



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Dissertação

**PERFIL DE EXPRESSÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE
MICRORNAS MÚSCULO-ESPECÍFICOS NA TILÁPIA DO NILO**
Oreochromis niloticus

Pedro Gabriel Nachtigall

Botucatu - SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**PERFIL DE EXPRESSÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE
MICRORNAS MÚSCULO-ESPECÍFICOS NA TILÁPIA DO NILO**
Oreochromis niloticus

Mestrando: Pedro Gabriel Nachtigall

Orientador: Prof. Dr. Danillo Pinhal

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO**

Nachtigall, Pedro Gabriel.

Perfil de expressão e organização genômica de microRNAs músculo-específicos na tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* / Pedro Gabriel Nachtigall.
- Botucatu, 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danillo Pinhal

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Tilápia (Peixe). 3. Ácido ribonucleico. 4. Genética molecular. 5. Genética – Expressão.

Palavras-chave: Dinâmica evolutiva; Expressão; MicroRNA; Organização genômica; Peixes.

Dedico este trabalho à minha mãe Regina, por ter realizado dois papéis, o de pai e o de mãe, por ser um ótimo exemplo, por sempre me apoiar em todas as decisões, por me auxiliar e sustentar em todos os passos da minha vida, inclusive nos primeiros passos, e por todo o amor incondicional. Você é a melhor mãe do mundo.

Amo você.

Agradeço:

A Deus, pela segurança e conforto sustentado no desenvolver do meu caminho.

À minha avó (Terezinha) e meu falecido avô (Washington), pelo eterno carinho e grande exemplo de vida. Vocês estarão vivos na minha memória para sempre.

Ao meu tio, tias, primas e minha irmã Fernanda, que sempre estiveram ao meu lado e me ajudam a seguir com muita sagacidade por essa vida mais linda de meu Deus.

À Ariane (Mibella), pelo carinho, felicidade, paciência e apoio incondicional. Te amo muito.

Ao Dr. Marcos Correa Dias (Spike) pela amizade, trapalhadas e auxílio durante o todo o período de realização de experimentos (laboratoriais, churrascais e jogadas de Xbox).

Ao meu orientador Prof. Dr. Danillo Pinhal pelas conversas, broncas, risadas, discussões, oportunidade, incentivo, amizade e por sempre apoiar e manter os pés no chão por mim.

Ao meu ex-orientador Prof. Dr. Cesar Martins, pela oportunidade inicial, paciência e insistência em me fazer melhorar e acreditar mais em mim profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Robson F. Carvalho pela colaboração, apoio e instruções iniciais à metodologia utilizada no presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre W. S. Hilsdorf por fornecer os exemplares da tilapia do Nilo utilizados, além das dicas para manutenção de peixes em aquários.

Aos Professores Paulo E. M. Ribolla e Claudia A. Rainho pela contribuição como banca examinadora do exame geral de qualificação.

A todo o pessoal (novos e antigos) do Laboratório Genômica Integrativa onde realizei parte do estudo: Rafael (Taka), Bruno, Guilherme (Cabelo), Marcos, Diogo, Juliana Mazzuchelli e Sárah.

A todo o pessoal do Laboratório de Genética e Evolução Animal onde realizei a parte final do estudo e, do qual, sou parte integrante: Valquíria, Arthur (Messi), Helder, Prof^a. Adriane, Prof^a. Lígia, Prof. Guaracy, Jesica, Bianca e Magali.

Aos colegas Geysson e Ederson pelo auxílio inicial na metodologia utilizada.

Aos colombianos adoráveis Juan, Fabíola, Gicela e Juan (Moretti) pelas risadas e aulas de salsa em momentos de encontro inesperado.

De maneira especial a um bando de babacas, que são os irmãos que a vida me deu: Elihu, Daniel (Frall), Danilo (Pinguim), Rafael Arruda (Mindu), Rafael Victor (Espeto),

Raphael Ferraz (PH), Jefferson (Jeff Sparrow) e Leonardo (Lééééé), muito obrigado pela amizade e colaboração em todos os momentos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética e do Departamento de Morfologia.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação por todas as dúvidas esclarecidas.

Ao Laboratório de Genética e Evolução Animal, ao Departamento de Genética, à Pós-graduação em Genética, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida no período de estudo.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

À todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização e finalização deste trabalho.

*“Cause I am due for a miracle
I'm waiting for a sign
I'll stare straight into the sun
And I won't close my eyes
'Till I understand or go blind”*

Dustin Kensrue

RESUMO

MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica em diversas vias celulares específicas. Recentemente, alguns miRNAs de ação músculo-específica, especialmente aqueles expressos no músculo estriado esquelético, têm sido associados à regulação da biologia muscular, com papel fundamental no controle de eventos como miogênese e crescimento muscular hipertrófico e hiperplásico, além de constituírem vias metabólicas extremamente conservadas entre os vertebrados. A tilápia do Nilo é considerada um excelente modelo biológico para o estudo de miRNAs em vertebrados devido à sua importância econômica e por apresentar o genoma completo sequenciado. Contudo, pouco é conhecido a respeito da dinâmica evolutiva de miRNAs e sua potencial atuação na regulação dos mecanismos moleculares promotores do desenvolvimento do tecido muscular na espécie. Assim, foram realizados dois estudos direcionados para a (i) avaliação do perfil de expressão de miRNAs músculo-específicos e seus alvos no tecido muscular de adultos da tilápia do Nilo, e para (ii) analisar o padrão de organização genômica desses miRNAs em diferentes espécies de peixes e estabelecer comparações com outros grupos de vertebrados. Os principais resultados obtidos na análise do perfil de expressão no tecido muscular esquelético de cinco miRNAs músculo-específicos (miR-1, -133a, -133b, -206 e -499) evidenciaram um alto nível de expressão do miR-499 no músculo vermelho em comparação aos níveis observados no músculo branco. Esses dados, corroborados pela hibridação *in situ* e análise da expressão de genes alvo do miR-499, sugerem sua participação como elemento central na regulação de vias metabólicas particularmente ativas no músculo de contração lenta (vermelho) na tilápia do Nilo. De modo geral, as análises genômicas comparativas mostraram um padrão de organização genômica conservado para os miRNAs músculo-específicos (miR-1-1/-133a-2, miR-1-2/133a-1, miR-206/133b, miR-214 e miR-499) e suas regiões flanqueadoras nas seis espécies de peixes analisadas. Porém, uma cópia paráloga do miR-214 foi somente detectada no genoma das espécies de peixes pertencentes à superordem Acanthopterygii. Esta cópia paráloga apresentou um alto grau de sintonia nessas espécies. O conjunto de dados obtidos até o momento contribui para elucidar o papel exercido por miRNAs músculo-específicos em vias biológicas do tecido muscular na tilápia do Nilo, além de permitir novas inferências acerca da dinâmica evolutiva desses miRNAs no genoma de peixes.

Palavras-chave: microRNA; expressão gênica; peixes; organização genômica.

ABSTRACT

MicroRNAs are small RNA molecules that post-transcriptionally regulate gene expression in various specific cell pathways. Recently, some miRNAs have been described to have a muscle-specific action and has been associated with regulation of muscle biology with fundamental roles in myogenesis. The Nile tilapia is considered an excellent biological model for the study of miRNAs in vertebrates due to their economic importance and to present the complete genome sequenced. However, little is known about the evolutionary dynamics of miRNAs and their potential role in regulating the molecular mechanisms that promote the muscle development on Nile tilapia. Thus, two studies were conducted: (i) a study to evaluate the expression pattern of muscle-specific miRNAs and their targets in different skeletal muscle types in adults of Nile tilapia, and (ii) a study to analyze the comparative evolutionary dynamics and genomic organization of these miRNAs in fish genomes. Our expression analysis by qPCR and *in situ* hybridization, carried out on five muscle-specific miRNAs (miR-1, -133a, -133b, -206 and -499), revealed a highly differential expression of miR-499 in red skeletal muscle (slow-twitch). These data evidenced the key role played by the miR-499 in the maintenance of the slow-twitch muscle type in Nile tilapia. The comparative genomic analysis performed on six species of fish showed a conserved dynamism for the muscle-specific miRNAs analyzed (miR-1-1/-133a-2, miR-1-2/133a-1, miR-206/133b, miR-214 e miR-499). However, a copy of miR-214 was detected in the genome of five species belonging to the superorder Acanthopterygii. Interestingly, this copy also has a high level of synteny over the species when it was detected. Thus, the obtained data may assist in the understanding of the role of muscle-specific miRNAs in muscle biological pathways of Nile tilapia as well as contribute to better clarify the the evolutionary dynamics of miRNAs in the genome of fish and bring new insights concerning miRNA evolution in vertebrate genomes.

Key-words: microRNA; gene expression profile; fish; genomic organization.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
EPÍGRAFE	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. REVISÃO DA LITERATURA	01
1.1. RNAs não-codificadores: os microRNAs.....	01
1.2. Características gerais dos microRNAs.....	03
1.2.1. Biogênese e mecanismo de ação	03
1.2.2. Organização genômica	04
1.3. MicroRNAs do músculo esquelético	08
1.4. Expressão diferencial de microRNAs.....	11
1.5. A tilápia do Nilo como organismo modelo	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Extração de RNA do músculo esquelético	17
3.2. Quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA	17
3.3. Síntese de cDNA dos miRNAs.....	21
3.4. PCR em tempo real quantitativa dos miRNAs	22
3.5. Síntese de cDNA do RNA total	23
3.6. PCR em tempo real quantitativa dos RNAs mensageiros alvo	24
3.7. Análise estatística dos dados de qPCR.....	24
3.8. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente de miRNAs.....	26
3.9. Análise genômica comparativa.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Análise da expressão gênica dos miRNAs	31
4.2. Expressão espacial dos miRNAs.	34
4.3. Predição de alvos e determinação de vias biológicas	37
4.4. Análise de expressão dos alvos do miR-499	40
4.5. Análise genômica comparativa.	45
5. CONCLUSÕES.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7. APÊNDICES	68

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. RNAs não-codificadores: os microRNAs

Por muito tempo as regiões não-codificadoras do genoma foram consideradas “lixo genético”, devido à ausência de informação para síntese de proteínas nessas sequências nucleotídicas. Atualmente, sabe-se que a propagação da informação genética é muito mais complexa e não segue o antigo dogma central da biologia baseado no simples fluxo DNA-RNA-Proteína, uma vez que a maior porção do transcriptoma produzido pelo genoma de eucariotos é composta por RNAs não-codificadores de proteínas (Hui e Bindereif, 2005; Nagalakshmi et al., 2008; Guttman et al., 2009). As recentes evidências científicas apontam ainda que, juntamente com as proteínas, os RNAs não-codificadores são capazes de coordenar o metabolismo celular e definir o fenótipo dos organismos.

A partir de 2005 tornou-se claro que os genomas de animais e plantas produzem uma abundância de RNAs não-codificadores com função regulatória (revisado por Mattick, 2009). Em humanos e outros mamíferos, por exemplo, os RNAs não-codificadores são transcritos de ambas as fitas do DNA, inclusive sobrepondo regiões promotoras e de RNAs mensageiros (Carninci et al., 2005; Kapranov et al., 2007). Esses RNAs não-codificadores regulam diversos mecanismos intracelulares por intermédio de uma variedade de interações RNA-DNA, RNA-RNA e RNA-proteína (Qi et al., 2006; Amaral et al., 2008).

De modo geral, os RNAs não-codificadores podem ser classificados em funcionais e reguladores. Entre os RNAs funcionais destacam-se o RNA transportador (tRNA), o RNA ribossomal (rRNA), o pequeno RNA nuclear (snRNA) e o pequeno RNA nucleolar (snoRNA). Dentre os RNAs reguladores destacam-se o microRNA (miRNA), o pequeno RNA de interferência (siRNA), o piwiRNA (piRNA) e

o longo RNA não-codificador (lncRNA), dentre outros (Costa, 2008; Zhou et al., 2010). Dessa ampla variedade de classes de RNAs não-codificadores, os miRNAs se tornaram alvo de grande interesse devido à associação observada entre a desregulação da expressão de miRNAs e o surgimento de alterações fenotípicas e de doenças (Bilen et al., 2006; Hammond, 2006; Chang e Mendell, 2007).

Embora os primeiros miRNAs tenham sido descritos em 1993 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993), apenas 7 anos depois confirmou-se a ampla distribuição desses pequenos RNAs no reino animal (Pasquinelli et al., 2000) e que representavam um novo nível nos processos de regulação gênica (Reinhart et al., 2000). Após essa redescoberta dos miRNAs, diversos estudos voltados à compreensão dos processos biológicos nos quais atuam direta ou indiretamente têm sido realizados.

A partir desses avanços e outros relacionados ao desenvolvimento de novas tecnologias moleculares de sequenciamento e análise de expressão, foi constatado que os miRNAs possuem um papel importante em diversos processos do desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular, carcinogênese, resposta imune, entre outros (Bartel e Chen, 2004; Wienholds et al., 2005; Garofalo e Croce, 2011). Além disso, análises filogenéticas dos miRNAs demonstraram um alto nível de conservação dessas moléculas entre todos os organismos metazoários já investigados e sugerem ainda a existência de correlação positiva entre número de genes de miRNAs e complexidade do organismo (Berezikov et al. 2006; Sempere et al., 2006; Lee et al., 2007; Prochnik et al. 2007; Heimberg et al., 2008; Peterson et al., 2009; Wheeler et al., 2009; Christodoulou et al., 2010; Campo-Paysaa et al., 2011). Por outro lado, miRNAs não conservados foram também detectados em vertebrados. Suspeita-se que esses miRNAs evolutivamente divergentes poderiam

desempenhar um papel diferente na manutenção da diversidade fenotípica entre os diferentes grupos de organismos (Plasterk, 2006; Lyson et al., 2011). Sendo assim, constata-se que estudos relacionados à análise da evolução da diversidade e regulação por miRNAs trazem significativas contribuições ao entendimento dos papéis biológicos diversos exercidos por esses pequenos RNAs não-codificadores.

