crescencio, R.; Izel, A. C. U.; Chagas, E. C.; Boijink, C. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, 452, 224-232, 2016. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
- Araújo-Lima, C. A. R. M., & Goulding, M. (1998). Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. *Tefé: Sociedade Civil Mamirauá*.
- Banerjee, C., Javed, A., Choi, J. Y., Green, J., Rosen, V., Van Wijnen, A. J., ... & Stein, G. S. (2001). Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology*, 142(9), 4026-4039.
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan micornas. *Cell*, 173(1), 20-51.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.
- Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 846-860.
- Bizuayehu, T. T., Johansen, S. D., Puvanendran, V., Toften, H., & Babiak, I. (2015). Temperature during early development has long-term effects on microRNA expression in Atlantic cod. *BMC genomics*, 16(1), 1-12.
- Bowser, M., Herberg, S., Arounleut, P., Shi, X., Fulzele, S., Hill, W. D., ... & Hamrick, M. W. (2013). Effects of the activin A–myostatin–follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells. *Experimental gerontology*, 48(2), 290-297.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA–target recognition. *PLoS biol*, 3(3), e85.
- Canalis, E., Economides, A. N., & Gazzerro, E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine reviews*, 24(2), 218-235.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. O papel do microRNA-1 e microRNA-133 na proliferação e diferenciação do músculo esquelético. *Nat Genet*. 2006; 38 (2): 228–233. doi: 10.1038 / ng1725.

- Christodoulou, Foteini et al. Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature*, v. 463, n. 7284, p. 1084, 2010.
- Chu, C. Y., & Rana, T. M. (2007). Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of cellular physiology*, 213(2), 412-419.
- Arbeláez-Rojas, G. A., Fracalossi, D. M., & Fim, J. D. I. (2002). Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(3), 1059-1069.
- Dairiki, J. & Silva, T.B.A.. Revisão de literatura: exigências nutricionais do tambaqui – compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. – Manaus: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA Amazônia Ocidental, 2011.44 p. - (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 91).
- Danos, N., Ward A.B. The homology and origins of intermuscular bones in fishes: phylogenetic or biomechanical determinants? *Biol. J. Linn. So*, v.106, p.607-622, 2012.
- Devlin, John W. et al. Efficacy and safety of quetiapine in critically ill patients with delirium: a prospective, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Critical care medicine*, v. 38, n. 2, p. 419-427, 2010.
- Doench, John G.; SHARP, Phillip A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development*, v. 18, n. 5, p. 504-511, 2004.
- Ducy , P. ,Zhang , R. ,Geoffroy , V. ,Ridall , AL eKarsenty , G.(1997). Osf2 / Cbfa1: um ativador transcricional da diferenciação de osteoblastos . *Celular* 89 , 747 - 754 . doi: 10.1016 / S0092-8674 (00) 80257-3.
- Elkasrawy, M. N., and Hamrick, M. W. (2010) Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10, 56-63.
- Fang, L.; Li, X. A review of research on intermuscular bone formation in lower teleosts. *Fish.Sci.* 2013, 32, 749–752.
- Filipowicz, Witold, Suvendra N. Bhattacharyya, and Nahum Sonenberg. "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?." *Nature reviews genetics* 9.2 (2008): 102-114.
- Garcez, R. C. S.; Freitas, C. E. C. Seasonal catch distribution of tambaqui (*Colossoma macropomum*), Characidae in a central Amazon floodplain lake: implications for sustainable fisheries management. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 27, n. 1, p. 118-121. 2010.
- Gazzerro, E., & Canalis, E. (2006). Proteínas morfogenéticas ósseas e seus antagonistas. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* , 7 (1-2), 51-65.

- Ge, C., Xiao, G., Jiang, D. I., & Franceschi, R. T. (2007). Critical role of the extracellular signal-regulated kinase–MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *The Journal of cell biology*, 176(5), 709-718.
- Gemballa, Sven et al. Transformações evolutivas de tendões mioseptais em gnathostomos. Proceedings of the Royal Society of London. Série B: Ciências Biológicas, v. 270, n. 1521, pág. 1229-1235, 2003.
- Gemballa, S. and Britz, R. (1998). Homology of intermuscular bones in acanthomorph fishes. *Am. Mus. Novitat.* 3241,1-25.
- Gomes, Fátima et al. Identification and characterization of the expression profile of the microRNAs in the Amazon species *Colossoma macropomum* by next generation sequencing. *Genomics*, v. 109, n. 2, p. 67- 74, 2017.
- Grobet, L., et.al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle, *Nature Genetics*, v.17, p.71–74. 1997.
- Großhans, Helge; Filipowicz, Witold. Proteomics joins the search for microRNA targets. *Cell*, v. 134, n. 4, p. 560-562, 2008.
- H. Ke The artificial reproduction and culture experiment of blunt snout bream *Acta Hydrobiol Sin.*, 5 (1965), pp. 282-283.
- Hall B.K. The embryonic development of bone. *Am. Sci.* 1988; 76:174–181.
- Hamrick MW, Pennington C, Byron CD. 2003. Arquitetura óssea e degeneração do disco na coluna lombar de camundongos sem GDF-8 (miostatina). *J Orthop Res* 21 : 1025 - 1032 .
- Hamrick, M. W. (2012) The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle-bone crosstalk. *Bonekey Rep* 1, 60.
- Harvey B, Carolsfeld J. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: IDRC, 1993. p.144.
- Hashimoto, Diogo T. et al. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. *Reviews in Aquaculture*, v. 4, n. 2, p. 108-118, 2012.
- Hauser, Robert M.; Featherman, David L. The process of stratification: Trends and analyses. Elsevier, 2013.
- Heimberg, Richard G.; Brozovich, Faith A.; Rapee, Ronald M. A cognitive behavioral model of social anxiety disorder: Update and extension. In: *Social anxiety*. Academic Press, 2010. p. 395-422.
- Herkenhoff, Marcos E. et al. Fishing into the MicroRNA transcriptome. *Frontiers in genetics*, v. 9, p. 88, 2018. Gomes, Fátima et al. Identification and characterization of the expression profile of the microRNAs in the Amazon species *Colossoma*

- macropomum by next generation sequencing. *Genomics*, v. 109, n. 2, p. 67-74, 2017.
- Hobert, O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science*, v.319, p.1785–1786. 2008.
- Huang, T, et al. Using GeneReg to construct time delay gene regulatory networks. *BMC Res Notes*, v.3, n.1, p.142. 2010.
- Huysseune Skeletal system G.K. Ostrander (Ed.), *The Laboratory Fish. Part 4. Microscopic Functional Anatomy*, Academic Press, San Diego (2000), pp. 307-317.
- Jiang, Y.; Yang, L.; Bao, B. The epicentrals in several lower teleosts. *J. Shanghai Fish. Univ.* 2008, 17, 493–496.
- Jiang, Zong-Yuan et al. Downregulation of miR-223 and miR-19a induces differentiation and promotes recruitment of osteoclast cells in giant-cell tumor of the bone via the Runx2/TWIST-RANK/RANKL pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 505, n. 4, p. 1003-1009, 2018.
- Kague, E., Roy, P., Asselin, G., Hu, G., Simonet, J., Stanley, A., Albertson, C. and Fisher, S. Osterix/Sp7 limits cranial bone initiation sites and is required for formation of sutures *Developmental biology*, v.413, p.160-172. 2016.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., Bass, J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, v.7, p.910–916. 1997.
- Karsenty G., Wagner E.F. Reaching agenetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell.* 2002; 2:389–406. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00157-0.
- Kloosterman, Wigard P. et al. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS biology*, v. 5, n. 8, p. e203, 2007.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, RT, Gao, Y.-H., Inada, M. et al. (1997). A interrupção direcionada de Cbfa1 resulta em uma falta completa de formação óssea devido à parada maturacional dos osteoblastos. *Célula* 89, 755 - 764. doi: 10.1016 / S0092-8674 (00) 80258-5.
- Komori, T. et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *cell*, v. 89, n. 5, p. 755-764, 1997.
- LEE, Soon-Tae et al. Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Experimental neurology*, v. 227, n. 1, p. 172-179, 2011.
- Lee, Yong Sun et al. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes & development*, v. 23, n. 22, p. 2639-2649, 2009.