1.2. Características gerais dos microRNAs

1.2.1. Biogênese e mecanismo de ação

A biogênese de um miRNA começa com a síntese de um longo transcrito primário conhecido como pri-miRNA (~110pb). Os pri-miRNAs são transcritos pelas RNAs polimerase II ou III (Lee et al., 2003; Cai et al., 2004; Kim, 2005; Borchert et al., 2006), possuem uma estrutura de *hairpin* (“grampo de cabelo”), que é essencial para o reconhecimento das enzimas de processamento de miRNAs. No núcleo, o pri-miRNA é processado para pré-miRNA (~70pb), pela ação da enzima Drosha (Landthaler et al., 2004; Zeng e Cullen, 2005; Han et al., 2006). A Drosha reconhece e cliva as extremidades de pequenas estruturas de RNA em forma de *hairpin* formadas durante o processo de transcrição (Lee et al., 2006). Após o processamento nuclear, cada pré-miRNA, é exportado para o citoplasma através da proteína Exportin-5 (Lund et al., 2004), que realiza o transporte de pequenos RNAs em forma de *hairpin* do núcleo para o citoplasma (Yi et al., 2003). O pré-miRNA é reconhecido pela enzima Dicer que cliva a região do loop, resultando em uma molécula de dupla fita de RNA (dsRNA; ~22pb). Esse processo recruta proteínas da família argonauta (Ago) para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Kim et al., 2009). O RISC se liga a uma das duas fitas do dsRNA para gerar o miRNA maduro (miR canônico ou miR-5p), que atua na regulação de um RNAm

alvo (Krutzfeldt et al., 2006), enquanto a outra fita (miR* ou miR-3p) é degradada ou também pode formar outro RISC e realizar a regulação de outro RNAm alvo (Rand et al., 2005; Yang et al., 2011).

Recentemente, foi descrita uma via alternativa de processamento de miRNAs independente do processamento pela Drosha. Nessa via, o pré-miRNA é, constitutivamente, o intron completo de um gene. O processamento para pré-miRNA ocorre pela maquinaria de *splicing* celular. Esses miRNAs que não necessitam da ação pela enzima Drosha são chamados de miRtrons (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007; ver Figura 1B).

Geralmente, o complexo miRISC (miRNA + RISC) interage com sítios ligantes da região 3'-UTR do RNAm alvo (Lim et al., 2005; Lee e Dutta, 2009), embora alguns poucos miRNAs descritos realizem o pareamento na região 5'-UTR (Bari et al., 2006). A interação entre o RNAm alvo e o complexo miRISC ocorre devido à complementaridade total ou parcial de uma seqüência de 5-7 nucleotídeos (região “seed”) do miRNA e do RNAm alvo (Sen e Blau, 2005; Lee e Dutta, 2009). A partir de algoritmos desenvolvidos para predição de alvos de miRNAs, estima-se que cada miRNA possa se ligar a muitos RNAs mensageiros, e que os RNAs mensageiros podem ter sua estabilidade ou tradução regulada por mais de um miRNA (Doench et al., 2004; Brennecke et al., 2005).

1.2.2. Organização genômica

Estudos iniciais mostraram que o let-7 é um miRNA conservado as entre espécies (Reinhart et al., 2000). Dados subsequentes descreveram a existência de um número variável de cópias parálogas desse miRNA em diversas espécies de metazoários (Pasquinelli et al., 2000; Griffiths-Jones, 2006; Thatcher et al., 2008). O

mapeamento da sequência precursora do let-7 e sua localização genômica em múltiplas espécies forneceu um *insight* inicial na descoberta de miRNAs utilizando ferramentas genômicas. Além disso, essas análises demonstraram a conservação da sequência do pré-let-7, auxiliando na compreensão da estrutura secundária de moléculas de RNA necessária para o processamento de pré-miRNAs em miRNAs maduros.

Concomitantemente à descoberta dos primeiros miRNAs, houve avanços significativos nas tecnologias de seqüenciamento de última geração e algoritmos de predição de genes, resultando no atual registro de mais de 22000 miRNAs em 150 espécies (maioria vertebrados) no banco de dados miRBase (ver www.mirbase.org). Atualmente, são conhecidos cerca de 1600, 855 e 450 miRNAs em humanos, ratos e *zebrafish*, respectivamente (*miRBase v19*; Agosto de 2012). Os miRNAs são nomeados como miR- mais números (ex: miR-133), entretanto, existem algumas exceções. Os miRNAs de sequências similares são geralmente distinguidos por uma letra adicional seguida do número (ex: miR-133a). Um miRNA comum a sequência madura idêntica pode aparecer em diferentes locus genômicos com diferentes sequências precursoras. Nesses casos, os diferentes genes de miRNAs são usualmente distinguidos por outro número adicional no final da sequência (ex: miR-133a-1). De acordo com os padrões de organização genômica, os genes de miRNAs podem ser classificados como: intergênicos, intrônicos e exônicos (Olena e Patton, 2010; Figura 1).

Os miRNAs intergênicos estão localizados em regiões distintas do genoma, possuem uma unidade transcricional independente, e podem ser monocitrônicos, quando possuem seus próprios promotores, ou policitrônicos, onde vários miRNAs clusterizados são transcritos como um aglomerado de transcritos primários e

compartilham o mesmo promotor. Algo em torno de 36% e 47% dos miRNAs intergênicos são clusterizados em *zebrafish*, camundongo e humano (Griffiths-Jones et al., 2008; Thatcher et al., 2008). De fato, existem 55 e 51 *clusters* de miRNAs na totalidade do genoma de humano e camundongo, respectivamente (Yuan et al., 2009). Um fato notável sobre os *clusters* é que eles contém representantes de diferentes famílias de miRNAs, ou seja, os miRNAs de um mesmo *cluster* podem reprimir diferentes RNAs mensageiros. De acordo com análises realizadas em redes de interação protéica, foi proposto que os miRNAs de um mesmo *cluster* realizam a regulação de RNAs mensageiros de proteínas que interagem entre si em uma mesma via metabólica (Yuan et al., 2009).

Em relação aos miRNAs intrônicos e exônicos, que correspondem a aproximadamente 50% dos genes de miRNAs em mamíferos, foi verificada a utilização de unidades transcricionais de outros genes (Rodriguez et al., 2004; Griffiths-Jones et al., 2008). Em *zebrafish*, apenas 13% dos miRNAs apresentam essa característica (Thatcher et al., 2008). Possivelmente, essa diferença entre teleósteos e mamíferos decorra da falta de anotações completas no genoma do *zebrafish*, visto que, neste aspecto, é esperada uma distribuição e organização genômica similar entre os vertebrados.

Os miRNAs intrônicos estão localizados nos introns de genes e também podem ser monocistrônicos ou policistrônicos. Além disso, os miRNAs intrônicos possuem um nível de expressão semelhante a de seus genes hospedeiros (Baskerville e Bartel, 2005; van Rooij et al., 2008, 2009; Wang et al., 2009). Alguns desses miRNAs estudados podem atuar na regulação dos reguladores de seus genes hospedeiros, na regulação de genes que inibem a via de ação de seu gene

hospedeiro; ou sobre genes que inibem regiões transcrpcionais de proteínas relacionadas (Barik, 2008; Van Rooij et al., 2008, 2009; Zhou e Lin, 2008).

Os miRNAs exônicos estão localizados na transição exon-intron de um gene e são extremamente raros no genoma, sendo que apenas 24 dos 1600 miRNAs de humanos foram caracterizados como exônicos (Maselli et al., 2008).

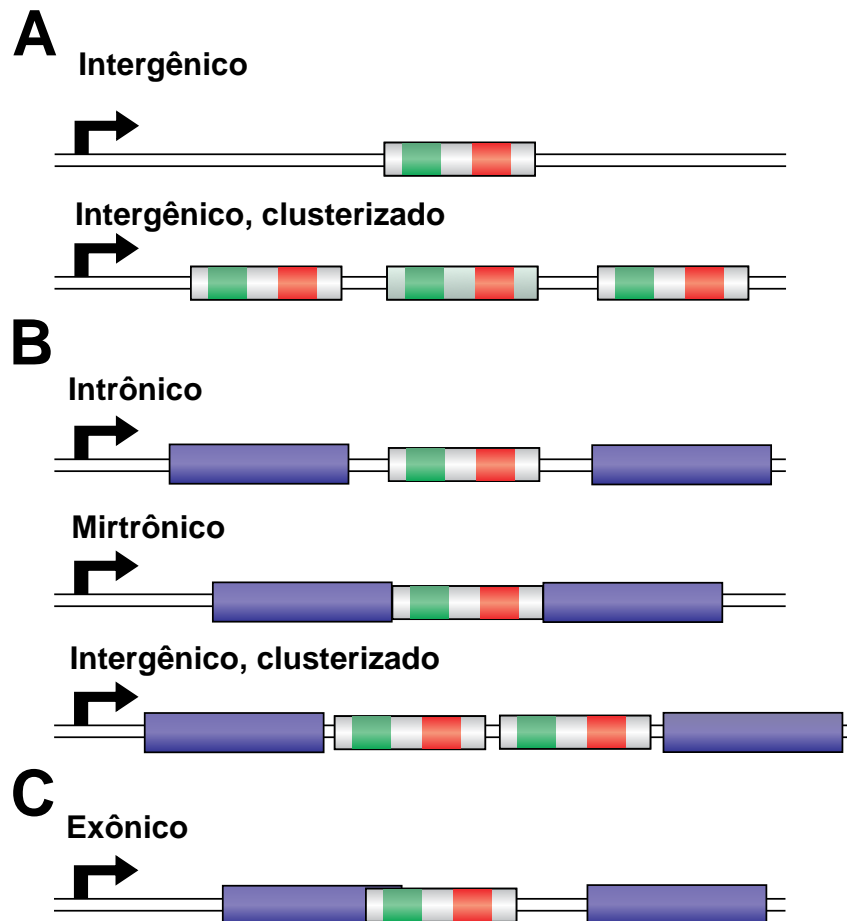


Figura 1. Organização genômica dos miRNAs. A: MiRNAs intergênicos estão localizados em regiões distintas com unidades transcrpcionais conhecidas. Esses miRNAs podem ser monocitrônicos, ou policitrônicos, onde vários miRNAs estão agrupados (clusterizados). B: MiRNAs Intrônicos estão localizados nos introns de genes, ambos são transcritos a região codificante e não-codificante. Esses miRNAs podem ser únicos no intron, ou clusterizados em vários miRNAs. Os miRNAs intrônicos são transcritos a partir do promotor do gene hospedeiro e processados como introns do transcrito do gene hospedeiro, ambas as regiões, codificante e não-codificante, são transcritas. Em casos especiais como os mirtrons, o intron corresponde ao pré-miRNA. Nesse caso, o processo de maturação de primRNA para pré-miRNA não é necessário (Okamura et al., 2007). C: MiRNAs exônicos são raros e estão localizados na transição entre um exon e um intron de um gene. Esses miRNAs são transcritos a partir do promotor do gene hospedeiro e sua maturação acarreta em perda de função do gene hospedeiro (Rodriguez et al., 2004). Imagem modificada de Olena e Patton, 2010.

A compreensão do padrão de organização genômica dos genes de miRNAs em diversas espécies auxilia no aperfeiçoamento de ferramentas de predição de novos genes de miRNAs, além de favorecer o conhecimento sobre a estrutura gênica, biogênese, mecanismos de ação e dinâmica evolutiva dos miRNAs.

1.3. MicroRNAs do músculo esquelético

A partir de estudos realizados em mamíferos verificou-se a existência de diversos miRNAs de alta especificidade tecidual (Lagos-Quintana et al., 2002).

Nessas análises, foi descrita a ação de miRNAs músculo específicos, altamente expressos durante o crescimento muscular (Callis et al., 2008), processo este considerado o principal responsável pelo aumento de massa corpórea em diversos grupos de animais, como no caso das espécies de peixes.

Embora hajam diferentes tipos de tecido muscular (i.e, liso, estriado cardíaco e estriado esquelético), o ganho de massa corpórea resulta majoritariamente do desenvolvimento do tecido muscular estriado esquelético (Grefte et al., 2007).

O músculo esquelético compõe até 60% da massa corpórea em peixes, além de se constituir numa adaptação mecânica específica para a vida no ambiente aquático. Essa massa muscular é também uma importante fonte protéica para o consumo humano (Weatherley e Gill, 1987).

Em peixes, o tecido muscular esquelético é composto por três camadas: uma de músculo branco (MB), uma de músculo vermelho (MV) e outra fina camada entre estas, com características intermediárias (Sanger e Stoiber, 2001; Figura 2). As células musculares brancas são predominantes, representando até 70% de todo o conjunto de células que formam o miótomo e correspondem à porção comestível dos peixes (Zhang et al., 1996).

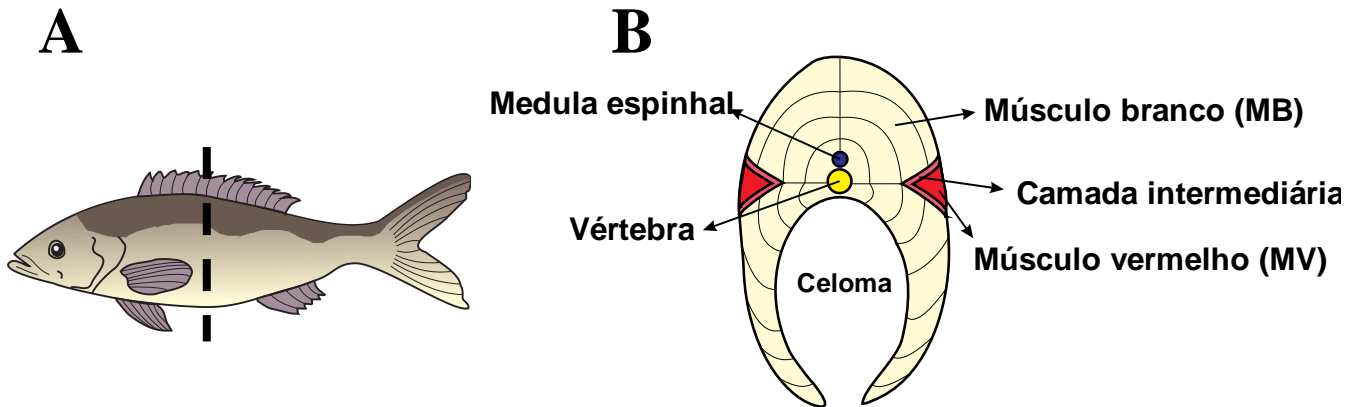


Figura 2. Esquema geral da distribuição das camadas musculares em peixes. (A) Peixe com linha tracejada representando região do corte transversal. (B) Esquema do corte transversal, onde se encontra representada a distribuição das fibras musculares em peixes.

O aumento do tamanho corporal em peixes ocorre principalmente devido ao crescimento das fibras musculares brancas (Zimmerman e Lowery, 1999). Nesse animais, o músculo esquelético branco é formado por fibras de contração rápida e metabolismo glicolítico (Driedzic e Hochachka, 1976) utilizadas em movimentos natatórios rápidos como os exibidos durante o comportamento de fuga de predadores (Altringham e Johnston, 1988). Por outro lado, as fibras musculares vermelhas representam menos de 30% da musculatura total (Greer-Walker e Pull, 1975), atuam por metabolismo aeróbico (oxidativo) de contração lenta e estão associadas a movimentos natatórios constantes e lentos como os realizados durante migrações ou forrageamento.

O crescimento muscular é um processo que envolve recrutamento de populações de células precursoras, também chamadas mioblastos ou mio-satélites. Estas células fornecem o material genético e organelas nucleares essenciais para a formação de novas fibras musculares (hiperplasia) e crescimento das pré-existentes (hipertrofia) (Koumans e Akster, 1995). Durante o crescimento por hipertrofia, as fibras aumentam o volume celular e absorvem o núcleo dos mioblastos mantendo uma razão relativamente constante entre núcleo e citoplasma. No crescimento

hiperplásico, novas fibras formam-se na superfície de fibras pré-existentes a partir de mioblastos que se fundem para compor miotubos multinucleados (Rowlerson e Veggetti, 2001).

A contribuição relativa de hipertrofia e hiperplasia para o crescimento muscular varia consideravelmente em diferentes espécies (Weatherley e Gill, 1987; Weatherley et al., 1988), tipos musculares e estágios de crescimento (Kießling et al., 1991). Por exemplo, em peixes de grande porte com rápido crescimento, a hiperplasia é particularmente ativa durante os estágios larval e juvenil (Weatherley e Gill, 1987) e continua no estágio adulto mesmo depois de atingida a maturidade sexual (Zimmerman e Lowery, 1999). Entretanto em espécies de pequeno porte que possuem crescimento lento, a hiperplasia durante a vida adulta é baixa e o crescimento muscular envolve primariamente hipertrofia de fibras formadas no embrião e durante o estágio larval inicial (Weatherley e Gill, 1987; Weatherley et al., 1988).

A regulação da expressão gênica tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional é crucial para o desenvolvimento e diferenciação dos tecidos musculares por hiperplasia e/ou hipertrofia.

Assim, alguns miRNAs especificamente ou altamente expressos no músculo esquelético e/ou cardíaco (referidos como *myomiRs*: myo = músculo + miR = miRNA) foram identificados e incluem os miRNAs miR-1, -133a, -133b, -206, -208a, -208b, -214, -486 e -499 (Flynt et al., 2007; McCarthy e Esser, 2007; Callis et al., 2008; Van Rooij et al., 2008, 2009; Small et al., 2010; Gagan et al., 2012). Dentre esses há miRNAs que estão organizados em agrupamentos bicistrônicos (“*clusters*”) no mesmo cromossomo (por exemplo: miR-1-1/133a-1, miR-1-2/133a-1 e miR-206/133b) e são transcritos conjuntamente (Chen et al., 2009; Liu e Olson, 2010).

Os demais *myomiRs* estão organizados intrônicamente e são expressos junto ao seu gene hospedeiro (por exemplo: miR-208a – intron 29 do gene *myh6*; miR-208b – intron 31 do gene *myh7*; miR-499 – intron 19 do gene *myh7b*) (Van Rooij et al., 2008).

A expressão dos *myomiRs* é regulada por redes de transcrição envolvendo diversas proteínas que se ligam a promotores desses miRNAs ou dos genes hospedeiros (Latronico et al., 2007; Callis et al., 2008; Thum et al., 2008). Os *myomiRs* estão envolvidos em múltiplas etapas da função e desenvolvimento muscular, através da regulação de genes essenciais para os processos de miogênese (proliferação, diferenciação e especificação do tipo de fibra), regeneração, envelhecimento e homeostasia muscular (Kim et al., 2006; Naguibneva et al., 2006; Flynt et al., 2007; McCarthy et al., 2007; Sayed et al., 2007; Van Rooij et al., 2008, 2009; Small et al., 2010; Ge e Chen, 2011; Hosoda et al., 2011; Wang et al., 2011).

Estudos relacionados que avaliem o papel dos *myomiRs* em outros modelos biológicos, como peixes, podem permitir avanços significativos quanto ao entendimento da biologia muscular nos vertebrados em geral.

1.4. Expressão diferencial de microRNAs

A expressão diferencial de miRNAs em diferentes tecidos e períodos embrionários têm sido estudada em diversas espécies como camundongo, rato e galinha (Lagos-Quintana et al., 2002; Ason et al., 2006; Darnell et al., 2006; Thatcher et al., 2007; Begemann, 2008; van Rooij et al., 2008, 2009; Bell et al., 2010; Fu et al., 2011), sendo escassos os estudos voltados às espécies de peixes.

Além disso, a expressão diferencial de miRNAs relacionada ao sexo foi recentemente detectada no genoma de vários organismos, desde urocordados a diversos grupos de vertebrados, como no desenvolvimento da espécie de tunicado *Oikopleura dioica* (Fu et al., 2008), em gônadas de galinha *Gallus gallus* (Bannister et al., 2009), *in vitro* em células embrionárias totipotentes de mamíferos (Ciaudo et al., 2009), no fígado, baço e músculo cardíaco de rato (Cheung et al., 2009) e testículos e ovários de gado (Huang et al., 2011). Estes resultados demonstram que a expressão de miRNAs pode variar entre os sexos em diferentes tipos de tecidos, bem como sugerem a existência de miRNAs sexo-específicos em diversas espécies. Em peixes a existência de miRNAs sexo-específicos não foi rigorosamente testada.

1.5. A tilápia do Nilo como organismo modelo

Tilápia é a designação genérica de um grupo de peixes que abrange cerca de 70 espécies, pertencentes a 4 gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, *Tilápia* e *Danakillia*, todos pertencentes à Família Cichlidae. Os ciclídeos, como são comumente chamados, estão entre as famílias de peixes com maior número de espécies (Nelson, 2006), sendo estimadas cerca de 3.000 espécies distribuídas pela América Central e do Sul, Madagascar, Sudeste da Índia e África (Kocher, 2004).

Segundo Popma e Lovshin (1996), as tilápias de importância comercial estão divididas em três principais grupos taxonômicos, distinguidos basicamente pelo comportamento reprodutivo. São eles o gênero *Tilápia spp* (incubam seus ovos em substratos), *Oreochromis spp* (incubam os ovos na boca da fêmea) e *Sarotherodon spp* (incubam os ovos na boca do macho ou de ambos). O gênero *Oreochromis*,

congrega o maior número de espécies, dentre as quais se destacam: *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus*, *O. aureus*, e seus híbridos.

Os ciclídeos são considerados os equivalentes aquáticos aos tentilhões de Darwin devido a sua rápida radiação adaptativa nos grandes lagos do leste da África, onde quase 2000 espécies têm evoluído somente nos últimos 10 milhões de anos (Kocher, 2004). O principal fator que promove este tipo de adaptação a novos ambientes é o fato de que esses peixes se adequam facilmente a condições extremas de habitats e nichos (Moyle e Cech Jr., 2000).

Devido às características biológicas mencionadas, os ciclídeos são considerados excelentes modelos experimentais para estudos em diversas áreas da genética (The International Cichlid Genome Consortium, 2006; Ijiri et al., 2007; Cnaani et al., 2008; Ferreira e Martins, 2008; Valente et al., 2009; Poletto et al., 2010). A facilidade adaptativa de *O. niloticus* permite sua manipulação por diversas técnicas, como a produção de indivíduos ginogenéticos e androgenéticos, a inversão sexual através da administração de esteróides sexuais, a indução de poliploidia, a produção de híbridos interespecíficos, a produção de linhagens transgênicas, dentre outras.

Adicionalmente à importância como modelo biológico para estudos evolutivos, a tilápia do Nilo apresenta grande importância na aquicultura, sendo um dos peixes de água doce mais cultivados em todo o mundo (FAO, 2006). Este fato é devido à alta qualidade do filé, que possui grande aceitação no mercado consumidor, o que conferiu à espécie o título de “frango aquático”. Além disso, fatores adicionais, como: rápida taxa de crescimento e adaptabilidade aos diversos sistemas e condições de cultivo, agregam à espécie um alto valor econômico (Meurer et al., 2000; Boscolo et al., 2001). Por apresentarem maior crescimento e

ganho de peso, os indivíduos machos da tilápia nilótica são os mais rentáveis ao setor produtivo. Como comparação, o peso das fêmeas representa de 50 a 70 % do peso dos machos (Proença e Bittencourt, 1994; Figura 3). Por esse motivo, diversas técnicas envolvendo a determinação sexual prévia e a alteração da fisiologia reprodutiva por reversão sexual, têm sido empregadas para a produção de lotes monossexos machos (Phelps e Popma, 2000; Beardmore et al., 2001; Borges et al., 2005).

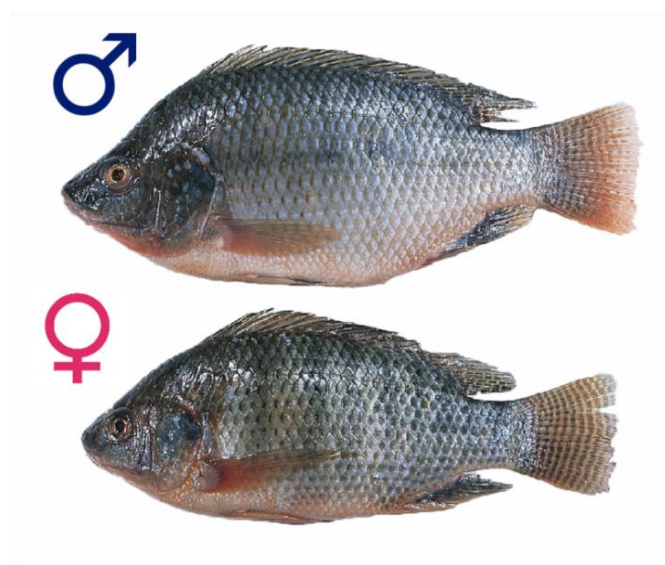


Figura 3. Indivíduos adultos da espécie *O. niloticus*.

Apesar do aprimoramento nas técnicas de cultivo da espécie, com a produção de híbridos e linhagens de maior peso, pouco é conhecido acerca dos mecanismos moleculares que controlam o crescimento muscular de *O. niloticus*.

Recentemente, com a conclusão do sequenciamento do genoma de *O. niloticus* (acessível pelo banco de dados on-line BouillaBase – web-site: <http://cichlid.umd.edu/cichlidlabs/kocherlab/bouillabase.html>), valiosas informações estão agora disponíveis para a análise estrutural e funcional do genoma desta espécie.

Por essa razão, o uso da tilápia do Nilo como modelo biológico traz muitas vantagens para o estudo da expressão de miRNAs relacionados às vias de crescimento muscular, sendo de considerável relevância a possibilidade de uma análise comparativa da presença e abundância de transcritos de miRNAs entre os sexos. Além disso, os dados disponíveis permitem análises estruturais comparativas relativas à localização física dos genes de miRNAs e respectivas regiões genômicas flangeadoras. Isso é especialmente importante, uma vez que genes reguladores do desenvolvimento, incluindo miRNAs, são altamente conservados entre peixes e humanos, por exemplo.