- Li, L., Zhong, Z., Zeng, M., Liur, S., Zhou, Y., Xiao, J., Wang, J., Liu, Y. Comparative analysis of intermuscular bones in fish of different ploidies. *Science China Life Sciences*, v.56, n.4, p.341-350. 2013.
- Lim, Jae Joon et al. Association of miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *PloS one*, v. 11, n. 7, p. e0159756, 2016.
- Lim, Kian-Huat; Counter, Christopher M. Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. *Cancer cell*, v. 8, n. 5, p. 381-392, 2005.
- Lima CA & Gooulinng M (1998) Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá, 1998; Brasília: CNPq, pp. 8-20.
- Lima, A. F.; Moro, G. V.; Kirschnik, L. N. G.; Barroso, R. M. Engorda de peixes. In: RODRIGUES, A. P. O... [et al] (Editores técnicos). *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Embrapa Pesca e Aquicultura. Brasília, DF:
- Embrapa, 2013b. 440 p. 1ª edição ISBN 978-85-7035-272-9 CDD 639.3.
- Lin, S., Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews Câncer*. 2015. 15(6), 321.
- LIU, Han et al. The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet. *GigaScience*, v. 6, n. 7, p. gix039, 2017.
- Liu, Ning; Olson, Eric N. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Developmental cell*, v. 18, n. 4, p. 510-525, 2010.
- Lopes Taís da Silva. Osteogênese, vitamina A e anomalias esqueléticas em larva de Pacu, (*Piaractus mesopotamicus*). 2014. xiii, 147 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/113991>.
- M. Wan, X. Cao BMP signaling in skeletal development *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328 (2005), pp. 651-657.
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M. K., Torrekens, S., Roth, S. I., Mackem, S., Carmeliet, G. and Kronenberg, H. M. (2010). Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev. Cell* 19, 329-344. doi:10.1016/j.devcel.2010.07.010.
- Mello, F. O.; Ribeiro, C. A. L.; Resende, R. P.; Emiko K., Povh, J. A.; Fornari, D. C.; Barreto, R. V.; mcmanus, C.; e streit JR, D. Growth curve by Gompertz non linear regression model in female and males in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87(4), 2309-2315. Epub 27 de novembro de 2015. Disponível em <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140315>.

- Melo, L.A.S.; Izel, A.C.U.; Rodrigues, F. M. Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no estado do Amazonas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 25p, 2001.
- Mendias CL, Bakhurin KI, Faulkner JA. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 8;105(1):388–393.
- Mendonça, P.P., Ferreira, R.A., Junior, M.V. Vidal; Andrade, D.R., Santos, M.V.D., Ferreira, A.V. & Rezende, F.P. 2009. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Archivos de Zootecnia*, 58, 323-
- Mizuno, Yosuke, et al. "miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation." *Biochemical and biophysical research communications* 368.2 (2008): 267-272.
- Mondol, Vanessa, and Amy E. Pasquinelli. "Let's make it happen: the role of let-7 microRNA in development." *Current topics in developmental biology*. Vol. 99. Academic Press, 2012. 1-30.
- MOSS, Melvin L. Studies of the acellular bone of teleost fish. *Cells Tissues Organs*, v. 46, n. 4, p. 343-362, 1961.
- Nachtigall, Pedro G. et al. MicroRNA-499 expression distinctively correlates to target genes sox6 and rod1 profiles to resolve the skeletal muscle phenotype in Nile tilapia. *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0119804, 2015.
- Nakashima , K. ,Zhou , X. ,Kunkel , G. ,Zhang , Z. ,Deng , JM ,Behringer , RR ede Crombrugghe , B.(2002). O novo fator de transcrição osterix contendo dedo de zinco é necessário para a diferenciação de osteoblastos e formação óssea . *Celular* 108 , 17 - 29 . doi: 10.1016 / S0092-8674 (01) 00622-5.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., Crombrugghe, B. The novel NI, Zhe et al. Expression of miR-206 in human knee articular chondrocytes and effects of miR-206 on proliferation and apoptosis of articular chondrocytes. *The American journal of the medical sciences*, v. 355, n. 3, p. 240-246, 2018.
- Nelder, J. A., & Wedderburn, R. W. (1972). Generalized linear models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series A (General)*, 135(3), 370-384.
- Nie, C., Wan, S., Chen, Y., Zhu, D., Wang, X., Dong, X., & Gao, ZX (2020). A perda da escleraxia leva à redução distinta do osso intermuscular mineralizado no peixe-zebra. *Aquicultura e Pesca* .
- Nielsen, M., et al. "MicroRNA identity and abundance in porcine skeletal muscles determined by deep sequencing." *Animal genetics* 41.2 (2010): 159-168.