Atualmente existem cerca de 30.000 espécies de peixes viventes identificadas, representando 50% de todos os vertebrados (Nelson, 2006). Desse total, apenas cinco espécies (*Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Lates calcarifer* e *Cyprinus carpio*) foram mais bem estudadas quanto à fração de genes codificadores de miRNAs no genoma. Para a tilápia do Nilo, relativamente pouco é conhecido acerca de genes de miRNAs. Os dados disponíveis estão relacionados à predição de bioinformática de 26 genes de miRNAs detectados no genoma da espécie (banco de dados *miRNEST*, por Szcesniak et al., 2011). Outros dois estudos publicados recentemente descreveram a expressão de miRNAs no músculo esquelético de *O. niloticus*. Um estudo relata a expressão específica de alguns microRNAs no músculo esquelético (Yan et al., 2012) e o segundo estudo descreve a identificação de alguns microRNAs diferencialmente expressos no músculo esquelético ao longo do desenvolvimento de duas linhagens distintas da tilápia do Nilo (Huang et al., 2012). Porém, nenhum desses estudos investigou os perfis de expressão diferencial de miRNAs músculo-específicos entre os sexos e os tipos musculares, vermelho e branco, na tilápia do Nilo.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o perfil de expressão de miRNAs músculo-específicos (miR-1, -133a,-133b, -206 e -499) em *O. niloticus* utilizando as técnicas de RT-qPCR e hibridação *in situ*;
- Comparar os níveis de expressão dos miRNAs músculo-específicos entre os sexos e tipos musculares de indivíduos adultos da espécie;
- Comparar os níveis de expressão dos RNAs mensageiros alvo dos miRNAs diferencialmente expressos;
- Compreender o padrão de organização genômica e dinâmica evolutiva dos genes de miRNAs músculo-específicos em espécies de peixes utilizando análises de bioinformática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente projeto foram analisados 16 indivíduos adultos da espécie *O. niloticus*, sendo oito animais de cada sexo. Os animais, obtidos na fazenda de piscicultura Royal Fish (Jundiaí, SP), foram mantidos em aquários individuais, à temperatura de 25°C e ciclos de luminosidade de 12 horas, no Biotério do Laboratório Genômica Integrativa do Departamento de Morfologia, IB, UNESP, Botucatu, SP. Para a manipulação, os animais foram anestesiados com MS222 (triclaína) (Sigma, EUA) e sacrificados. Desses animais foram coletados amostras de músculo branco (MB) e músculo vermelho (MV). No momento da retirada dos tecidos, tomou-se o cuidado de coletar apenas camadas mais externas do MV e de camadas mais profundas de MB, evitando-se assim a amostragem indesejada das células da camada intermediária (de transição entre MB e MV). Outros tecidos, como, gônada, brânquias, coração, fígado e cérebro, foram também amostrados para estudos futuros. Todos os tecidos coletados foram preservados inicialmente em nitrogênio líquido (-180°C), durante o período de coleta, e, posteriormente, estocados a -80°C em ultrafreezer.

3.1. Extração de RNA do músculo esquelético

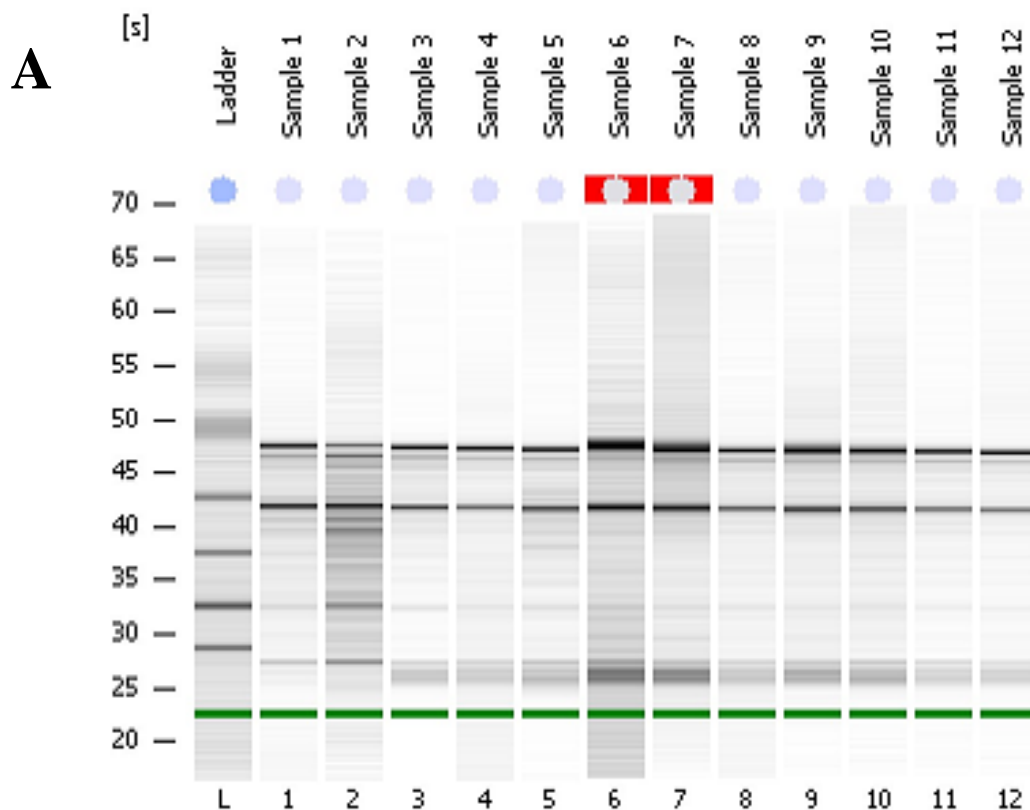
Para o isolamento do RNA total utilizou-se o método de extração orgânica com *TRI Reagent*® (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo o método descrito por Chomczynski (1993) com algumas modificações. Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril livre de RNAses, de modo a evitar a degradação do RNA das amostras. No procedimento foi adicionado 1ml de *TRI Reagent*® a um criotubo de 4,5ml contendo aproximadamente 25mg de tecido. Em seguida, o tecido foi homogeneizado com o auxílio do aparelho *Ultra-Turrax* (Ika, Alemanha). Após a

homogeneização, o material foi mantido à temperatura ambiente por 5min. A mistura foi então transferida para um novo tubo (de 1,5ml) contendo 200µl de clorofórmio. O material foi novamente homogeneizado por inversão durante 15s, e estabilizado por 3min à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada centrifugação a 12000rpm por 15min a 4°C, e da mistura trifásica formada, transferiu-se apenas o sobrenadante (aproximadamente 500µl) para um novo tubo de 1,5ml contendo 500µl de álcool isopropílico. O conteúdo foi invertido durante 30s, mantido por 10min à temperatura ambiente, e centrifugado a 12000rpm por 10min a 4°C. Nesta etapa o sobrenadante foi descartado e gotículas remanescentes removidas com o auxílio de papel autoclavado enrolado, tomando-se o cuidado de não encostar o papel no *pellet*. Após foi adicionado ao *pellet* 1ml de etanol 75%, seguido de centrifugação a 7500rpm por 5min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e novamente foi utilizado papel autoclavado para remoção de gotículas, mantendo-se o tubo por 5min à temperatura ambiente para completar a secagem. Na etapa final, o *pellet* contendo o RNA oriundo de cada amostra foi eluído em água ultra-pura. Todas as amostras foram estocadas em ultrafreezer a -80°C.

3.2. Quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA

A quantificação e a verificação de contaminação das amostras de RNA total obtidas foram analisadas através do equipamento *NanoDrop 1000* (Thermo-Scientific, EUA). Esse equipamento quantifica o *pool* total de RNA contido em cada amostra individual, além de verificar se há contaminação por proteínas e/ou solventes orgânicos como álcool/clorofórmio/Trizol, através da comparação das razões de absorbância a 260/280nm e 230/280nm, respectivamente.

Sabe-se que a degradação do RNA é um processo gradual, independente de contaminação no momento da realização da extração e que interfere diretamente nos resultados finais da metodologia de RT-qPCR (Imbeaud et al., 2005; Ibberson et al., 2010). Assim, uma análise da integridade do RNA utilizado é necessária. Para realização da análise de integridade do RNA extraído foi utilizado o aparelho *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA), que avalia o número de integridade do RNA (*RNA integrity number* - RIN). Esse valor numérico é gerado a partir da análise de dados de fluorescência dos RNAs ribossomais contidos na amostra, após corrida em gel por microfluídos (ver exemplo na Figura 4), Os valores de RIN variam entre 10 (RNA intacto) e 1 (RNA totalmente degradado). Em experimentos que envolvam a extração de RNA de amostras de tecido animal, como no caso do tecido muscular, valores de RIN >7 são considerados adequados para a realização da quantificação por RT-qPCR (Schroeder et al., 2006). Os dados referentes à qualidade e integridade das amostras de RNA utilizadas no presente estudo estão apresentados no Apêndice A.



B

Sample Name Result Label

Sample 1	RIN: 6.60
Sample 2	RIN: 4.60
Sample 3	RIN: 7.30
Sample 4	RIN: 7.80
Sample 5	RIN: 6.60
Sample 6	RIN N/A
Sample 7	RIN N/A
Sample 8	RIN: 7.50
Sample 9	RIN: 7.40
Sample 10	RIN: 7.30
Sample 11	RIN: 8
Sample 12	RIN: 8

C

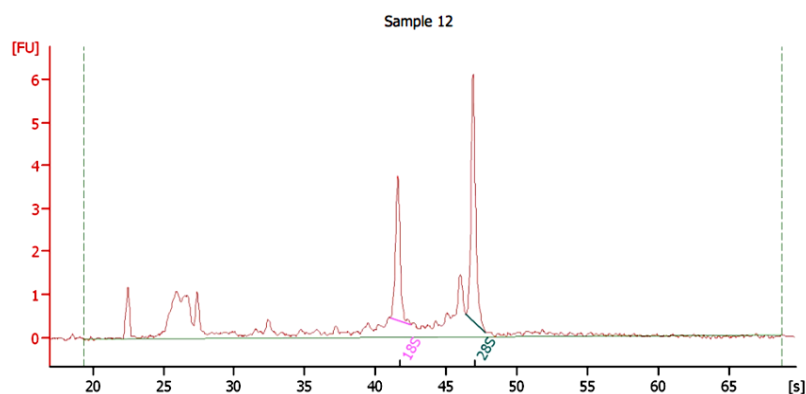


Figura 4. Resultado obtido do aparelho Bioanalyzer, para a análise da integridade do RNA. (A) Resultado fotográfico do gel após corrida por microfluidos. (B) Resultado numérico obtido a partir das análises de fluorescência emitidas pelas amostras após corrida por microfluído. (C) Resultado gráfico da análise, onde o RIN é calculado a partir dos diversos picos existentes. Os pontos correspondentes aos picos das regiões 18S e 28S aparecem em evidência.

3.3. Síntese de cDNA dos miRNAs

Cinco *myomiRs* foram selecionados para a análise (miR-1, -133a, 133b, -206 e -499), além do gene U6 snRNA (*small nuclear RNA*) como controle endógeno. O U6 snRNA é altamente conservado entre os vertebrados e tem sido amplamente validado em diversos trabalhos de análise da expressão gênica por qPCR.

Para a realização da síntese de cDNA foram utilizados os kits comerciais *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life Technologies, EUA). Cada ensaio contém uma sonda e dois primers para cada miRNA específico, sendo que os primers utilizados advêm do genoma de *zebrafish* (Tabela 1).

A reação de RT-qPCR a partir da utilização destes kits envolveu as etapas de (1) síntese de cDNA do miRNA específico e (2) amplificação por qPCR.

Na reação de síntese de cDNA foi utilizado 10ng de RNA total. Cada tubo de reação continha 0,15µl de dNTPs (100mM), 1µl de transcriptase reversa (50U/µl), 1,5µl de buffer (10X), 0,19µl de inibidor de RNase (20U/µl), 3µl de primers (5X) e 5µl da amostra de RNA total (2 ng/µl), totalizando 15µl de volume final de reação. Após o preparo, os tubos foram transferidos para o termociclador *PTC-200* (MJ Research, EUA) e mantidos a 16°C por 30 min, 42°C por 30 min e 85°C por 5 min. O cDNA sintetizado foi estocado a -20°C.

Tabela 1. Características gerais dos miRNAs pré-selecionados.

ID	Nº de acesso	Família do gene	Espécie	Sequência nucleotídica madura
dre-miR-1	MI0001878	miR-1	<i>D. rerio</i>	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
dre-miR-133a	MI0001993	miR-133	<i>D. rerio</i>	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG
dre-miR-133b	MI0001994	miR-133	<i>D. rerio</i>	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA
dre-miR-206	MI0002045	miR-206	<i>D. rerio</i>	GAGCUUUUGGCCCGGGUUAUAC
dre-miR-499	MI0004766	miR-499	<i>D. rerio</i>	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUUA

Dados adaptados de www.mirbase.org.

3.4. PCR em tempo real quantitativa dos miRNAs

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi realizada para os genes selecionados seguindo o protocolo do fabricante do kit comercial *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life Technologies, EUA), o qual possui sondas e primers específicos para cada miRNA. O sistema de PCR em tempo real utilizado foi o *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA).

Cada reação de qPCR foi realizada a partir de triplicatas biológicas e triplicatas experimentais. Assim, no preparo das reações foi utilizado um mix com os componentes necessários para cada amostra de modo a facilitar a distribuição equimolar dos reagentes nas triplicatas. Uma vez que perdas excessivas de reação poderiam ocorrer em função da viscosidade dos reagentes, cada triplicata experimental foi preparada com excesso de 12,5%, de acordo com o protocolo do fabricante. Assim, foram adicionados 33,75µl de master mix (2X), 3,37µl do mix de primers e sonda (20X), 25,88µl de água ultra-pura e 4,5µl do cDNA sintetizado, para um volume final de 67,51µl. Esse volume total foi subdividido nas triplicatas, com aplicação de 20µl de reação em cada pocinho nas placas de qPCR. O programa utilizado no termociclador consistiu de uma etapa inicial a 95°C por 10min para ativação da DNA polimerase, seguido por 45 ciclos de amplificação, com denaturação a 95°C por 15s e extensão a 60°C por 1min. Todas as reações de qPCR foram realizadas segundo normas estabelecidas no "*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments- MIQE Guidelines*" (Bustin et al., 2009).

3.5. Síntese de cDNA do RNA total

A síntese de cDNA do RNA total foi realizada a partir das mesmas amostras utilizadas na análise dos miRNAs. Nesse caso, entretanto, um tratamento adicional da amostra, para degradação de eventual DNA genômico contaminante foi realizada com o kit *DNA-free*[™] (Ambion, USA). Para isso realizou-se o preparo de um mix contendo 2µg da amostra de RNA, 5µl de buffer (10X), 1µl de DNase (2U/µl) e o volume completado para 50µl com água ultra-pura (o volume de RNA e água ultra-pura variaram de acordo com a concentração da amostra de RNA). Este mix foi então incubado a 37°C por 30 min. Após, adicionou-se 5µl de inibidor de DNase, para parar a reação de degradação de DNA. Em seguida, o mix foi incubado a 25°C por 2min, com rápida agitação a cada 30 seg, e centrifugado a 12000rpm por 15min a 4°C. Ao final, aproximadamente 50µl de sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Após o tratamento com DNase, foi realizada a síntese de cDNA total utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies, EUA). Para 10µl de RNA tratado com DNase, foi utilizado 10µl de mix para síntese de cDNA. O mix de cDNA consistiu de 0,8µl de dNTPs (100mM), 1µl de transcriptase reversa (50U/µl), 2µl de buffer (10X), 2µl de *random* primers (10X), 0,5µl de inibidor de RNase (20U/µl), 3,7µl de água ultra-pura e 10µl da amostra de RNA tratada com DNase. O termociclador utilizado foi o *PTC-200* (MJ Research, EUA) nas temperaturas de 25°C por 10 min, para ativação inicial da enzima, e 37°C por 120 min para síntese de cDNA, seguido por inativação da enzima a 85°C por 5 min. O cDNA sintetizado foi estocado a -20°C.

3.6. PCR em tempo real quantitativo dos RNAs mensageiros alvo

Para construção dos primers e sondas utilizadas na detecção e quantificação dos genes alvo por PCR em tempo real, foi realizada uma busca desses genes no genoma da tilápia do Nilo. Assim, foi realizado primordialmente o *download* do genoma da tilápia (banco de dados *Bouillabase*, web-site: <http://cichlid.umd.edu/cichlidlabs/kocherlab/bouillabase.html>). As sequências dos genes alvo selecionados para análise foram adquiridas do genoma de *Danio rerio* (disponível no banco de dados do *Ensembl*, <http://www.ensembl.org>). A partir desse ponto, um pequeno banco de dados foi gerado no *software Geneious* (Drummond et al., 2009) para realização de *blast* das sequências dos genes de *zebrafish* contra o genoma da tilápia. Consequentemente, a anotação dos genes alvo no genoma da tilápia foi realizada e os primers e as sondas para cada gene foram desenhados a partir da sequência dos exons 2 e 3 do gene predito no genoma da tilápia. O gene endógeno selecionado para normalização dos dados foi o 18S, cuja sequência, utilizada na construção dos primers e sonda, foi obtida do ciclídeo *Oreochromis aureus* (disponível no *GenBank* com o número de acesso GU289229.1). Assim, para realização da qPCR foi utilizado o kit customizado *TaqMan® Gene Expression Assays* (Life Technologies, EUA).

As condições de preparo de reação e ciclagem da qPCR dos RNAs mensageiros alvo foram as mesmas anteriormente descritas no subitem 4.4 para a qPCR dos miRNAs.

3.7. Análise estatística dos dados de qPCR

A análise dos dados foi realizada a partir dos valores de C_q (ciclo de quantificação) calculados com parâmetros de configuração automática de *baseline* e

threshold manualmente ajustado no *software StepOnePlus v2.2*. O *Cq* é o 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). Para a realização da quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o programa *REST®* (Pfaffl et al., 2002), que realiza a quantificação comparativa pelo método de “*Pair-Wise Fixed Reallocation Randomization Test*” (Pfaffl et al., 2002). Testes de permutação e randomização são altamente utilizados em análises de dados experimentais (Manly, 1998; Horgan e Rouault, 2000). O programa *REST* realiza a quantificação relativa ao comparar um grupo de amostras com o grupo controle, a comparação sempre é realizada a partir de um gene normalizador (gene expresso na mesma quantidade nas condições experimentais avaliadas). Além disso, o *software REST* considera a eficiência individual de cada reação, realizando uma normalização subsequente dos dados de quantificação. A eficiência de cada reação individual foi previamente calculada pelo *software LinRegPCR* (Ramakers et al., 2003). O *LinRegPCR* é um programa que avalia a eficiência relativa da reação de RT-qPCR para cada amostra individual a partir da análise dos dados brutos de fluorescência (*Rn*). Esse método de cálculo de eficiência é considerado um bom estimador da “eficiência real” da reação, já que realiza o cálculo na fase exponencial, a mesma em que se estipula o *threshold* para obtenção do *Cq*. Esse método de cálculo não superestima nem subestima a eficiência da reação (Dorak, 2006). Além disso, esse *software* elimina a necessidade de reações adicionais para o estabelecimento de uma curva padrão para mensurar a eficiência da PCR, entretanto, só pode ser utilizado em reações de PCR em tempo real que utilizem sondas específicas para detecção da quantidade relativa de transcrito, como no caso do kit comercial *TaqMan®* utilizado no presente estudo.

Em síntese, para análise estatística foi realizada uma comparação entre os dados de Cq junto aos dados de eficiência de reação. Dessa comparação foi gerado o parâmetro “Quantidade Relativa de transcrito” (RQ). O RQ representa o perfil de expressão de cada gene analisado, descrito numericamente como “n vezes” mais ou menos expresso em relação ao nível de expressão do gene normalizador na comparação entre as variáveis analisadas (i.e., tipo de tecido e/ou o sexo).

3.8. Hibridação *in situ* fluorescente de miRNAs

Para a análise qualitativa da expressão de miRNAs em cortes histológicos congelados do tecido muscular branco e vermelho de machos e fêmeas adultos foi realizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente de miRNAs (miRNA-FISH) a partir da utilização das sondas *miRCURY LNA™* (Exiqon, Dinamarca). Esta tecnologia é, atualmente, a mais avançada disponível comercialmente para a detecção espacial da expressão de miRNAs. As sondas *miRCURY LNA™* utilizadas nesse experimento são duplamente marcadas nas suas extremidades 3’ e 5’ pela digoxigenina (DIG) e específicas para os miRNAs selecionados (miR-1, -206 e -499). Os controles positivos de reação foram realizados com as sondas *LNA™ U6snRNA* e *LNA™ scrambled* (Exiqon, Dinamarca). O controle negativo foi realizado pela ausência de sonda e/ou proteinase K na reação preparada.

Após o sacrifício dos animais, amostras de aproximadamente 1,0 cm x 0,5 cm x 0,5 cm do tecido muscular branco e vermelho foram coletadas e imediatamente fixadas por 2 horas em paraformaldeído tamponado 4% (PFA) pH 7,5 à temperatura ambiente, com o objetivo de paralisar a atividade enzimática autolítica. Em seguida, as amostras já fixadas foram embebidas em solução

crioprotetora de sacarose 30% em tampão fosfato-salina (PBS 1X) *overnight* à 4°C e armazenadas a -80°C.

Para preparo das lâminas foi utilizado o criostato (LEICA, Alemanha), ajustado para espessura de 10-15µm à -20°C. Os cortes obtidos foram montados em lâminas histológicas esterilizadas *Gold-Superfrost Plus* (Thermo-Scientific, Alemanha). Após o corte, as lâminas foram secas por 20min e refixadas em paraformaldeído tamponado 4% por 10min (Obernosterer et al., 2007). Em seguida, o PFA foi removido das lâminas contendo amostras dos tecidos por duas lavagens de 5min cada em um “*coplin jar*” contendo PBS 1X.

Para preparação da hibridação, o material foi permeabilizado em solução contendo proteinase K (15µg/ml) por 10min à 37°C no termociclador de lâminas histológicas (Biometra, Alemanha). Esse processo é fundamental para facilitar a penetração das sondas de LNA no citoplasma e núcleo das células presentes nos cortes histológicos (Jorgensen et al., 2010; Song et al., 2010). Em seguida, as lâminas foram desidratadas em banhos sucessivos e sequenciais de etanol 70%, 96% e 100% para secagem à temperatura ambiente por 15min. Antes da hibridação, as sondas LNA foram desnaturadas por 4min à 90°C em termociclador. A hibridação foi realizada por 2 horas no termociclador à 55°C pela adição às lâminas desidratadas de tampão de hibridação (Exiqon, Dinamarca) contendo as sondas LNA específicas para os miRNAs -1, -206 e -499 (diluição 1:500, Exiqon, Dinamarca). Após o processo de hibridação, as sondas LNA residuais não corretamente pareadas foram removidas através de lavagens estridentes à temperatura de 55°C em “*coplin jars*” contendo sequencialmente tampão de lavagem citrato salínico-sódico 5XSSC, 1XSSC e 0,2XSSC (2x de 5min cada).

A revelação da reação de hibridação foi realizada através da detecção imunofluorescente da DIG com o kit de amplificação enzimática de sinal *HNPP Fluorescent Detection Set* (Roche, Alemanha). Assim, as moléculas de DIG acopladas às sondas de LNA foram detectadas nos cortes histológicos pela adição de anti-corpo monoclonal anti-digoxigenina conjugado à enzima fosfatase alcalina (1:500 em tampão de bloqueio, Roche, Alemanha) *overnight* à 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3 vezes em “*coplin jars*” contendo tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em solução aquosa de 100 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) por 10min cada à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram imersas 2 vezes em tampão de detecção (solução aquosa de 100 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 8,0) por 10min cada à temperatura ambiente. A detecção do sinal foi realizada pela precipitação enzimática do substrato fluorescente da fosfatase alcalina nos sítios de ligação das sondas aos miRNAs teciduais. Em cada lâmina, foram adicionados 100µl de solução de detecção contendo o substrato para a enzima fosfatase alcalina: HNPP (2-hidroxi-3-ácido naftóico-2'-fosfato fenilalanina, 10mg/ml) e *Fast Red TR* (4-cloro-2-metilbenzenodiazonio salínico hemi-cloreto de zinco), diluídos em tampão de detecção por 30 min a temperatura ambiente. O produto final dessa reação é o composto fluorescente (fluorocromo) *HNP/TR* que precipita no tecido nos sítios de alta atividade enzimática da fosfatase alcalina (Figura 5). Esse processo foi repetido 3 vezes para amplificação da detecção dos miRNAs celulares, com uma lavagem de 10min em tampão de lavagem entre cada uma delas. Em seguida, a contracoloração fluorescente nuclear foi obtida pela incubação em DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) por 5min à temperatura ambiente e as lâminas foram montadas em meio de montagem *VectaShield* (Vector Laboratories Inc., EUA).

Ao final da técnica de miRNA-FISH, as lâminas foram observadas e fotografadas no microscópio de fluorescência acoplado à câmera digital *DP71* (OLYMPUS, Japão), utilizando-se os filtros DAPI e Texas Red, nos comprimentos de onda de excitação e emissão em torno de 358nm e 562nm para detecção de DAPI e Fast Red TR, respectivamente.

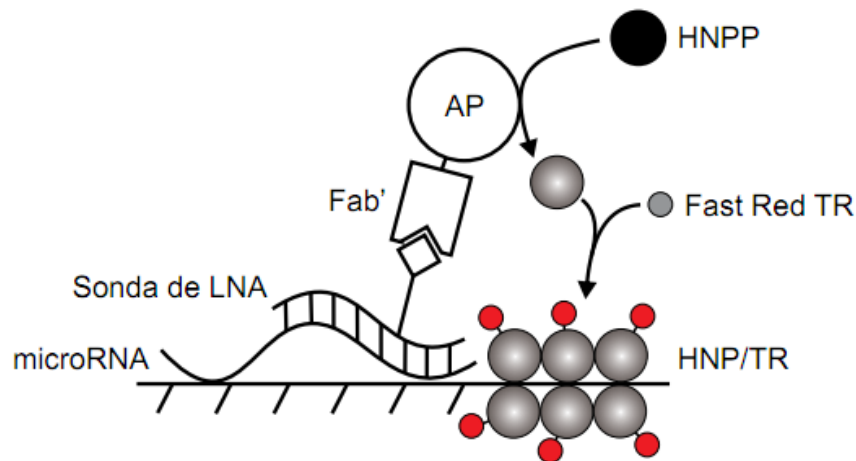


Figura 5. Representação esquemática da detecção enzimática pelo HNPP Fluorecent Detection Set, na qual ocorre precipitação do fluorocromo HNP/TR que pode ser detectado no microscópio de fluorescência no comprimento de onda 562nm, usando o filtro TexasRed.