- Nursall, J.R. The Lateral Musculature and the Swimming of Fish. *Proceedings of the Zoological Society of London*, v.126, p.127-143. 1956.
- OH, Jung-Hoon et al. Chondrocyte-specific ablation of Osterix leads to impaired endochondral ossification. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 418, n. 4, p. 634-640, 2012.
- Olena, Abigail F.; Patton, James G. Genomic organization of microRNAs. *Journal of cellular physiology*, v. 222, n. 3, p. 540-545, 2010.
- Ørom, Ulf Andersson; NIELSEN, Finn Cilius; LUND, Anders H. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular cell*, v. 30, n. 4, p. 460-471, 2008.
- Owen, R. (1866). *On the anatomy of vertebrates* (Vol. 2). Longmans.
- Owen, R. (1846). *Fishes and Reptiles, The Anatomy of Vertebrates*. London: Longmans, Green and Co Owen, R. (1866). *Lectures on the Comparative Anatomy and Physiology of the Vertebrate Animals*. London: Longmans, Green and Co.
- Papaioannou, G., Mirzamohammadi, F., Kobayashi, T. MicroRNAs involved in bone formation. *Cell Mol Patterson, C.; Johnson, G. Intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes. Smithson Contrib. Zool.*1995, 559, 1–85.
- GOMES, P.F., Desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*), da pirapitinga (*Piaractus brachypomum*) e do híbrido tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomum*) mantidos em viveiros.
- Penna, M. A. H.; Villacorta-Corrêa, M. A.; Walter, T.; Petrere Junior, M. Growth of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Characiformes: Characidae): which is the best model? *Brazilian Journal of Biology*, v. 65, n. 1, p. 129-139, 2005.
- Perazza, C. A., de Menezes, J. T. B., Ferraz, J. B. S. & Hilsdorf, A. W. S. Lack of /intermuscular bones in specimens of *Colossoma macropomum*: An unusual phenotype to be incorporated into genetic improvement programs. *Aquaculture* (2016).
- Pfaffl, MW (2001). Um novo modelo matemático para quantificação relativa em RT-PCR em tempo real *Nucleic Acids Res* 29: e45. *Encontre este artigo online* .
- Pinhal D, Bovolenta LA, Moxon S, et al. Genome-wide microRNA screening in Nile tilapia reveals pervasive isomiRs' transcription, sex-biased arm switching and increasing complexity of expression. throughout development. *Scientific Reports*. 2018;8:8248.
- Pinto, Samuel K. et al. Expression of microRNAs and target proteins in skeletal muscle of rats selectively bred for high and low running capacity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 313, n. 3, p. E335-E343, 2017.

- Portal Embrapa (Versão 3.92.1) p03 acesso: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/54234807/publicacao-analisa-exportacoes-da-piscicultura-brasileira>, em 01/08/2020.
- Qin, Y., et al. Myostatin Inhibits Osteoblastic Differentiation by Suppressing Osteocyte-derived Exosomal microRNA-218: A Novel Mechanism in Muscle-Bone Communication. *J. Biol. Chem.* 2017.
- Rashid, Harunur et al. Sp7 and Runx2 molecular complex synergistically regulate expression of target genes. *Connective tissue research*, v. 55, n. sup1, p. 83-87, 2014.
- Reczko, Martin et al. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics*, v. 28, n. 6, p. 771-776, 2012.
- Renn, J., Winkler, C. Osterix/Sp7 regulates biomineralization of otoliths and bone in medaka (*Oryzias latipes*) *Matrix Biol.* v.34, p.193–204. 2014.
- Rittweger, J., Beller, G., Ehrig, J., Jung, C., Koch, U., Ramolla, J., ... & Felsenberg, D. (2000). Bone-muscle strength indices for the human lower leg. *Bone*, 27(2), 319-326.
- Rosen CJ: Bone remodeling, energy metabolism, and the molecular clock. *Cell Metab.* 7:7–10. 2008
- Roush, Sarah, and Frank J. Slack. "The let-7 family of microRNAs." *Trends in cell biology* 18.10 (2008): 505-516.
- S.M. Wan, S.Kui Yi, J. Zhong, W.M. Wang, E.M. Jiang, B.X. Chen, Z.X. Gao Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala* *Acta Hydrobiol. Sin.*, 38 (2014), pp. 1143-1151.
- Santos, E. F. et al. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no Estado do Amapá, Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, v. 43, n. 1, p. 105-112. 2013.
- Santos, G. M.; Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S. Peixes comerciais de Manaus. In: Geraldo (Ed.). – Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006. p. 144, il. ISBN 85-7300-211-5.
- Santos, Geraldo Mendes dos; FERREIRA, Efrem JG; ZUANON, Jansen AS. Peixes comerciais de Manaus. Editora INPA, 2009.
- Sartori, Roberta; SANDRI, Marco. BMPs and the muscle–bone connection. *Bone*, v. 80, p. 37-42, 2015.
- Schnall-Levin, Michael et al. Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3' UTRs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 36, p. 15751-15756, 2010.

- Streit, J. R. D. P.; Povh J, A.; Fornari, D. C.; Galo, J. M.; Guerreiro L. R. J.; OLIVEIRA, D. Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui. Embrapa, 29, 2012. Documento 212.
- Su, Shengyan; Dong, Zaijie. Comparative expression analyses of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) expressions in muscles of tilapia and common carp indicate that BMP4 plays a role in the intermuscular bone distribution in a dose-dependent manner. *Gene expression patterns*, v. 27, p. 106-113, 2018.
- Sun, Q., Liu, L., Wang, H., Mandal, J., Khan, P., Hostettler, K. E., ... & Lu, S. (2017). Constitutive high expression of protein arginine methyltransferase 1 in asthmatic airway smooth muscle cells is caused by reduced microRNA-19a expression and leads to enhanced remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(2), 510-524.
- Takacs, Carter M.; Giraldez, Antonio J. miR-430 regulates oriented cell division during neural tube development in zebrafish. *Developmental biology*, v. 409, n. 2, p. 442-450, 2016.
- Takarada, T., Nakazato, R., Tsuchikane, A., Fujikawa, K., Iezaki, T., Yoneda, Y., & Hinoi, E. (2016). Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Development*, 143(2), 211-218.
- Takeda, S., Bonnamy, J.P., Owen, M.J., Ducky, P., Karsenty, G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes & Dev*, v.15, p.467–481. 2001.
- Thatcher, Robert W.; North, D. M.; Biver, C. J. Intelligence and EEG phase reset: a two compartmental model of phase shift and lock. *NeuroImage*, v. 42, n. 4, p. 1639-1653, 2008.
- Timpson, N.J., et al. Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood. *Hum Mol Genet*, v.18, p.1510–7. 2009.
- Van Wijnen, AJ, Stein, GS, Gergen, JP, Groner, Y., Hiebert, SW, Ito, Y., ... & Speck, N. (2004). Nomenclatura para proteínas relacionadas a Runt (RUNX). *Oncogene* , 23 (24), 4209-4210.
- Verônica Matoso Maciel de Carvalho, E. (2007). Abordagens biotecnológicas do Tambaqui (*Colossoma macropomum*).Arbelaéz-Rojas G.A., Fracalossi D.M. & Fim J.I. 2002.
- Vimalraj, S., Arumugam, B., Miranda, P. J., & Selvamurugan, N. (2015). Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *International journal of biological macromolecules*, 78, 202-208.