3.9. Análise genômica comparativa

Para auxiliar a compreensão da organização genômica e dinâmica evolutiva dos microRNAs músculo-específicos foi realizada uma análise genômica comparativa dos genes de microRNAs em ortólogos das espécies de peixes *zebrafish*, *medaka*, *medaka*, *fugu*, *tetraodon* e tilápia do Nilo. Assim, foram realizadas análises para verificar a ocorrência de relações de sintenia entre os segmentos cromossomais que contém os genes de miRNAs (miR-206/-133b, -214; e -499). As análises foram conduzidas utilizando o *software Geneious* (Drummond et al., 2009) e o banco de dados on-line *Genomicus Genome Browser* (Muffato et al., 2010; web-site: <http://www.dyogen.ens.fr/genomicus-67.01/cgi-bin/search.pl>). O

Genomicus utiliza anotações no genoma de diversas espécies descritas e armazenadas no banco de dados on-line *Ensembl* (web-site: <http://www.ensembl.org/index.html>). Além disso, para confirmação dos dados obtidos pelo *Genomicus*, foi realizado o *download* do genoma completo de todas as espécies analisadas no site *Ensembl*. Em seguida, uma anotação manual dos genes foi realizada utilizando o *software Geneious*, o qual possibilita realizar *blast* em sequências de genomas importados para o *software*. Para os miRNAs intrônicos a comparação no *Genomicus* foi realizada a partir de seus genes hospedeiros. Por outro lado, os miRNAs intergênicos tiveram suas posições no genoma determinadas no *Geneious* e posteriormente localizadas no *Ensembl*, e o gene adjacente na região 5' (*upstream*) à anotação do gene de miRNA, previamente obtida no *Geneious*, utilizado como referência para busca no *Genomicus*.

Além disso, para avaliar as relações filogenéticas de um gene de miRNA específico, foi realizado um alinhamento da sequência precursora desse miRNA e uma análise da estrutura secundária entre diversas espécies de vertebrados. As sequências das demais espécies foram adquiridas por busca no *miRBase* e *Ensembl*. Assim, a árvore filogenética foi gerada no *software MEGA 5* (Tamura et al., 2011), utilizando máxima verossimilhança com *bootstrap* de 1000 réplicas, segundo o modelo evolutivo de Tamura-Nei. Para análise da estrutura secundária foi utilizado o web-server RNAfold (Gruber et al., 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se o papel fundamental desempenhado por miRNAs na regulação de diversas vias biológicas, no presente estudo testou-se a hipótese de ocorrência de um padrão de expressão diferencial dos *myomiRs* entre os sexos, padrão este que pode estar relacionado às diferenças marcantes de crescimento entre machos e fêmeas.

Outra hipótese testada refere-se à possível ocorrência de expressão diferencial dos *myomiRs* nos tipos musculares branco e vermelho do tecido muscular esquelético, uma vez que estes desempenham papéis biológicos distintos no organismo, e por isso, apresentam maior ou menor influência direta sobre o crescimento muscular.

Os resultados das análises conduzidas para testar as hipóteses supracitadas encontram-se descritos e são detalhadamente discutidos nos tópicos subsequentes.

4.1. Análise da expressão gênica dos miRNAs

Para análise dos dados de RT-qPCR dos miRNAs músculo-específicos foram realizadas cinco comparações: (i) MB entre machos e fêmeas; (ii) MV entre machos e fêmeas; (iii) MB x MV em machos; (iv) MB x MV em fêmeas; (v) MB x MV independente do sexo.

Na avaliação dos dados, a maioria dos genes de miRNAs investigados não apresentou expressão diferencial significativa nas comparações realizadas (Figura 6A-E). Esses resultados indicam participação similar dos miRNAs miR-1, -133a, -133b e -206 na regulação de genes nos tecidos musculares branco e vermelho para ambos os sexos em indivíduos adultos, não havendo evidências de distinção no papel funcional destes miRNAs nas comparações realizadas. É provável que sua

atuação seja melhor evidenciada e avaliada ao longo do desenvolvimento, dado o caráter temporal de expressão de miRNAs.

Nos adultos, dentre todos os miRNAs analisados, o miR-499 foi o único a apresentar níveis de expressão biologicamente significativos. Os valores de expressão do miR-499 no músculo vermelho foram cerca de ~44 vezes superiores aos obtidos no músculo branco ($p < 0,001$), nas comparações em machos, fêmeas e independente do sexo (Figura 6C-E), muito acima do limiar de significância estabelecido (RQ $>$ ou $<$ 2X).

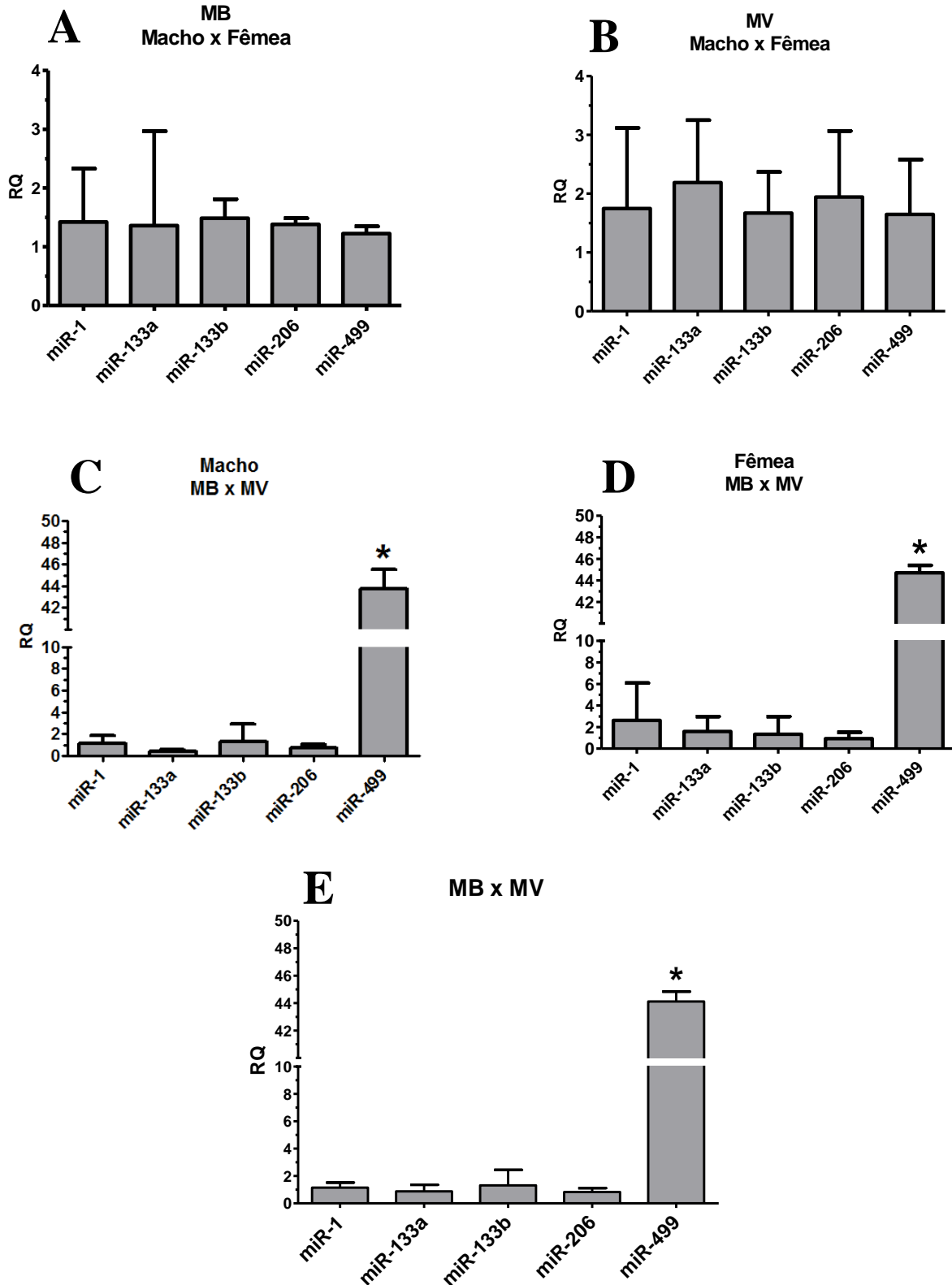


Figura 6. Níveis de expressão gênica de miRNAs músculo-específicos no músculo esquelético de adultos da tilápia do Nilo. Comparações: entre os sexos em músculo branco (A) e músculo vermelho (B); e entre os tipos musculares em machos (C), em fêmeas (D) e independente do sexo (E). Os valores de RQ estão apresentados na base linear. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*). MB – músculo branco; MV – músculo vermelho; RQ – quantidade relativa de transcrito.

4.2. Expressão espacial dos miRNAs

A partir dos dados de expressão obtidos por RT-qPCR, reações de hibridação *in situ* em cortes congelados foram realizadas para verificação da expressão espacial dos miRNAs músculo-específicos. Esses resultados de hibridação terminaram por corroborar os dados obtidos por RT-qPCR.

Os dois controles positivos de reação, U6snRNA e *scrambled*, geraram os resultados esperados e permitiram validar as reações de hibridação para os miRNAs músculo-específicos. O U6snRNA foi nitidamente detectado nos núcleos das fibras musculares vermelhas e brancas (Figura 7A-B) e também nos núcleos das células conjuntivas que constituem o sistema de cápsulas conjuntivas presentes no tecido muscular estriado esquelético (endomísio e perimísio). Em nenhuma célula o citoplasma foi marcado pela sonda U6snRNA demonstrando a expressão exclusivamente nuclear desse gene, como previamente relatado (Burke et al., 2012). A sonda *scrambled* é constituída por uma mistura de sondas específicas para vários miRNAs e foi desenvolvida para validação da reação de hibridação (Avril-Sassen et al., 2009). Essa sonda foi detectada tanto no núcleo como no citoplasma de todas as células musculares e conjuntivas presentes no tecido muscular estriado esquelético branco e vermelho (Figura 7C-D), sendo este o resultado esperado para esta sonda.

O padrão da expressão espacial do miR-1 foi semelhante nos músculos vermelho e branco da tilápia do Nilo. O miR-1 foi detectado principalmente nos núcleos das fibras musculares vermelhas e brancas (Figura 7E-F). Um sinal fluorescente de baixa intensidade pode ser notado também no sarcoplasma dessas células musculares. A intensa marcação nuclear pela ISH indica a intensa produção desse miRNA, cuja função é regular a transcrição de genes alvos relacionados com

a diferenciação de mioblastos e manutenção do fenótipo estriado nas células musculares estriadas de contração lenta e rápida (Sweetman et al., 2008). Curiosamente, o miR-1 foi nitidamente expresso também nas células conjuntivas do endomísio e perimísio (Figura 7E). Esse resultado pode indicar que células do tecido conjuntivo podem atuar nas vias regulatórias de diferenciação e homeostasia muscular.

A expressão tecidual do miR-206 nos músculos vermelho e branco foi detectada principalmente nos núcleos das fibras musculares. As fibras vermelhas expressaram uma marcação sarcoplasmática ligeiramente superior à das fibras brancas (Figura 7G-H), porém essa expressão diferencial do miR-206 não foi significativa na análise por RT-qPCR. O miR-206 desempenha um papel importante na reinervação e manutenção da junção neuromuscular (Brown et al., 2012), além de participar da manutenção e diferenciação de mioblastos (McCarthy, 2008). Outro fato interessante é, que assim como o miR-1, o miR-206 também foi detectado pela miRNA-FISH nas células conjuntivas do tecido muscular branco e vermelho, indicando mais uma vez a provável função regulatória dessas células conjuntivas para a manutenção da homeostasia muscular.

O miR-499 apresentou um padrão de expressão espacial superior no músculo vermelho, de contração lenta (Figura 7I). De fato, a expressão do miR-499 foi ~44 vezes superior no músculo estriado esquelético vermelho quando comparado ao músculo branco pela análise de RT-qPCR (Figura 6). Em outras espécies animais, o miR-499 demonstrou ser de fundamental importância para a manutenção da síntese de miosinas de contração lenta e especificação da fibra oxidativa (Sayed et al., 2007; van Rooij et al., 2007). Curiosamente, o miR-499 apresentou também uma marcação focal em pontos dispersos pelo sarcoplasma,

provavelmente no retículo sarcoplasmático, e em uma estreita faixa no sarcoplasma sub-sarcolemal das fibras do músculo vermelho.

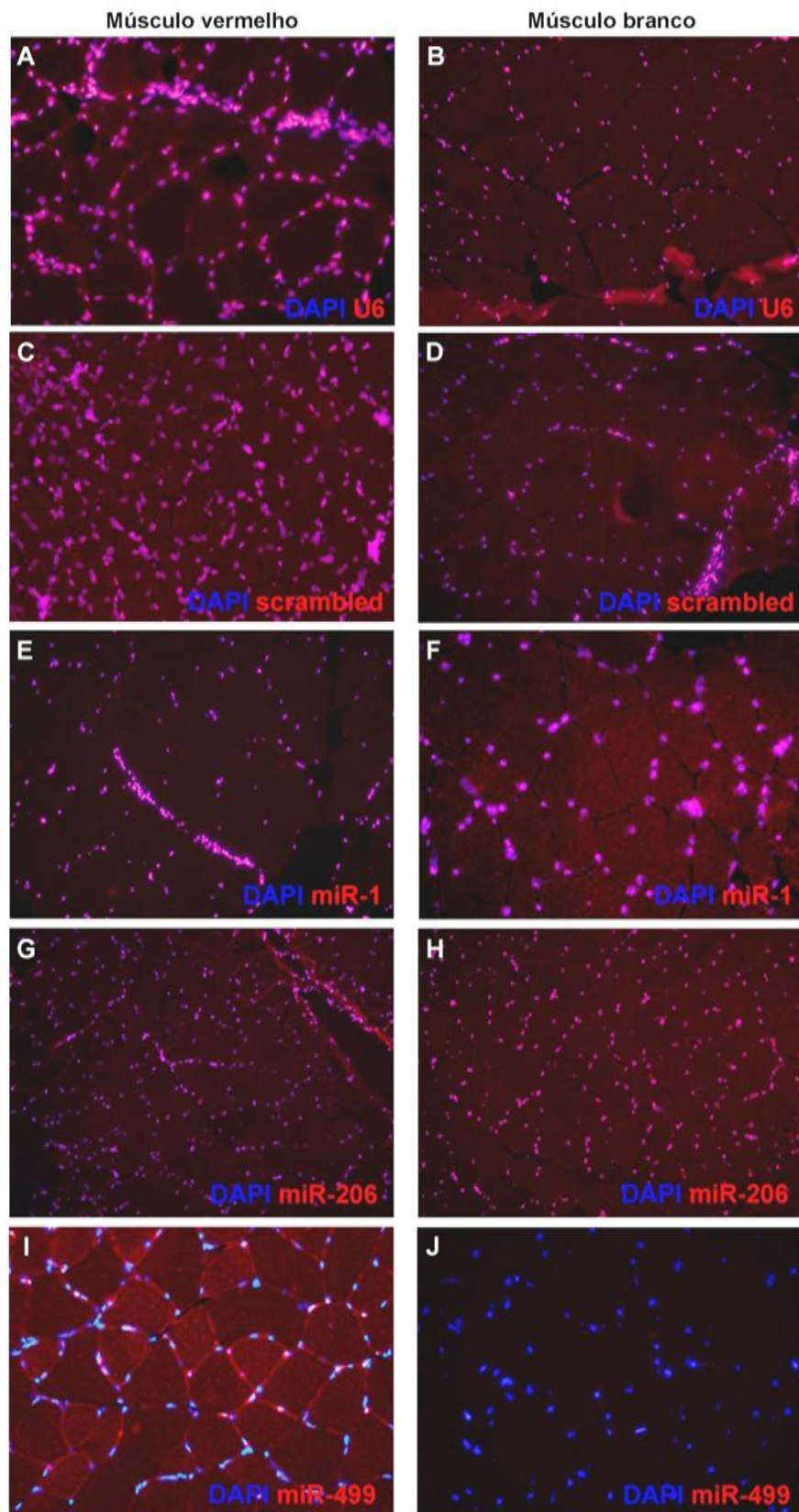


Figura 7. Hibridação *in situ* em cortes histológicos de músculo estriado esquelético vermelho e branco de adultos da tilápia do Nilo demonstrando a expressão de: (A) U6 em músculo vermelho; (B) U6 em músculo branco, 100X; (C) scrambled em músculo vermelho; (D) scrambled em músculo branco, 100X; (E) miR-1 em músculo vermelho; (F) miR-1 em músculo branco, 100X; (G) miR-206 em músculo vermelho; (H) miR-206 em músculo branco, 100X; (I) miR-499 em músculo vermelho, 100X; (J) miR-499 em músculo branco, 100X. *As imagens estão sobrepostas por colaração de DAPI (específica de DNA) e *FastRed* (específica da sonda).

4.3. Predição de alvos e determinação de vias biológicas

A partir dos resultados obtidos com a RT-qPCR e hibridação *in situ*, foi realizada uma busca pelos possíveis genes regulados pelo miR-499. Mais de 200 potenciais alvos foram preditos utilizando-se os bancos de dados on-line: Microcosm (web-site: <http://www.ebi.ac.uk/enrightsrv/microcosm/htdocs/targets/v5/>), DIANA-LAB-mirPath (web-site: <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>) e TargetScan (web-site: <http://www.targetscan.org/>), além dos algoritmos miRANDA (web-site: <http://www.microrna.org/>) e PicTar (web-site: <http://pictar.mdc-berlin.de/>). Um resumo da busca realizada esta representado na Tabela 2.

Tabela 2. Alvos preditos para o miR-499.

Símbolo do gene	Nome do gene	Sítios de ligação no 3'-UTR	Score
PGAP1	post-GPI attachment to proteins 1	5	-1.30
RSBN1	round spermatid basic protein 1	4	-1.17
SOX6	SRY (sex determining region Y)-box 6	4	-0.90
UBE2V2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	3	-0.74
VAV3	vav 3 guanine nucleotide exchange factor	3	-0.61
PTAR1	protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1	4	-0.60
TEGT	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	1	-0.56
JHDM1D	jumonji C domain containing histone demethylase 1 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)	4	-0.55
VCPIP1	valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1	2	-0.54
FNBP4	formin binding protein 4	2	-0.53
ARGLU1	arginine and glutamate rich 1	1	-0.52
ROD1	ROD1 regulator of differentiation 1	2	-0.52
HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)	1	-0.51
RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family	1	-0.51
OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A	1	-0.51

REEP1	receptor accessory protein 1	1	-0.51
RALYL	RALY RNA binding protein-like	1	-0.50
SOS2	son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	2	-0.50
LIN28B	lin-28 homolog B (C. elegans)	2	-0.50
SRGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	2	-0.49
KPNA3	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)	2	-0.46
KIAA2018	KIAA2018	2	-0.43
RPAP2	RNA polymerase II associated protein 2	1	-0.43
PTBP2	polypyrimidine tract binding protein 2	1	-0.43
SYCP2	synaptonemal complex protein 2	1	-0.43

Baseado no *score* e no número de sítios de ligação na região 3'-UTR e vias biológicas associadas, dois genes foram selecionados: o Sox6 (*Sex determining region Y – box 6*) e o Rod1 (*regulator of differentiation 1*). Sox6 é um fator de transcrição relacionado à diferenciação de células musculares (Cohen-Barak et al., 2003) e Rod1 é uma proteína que se liga a RNAs e regula a diferenciação celular (Yamamoto et al., 1999). Além disso, a região 3'-UTR do gene Sox6 e Rod1 contém 4 e 2 sítios de ligação evolutivamente conservados para o miR-499, respectivamente (Figura 8). Esses sítios de ligação possuem um alto nível de complementaridade com a região *seed* do miR-499, sugerindo uma alta probabilidade de regulação dos genes Sox6 e Rod1 pelo miR-499 em diversos grupos de vertebrados.

Assim, esses dois genes foram selecionados para avaliação do perfil de expressão por RT-qPCR nas condições avaliadas. Além disso, o gene Myh7b foi selecionado como controle positivo, uma vez que este é o gene hospedeiro do miR-499 e, de maneira geral, o miRNA intrônico e seu gene hospedeiro apresentam o mesmo padrão de expressão (Ruby et al., 2007).

3'UTR Sox6

	miR-499	miR-499	miR-499
	3'-AUUUGUAGUGAGCGUU <u>CAGAAUU</u> -5'	3'-AUUUGUAGUGAGCGUU <u>CAGAAUU</u> -5'	3'-AUUUGUAGUGAGCGUU <u>CAGAAUU</u> -5'
<i>Homo sapiens</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Pan troglodytes</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Macaca mulatta</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Otolemur garnetti</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Tupaia belangeri</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Mus musculus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Rattus norvegicus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Cavia porcellus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Sorex araneus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Eurhinaceus europaeus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Equus caballus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Bos taurus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Loxodonta africana</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Echinops telfairi</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Monodelphis domestica</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Ornithorynchus anatinus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Gallus gallus</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Anolis carolinensis</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Xenopus tropicalis</i>	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...CAUCA--GCAGAAUG <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Danio rerio</i>	5'...AAUCAAAGGCGUU <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...AAUCAAAGGCGUU <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...AAUCAAAGGCGUU <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Oreochromis niloticus</i>	5'...TTTAAACCGGAUGAGAGCA <u>CAUCACAGUCUGUA</u> ...	5'...TTTAAACCGGAUGAGAGCA <u>CAUCACAGUCUGUA</u> ...	5'...TTTAAACCGGAUGAGAGCA <u>CAUCACAGUCUGUA</u> ...

3'UTR Rod1

	miR-499	miR-499	miR-499
	3'-AUUUGUAGUGAGCGUU <u>CAGAAUU</u> -5'	3'-AUUUGUAGUGAGCGUU <u>CAGAAUU</u> -5'	3'-AUUUGUAGUGAGCGUU <u>CAGAAUU</u> -5'
<i>Homo sapiens</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Pan troglodytes</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Macaca mulatta</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Otolemur garnetti</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Tupaia belangeri</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Mus musculus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Rattus norvegicus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Cavia porcellus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Sorex araneus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Eurhinaceus europaeus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Equus caballus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Bos taurus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Loxodonta africana</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Echinops telfairi</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Monodelphis domestica</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Ornithorynchus anatinus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Gallus gallus</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Anolis carolinensis</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Xenopus tropicalis</i>	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...	5'...UUUCAG--AA-AAAAAGUUU <u>ACAGUCUUAA</u> ...
<i>Danio rerio</i>	5'...AAUCAAAGGCGUU <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...AAUCAAAGGCGUU <u>GGUCUUAA</u> ...	5'...AAUCAAAGGCGUU <u>GGUCUUAA</u> ...
<i>Oreochromis niloticus</i>	5'...TTTAAACCGGAUGAGAGCA <u>CAUCACAGUCUGUA</u> ...	5'...TTTAAACCGGAUGAGAGCA <u>CAUCACAGUCUGUA</u> ...	5'...TTTAAACCGGAUGAGAGCA <u>CAUCACAGUCUGUA</u> ...

Figura 8. Sítios de ligação conservados do miR-499 no 3'UTR dos genes Sox6 e Rod1 em 22 espécies de vertebrados. As letras vermelhas representam a região *seed* do miR-499. As letras em azul representam a sequência complementar ao *seed* no 3'UTR.

4.4. Análise de expressão dos alvos do miR-499

Seguindo o padrão de expressão diferencial do miR-499 nas comparações anteriormente realizadas, três comparações foram estabelecidas para a análise dos genes alvos, Sox6 e Rod1: (i) MB x MV em machos, (ii) MB x MV em fêmeas e (iii) MB x MV independente do sexo.

Com relação ao Sox6, a comparação de RQ entre os tipos musculares MB e MV mostrou um nível de expressão de ~7 vezes inferior no músculo vermelho (RQ=0,154; p=0,001) em ambos os sexos (Figura 9). Curiosamente, o nível de expressão do Rod1 foi de ~2,5 vezes superior no músculo vermelho (RQ=2,330; p=0,001). O perfil de expressão do Myh7b foi de ~44 vezes superior no músculo vermelho, nível este semelhante ao perfil observado para o miR-499.

A partir dos dados obtidos foi confirmada a inibição e/ou desestabilização do Sox6 pelo miR-499 na tilápia do Nilo, o que corrobora os resultados obtidos por Wang et al. (2011) em *zebrafish*. Esses autores demonstraram a ação inibitória do miR-499 sobre o Sox6 durante o desenvolvimento muscular de *zebrafish*, utilizando a técnica de hibridação *in situ*. O Sox6 é reponsável pela diferenciação e manutenção de células musculares de contração rápida (Sluijter et al., 2010; An et al., 2011). Com a repressão do Sox6, as células musculares se diferenciam em células musculares de contração lenta (An et al. 2011; Quiat et al., 2011). Além disso, Hosoda et al. (2011) também demonstraram a ação inibitória do Sox6 pelo miR-499 *in vitro* em células mio-satélites cardíacas de camundongo e humano. Esses autores relataram um elevado um alto nível de expressão do miR-499 e um baixo nível de expressão do Sox6 em células musculares de contração lenta, como as células presentes em músculo vermelho de peixes, inclusive na tilápia do Nilo.

Assim, podemos considerar o processo de ação do Sox6 no músculo como conservado em vertebrados.

Estudos prévios em mamíferos relataram a função essencial do gene Sox6 na diferenciação final e manutenção de fibras musculares de contração rápida. A atividade de Sox6 inibe as vias moleculares de diferenciação de fibras musculares de contração lenta (von Hofsten et al., 2008; Quiat et al., 2011). Um dos alvos inibido pelo Sox6 é o gene da miosina de cadeia pesada Myh7b, o qual é parte integrante da unidade funcional das fibras musculares de contração lenta. Interessantemente, o Myh7b é o gene hospedeiro do miR-499, que por um mecanismo de *feedback* negativo inibe a expressão de Sox6.