- W.J. Yao, X.L. Gong, Y.P. Lü, B.L. Bao The ossificational process of the intermuscular bones in *Anguilla japonica* J. Shanghai Ocean Univ., 23 (2014), pp. 810-813.
- Wagner, EF Funções de AP1 (Fos / Jun) no desenvolvimento ósseo. Anais das doenças reumáticas , v. 61, n. suplemento 2, pág. ii40-ii42, 2002.
- Wan, M., & Cao, X. (2005). Sinalização BMP no desenvolvimento esquelético. *Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica* , 328 (3), 651-657.
- Wan, Shi-Ming et al. Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). Scientific reports, v. 6, p. 31050, 2016.
- Wan, Shi-Ming et al. Identification of microRNA for intermuscular bone development in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). International journal of molecular sciences, v. 16, n. 5, p. 10686-10703, 2015.
- Wan, X., et al. The functional sites of miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell WANG, Chengde et al. microRNA expression profile and differentially-expressed genes in prolactinomas following bromocriptine treatment. Oncology reports, v. 27, n. 5, p. 1312-1320, 2012.
- Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Wang, X., Liu, N., & You, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett* 3 (5): 955–960.
- Westendorf, Jennifer J.; Hiebert, Scott W. Mammalian runt-domain proteins and their roles in hematopoiesis, osteogenesis, and leukemia. *Journal of cellular biochemistry*, v. 75, n. S32, p. 51-58, 1999.
- Witten, P., Huysseune, A., Franz-Odenaal, T., Fedak, T., Vickaryous, M., Cole, A., & Hall, B. K. (2004). Acellular teleost bone: primitive or derived, dead or alive?. *The Palaeontology Newsletter*, 55, 37-41.
- Woynarovich, E. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/ Codevasf/CNPq, 1983.
- Xie, C. Ichthyology (M) China Agricultural Press; Beijing, China: 2010. pp. 56–57.
- Y.P. Lü, J. Chen, B.L. Bao, P.P. Huang The ossificational process of the intermuscular bones in *Hemibarbus labeo* J. Shanghai Ocean Uni., 21 (2012), pp. 549-553.
- Yap, W.G., Villaluz, A.C., Soriano, M.G.G., Santos, M.N. Milkfish production and processing technologies in the Philippines. Milkfish Project Publication Series, n.2, 96 pp. 2007.
- Yoshida, R., Higuchi, T., Imoto, S. A Mixed Factors Model for Dimension Reduction and Extraction of A Group Structure in Gene Expression Data, Proc. IEEE 3rd

Computational Systems Bioinformatics (CSB2004: Refereed Conference), p.161-172. 2004.

Z. Bing On the myoseptal spines of the carp (*Cyprinus carpio* L.) *Acta Zool. Sin.*, 14 (1962), pp. 175-178.

Zanatta, M., Valenti, M. T., Donatelli, L., Zucal, C., & Dalle Carbonare, L. (2012). Runx-2 gene expression is associated with age-related changes of bone mineral density in the healthy young-adult population. *Journal of bone and mineral metabolism*, 30(6), 706-714.

Zeng, Yang, et al. "MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMP2." *FEBS letters* 586.16 (2012): 2375-2381.

Zhang ZL, He JW, Qin YJ, Hu YQ, Li M, Zhang H, et al. Association between myostatin gene polymorphisms and peak BMD variation in Chinese nuclear families. *Osteoporos Int.* 2008 Jan;19(1):39–47.

Zhang, Wei-Zhuo et al. Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream. *Gene*, v. 642, p. 116-124, 2018.

Zhang, Y., Zhou, L., Zhang, Z., Ren, F., Chen, L., & Lan, Z. (2020). miR-10a-5p inhibits osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 22(1), 135-144.

Zhang, Ying, et al. "A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.24 (2011): 9863-9868.

Zhao, J., et al. BMD-associated variation at the Osterix locus is correlated with childhood obesity in females. *Obesity (Silver Spring)*, v.19, p.1311–1314. 2011.

Zhao, Yong et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, v. 129, n. 2, p. 303-317, 2007.

Zhou, Honglei; RIGOUTSOS, Isidore. MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. *Rna*, v. 20, n. 9, p. 1431-1439, 2014.