Ainda com relação ao Sox6, Wang et al. (2011) também descreveram uma via adicional, específica de teleósteos, envolvendo o gene Prdm1a. Nessa via, Prdm1a regula negativamente Sox6, o que ativa a transcrição de Myh7b e miR-499. Com o aumento da transcrição do miR-499, há a inibição de Sox6, o que, indiretamente, promove a transcrição e atividade aumentada do Myh7b, realizando, assim, a manutenção das fibras musculares de contração lenta pré-existentes. Há também uma possível atuação na diferenciação de fibras musculares em processo de miogênese vizinhas, através de um mecanismo cross-talk do miR-499 (Hosoda et al., 2011).

Interessantemente, o nível de expressão do Rod1 foi maior no músculo vermelho (contração lenta) do que no músculo branco (contração rápida) da tilápia do Nilo. Esse padrão de expressão foi o mesmo detectado por Hosoda et al. (2011) em células miosatélites cardíacas de humano e camundongo. Estas células se diferenciam em fibras musculares de contração lenta, que são características de músculo cardíaco e músculo vermelho de peixes. O Rod1 possui uma ação inicial

no processo de diferenciação das fibras musculares de contração rápida, como as presentes em grande quantidade no músculo branco. Quando há a diminuição do nível das proteínas ROD1, as células miosatélites entram em processo de diferenciação para fibras musculares de contração lenta.

Segundo Hosoda et al. (2011), o miR-499 inibe efetivamente a expressão das proteínas SOX6 e ROD1. Aparentemente, a taxa de inibição da tradução é maior do que a taxa de degradação do RNA mensageiro, considerando-se a regulação de Rod1 pelo miR-499, enquanto que a taxa de degradação do RNA mensageiro é maior que a taxa de inibição da tradução em relação à regulação de Sox6 pelo miR-499. Provavelmente, essa diferença seja decorrente da presença de 4 e 2 sítios de ligação para o miR-499 no 3'UTR do Sox6 e Rod1, respectivamente. Sabe-se que um miRNA pode ter diferentes mecanismos de ação para alvos diferentes (Stadler et al., 2012).

Nesse contexto, pode-se afirmar que a alta expressão do miR-499 detectada nas fibras musculares vermelhas da tilápia do Nilo atua inibindo os produtos de transcrição e tradução dos genes Sox6 e Rod1 em diferentes intensidades. Conseqüentemente, diferentes processos como miogênese (proliferação, diferenciação e especificação do tipo de fibra), regeneração e hipertrofia das fibras musculares, sabidamente regulados por miRNAs (revisado por Gagan et al., 2012), tenderiam a ser inibidos ou desacelerados pela presença do miR-499 nas fibras musculares vermelhas, o que de fato é característico dessas fibras. Por outro lado, nas células musculares brancas, onde foi detectada baixa atividade do miR-499 em adultos, esses processos são favorecidos pela maior ação das proteínas SOX6 e ROD1.

Para testar essa hipótese, uma análise da expressão do RNA mensageiro e da proteína SOX6 será realizada por hibridação *in situ* e imuno-histoquímica, respectivamente, para confirmação da atividade do miR-499 na repressão e degradação do Sox6. Devido à inexistência de anticorpos comerciais para a proteína ROD1 em peixes, utilizar-se-á a técnica de hibridação *in situ* para confirmação da interação do miR-499 com RNA mensageiro de Rod1 no músculo vermelho. Essa técnica se constituirá numa FISH multiplex, para co-localização de Rod1 e miR-499, com o emprego de sondas específicas marcadas com diferentes fluoróforos para os genes miR-499 e Rod1. Essa estratégia de análise funcional permitirá a detecção das duas sondas na mesma reação de hibridação (co-localização) e validará a interação efetiva do miR-499 na região 3'UTR do Rod1.

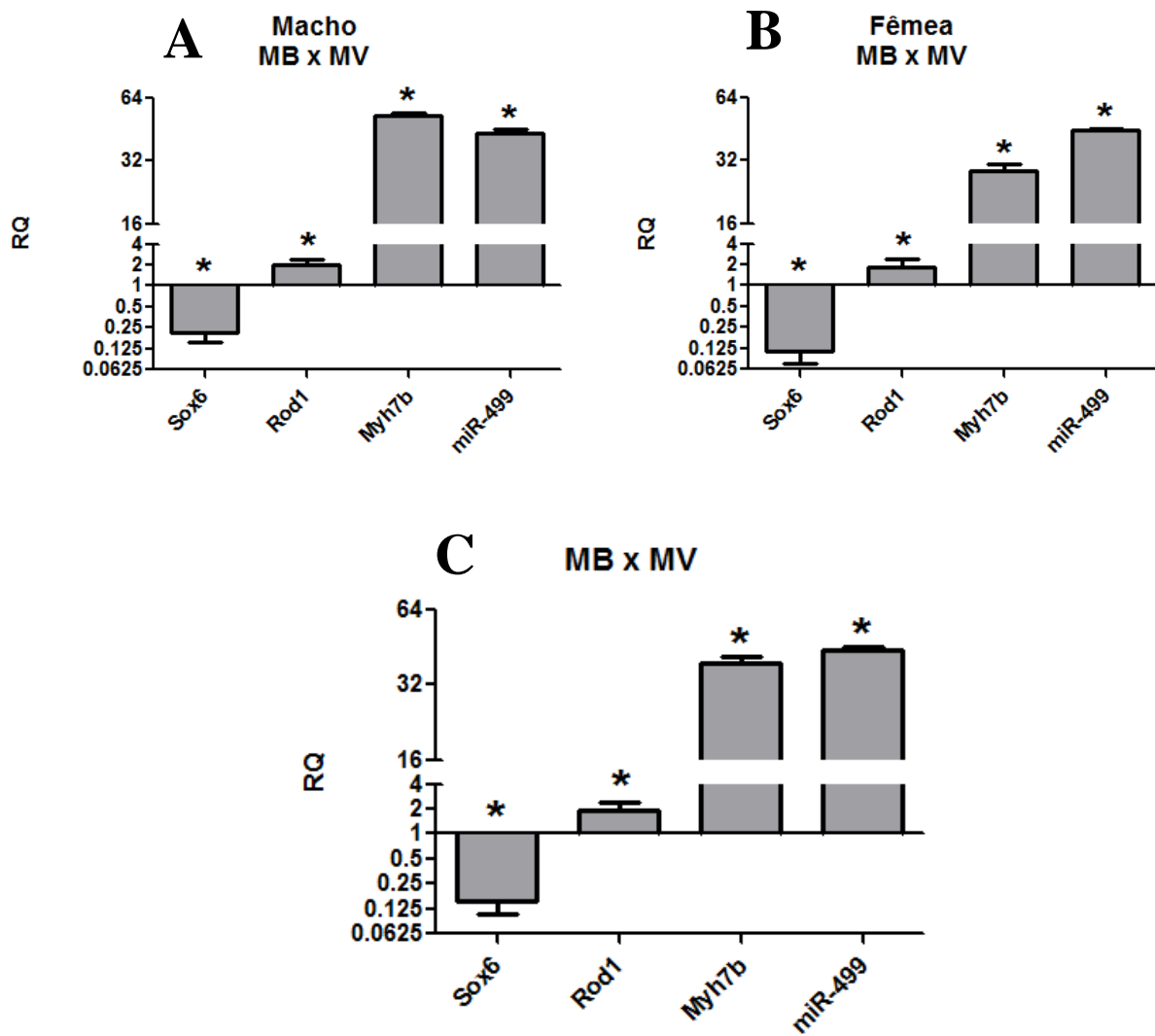


Figura 9. Níveis de expressão gênica do miR-499, seu gene hospedeiro e seus alvos no músculo esquelético de adultos da tilápia do Nilo. Comparações entre os tipos musculares em machos (A), em fêmeas (B) e independente do sexo (C). Os valores de RQ estão apresentados na base de Log 2. Valores significativos estão indicados com um asterisco (*). MB – músculo branco; MV – músculo vermelho; RQ – quantidade relativa de transcrito.

4.5. Análise genômica comparativa

A análise genômica comparativa de diversos miRNAs músculo-específicos conduzidas no presente estudo propiciou avanços significativos quanto ao entendimento da dinâmica e padrões organizacionais desses genes regulatórios em espécies de peixes e outros vertebrados. Os genes de miRNAs têm sido amplamente utilizados para resolver problemas filogenéticos de grupos taxonômicos (Sempere et al., 2006; Heimberg et al., 2010; Campbell et al., 2011). Porém, de forma geral, informações comparativas estruturais e da dinâmica dos genes de miRNAs são ainda pouco frequentes na literatura. Algumas informações relativas aos miRNAs estudados foram compiladas e organizadas na Tabela 3.

Tabela 3. Características gerais dos miRNAs músculo-específicos.

miRNA	Gene Hospedeiro	Família	Alvos Confirmados	Expressão no músculo
miR-1-1	Intergênico	miR-1	HDAC4, Cx43, Pax7, c-Met, G6PD, Hand2	Cardíaco, Esquelético
miR-1-2	Mib1	miR-1	HDAC4, Cx43, Pax7, c-Met, G6PD, Hand2	Cardíaco, Esquelético
miR-133a-1	Mib1	miR-133	SRF, nPTB, UCP2	Cardíaco, Esquelético
miR-133a-2	Intergênico	miR-133	SRF, nPTB, UCP2	Cardíaco, Esquelético
miR-133b	Intergênico	miR-133	SRF, nPTB, UCP2	Esquelético
miR-206	Intergênico	miR-1	DNApol α , Fstl1, Utrn, Cx43, TIMP3 Pax7, c-Met, HDAC4	Esquelético
miR-208a	Myh6	miR-208	THRAP1, Pur β	Cardíaco
miR-208b	Myh7	miR-208	THRAP1, Pur β	Cardíaco (\downarrow), Esquelético
miR-214	Dnm3	miR-214	Su(fu), Ezh2, N-Ras	Esquelético
miR-499	Myh7b	miR-208	Sox6, Pur β , Rod1	Cardíaco (\downarrow), Esquelético

O símbolo “ \downarrow ” indica um baixo nível de expressão do gene no tecido. Referências: Flynt et al., 2007; van Rooij et al., 2007; Zhao et al., 2007; Liu et al., 2008; van Rooij et al., 2008; Callis et al., 2009; van Rooij et al., 2009; Williams et al., 2009.

Primeiramente, a busca realizada para localização genômica dos miRNAs músculo-específicos permitiu detectar padrões bastante variáveis de distribuição cromossômica desses genes entre as espécies de peixes investigadas (Tabela 4).

Tabela 4. Localização genômica dos miRNAs músculo-específicos em peixes.

miRNA	<i>Zebrafish</i>	<i>Medaka</i>	<i>Stickleback</i>	<i>Tetraodon</i>	<i>Fugu</i>	Tilápia do Nilo
miR-1-1/-133a-2	Chr_23	Chr_7	S_6	-	-	S_80
miR-1-2/-133a-1	S_3540	Chr_17	S_15	Chr_15	S_68	S_1
miR-206/-133b	Chr_20	Chr_24	S_21	Chr_14	S_72	S_183
miR-208a	-	-	-	-	-	-
miR-208b	-	-	-	-	-	-
miR-214	Chr_20	Chr_4	S_67	Chr_1	S_13	S_7
miR-214-par	-	Chr_17	S_15	Chr_15	S_367	S_131
miR-499	Chr_11	Chr_5	S_18	Chr_11	S_79	S_19

O símbolo “/” indica que dois miRNAs estão clusterizados na mesma unidade transcricional; “Chr_” abreviação para cromossomo; “S_” abreviação utilizada para *scaffold*. “-” indica que o gene não foi localizado no genoma.

A análise genômica comparativa também revelou que os genes miR-208a e miR-208b não estão presentes no genoma dessas espécies de peixes. Assim, realizou-se uma busca mais minuciosa no genoma de 50 outras espécies de vertebrados, compreendendo anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Essa análise constatou a presença dos miR-208a e miR-208b em espécies de mamíferos, enquanto apenas uma cópia do miR-208 foi detectada em espécies de anfíbios, répteis e aves.

Considerando-se que os miR-208a e o miR-208b são intrônicos aos genes da miosina de cadeia pesada Myh6 e Myh7b, respectivamente, realizou-se uma busca por este gene hospedeiro no genoma de peixes. Interessantemente, apenas o gene Myh6 está presente no genoma de peixes, porém não possui o miR-208a intrônico associado. Este dado indica que a presença do miR-208a restringe-se aos grupos taxonômicos de anfíbios, répteis, aves e mamíferos. A cópia paróloga desse miRNA,

o miR-208b, restringe-se ao grupo taxonômico de vertebrados considerados evolutivamente mais derivados, os mamíferos.

Apesar das espécies de peixes não possuírem o miR-208, considerado essencial para a manutenção das fibras de contração lenta presentes no músculo cardíaco (van Rooij et al., 2009), foram detectadas três cópias do miR-499 e seu gene hospedeiro (Myh7b) no genoma de *zebrafish*. Duas dessas cópias estão próximas e co-localizadas no mesmo cromossomo. Esse padrão de organização segue o exibido pelo miR-208 e seus genes hospedeiros em mamíferos (Figura 10). Porém, essas duas cópias foram detectadas apenas no genoma de *zebrafish*. Análises minuciosas nos genomas das outras espécies de peixes estão em andamento para detectar a existência desse padrão. Por outro lado, foi detectado apenas uma cópia do gene de Myh7b e do miR-499 no genoma de todas as outras espécies de vertebrados em uma região genômica distinta da região que contém os genes de miR-208 e seus genes hospedeiros.

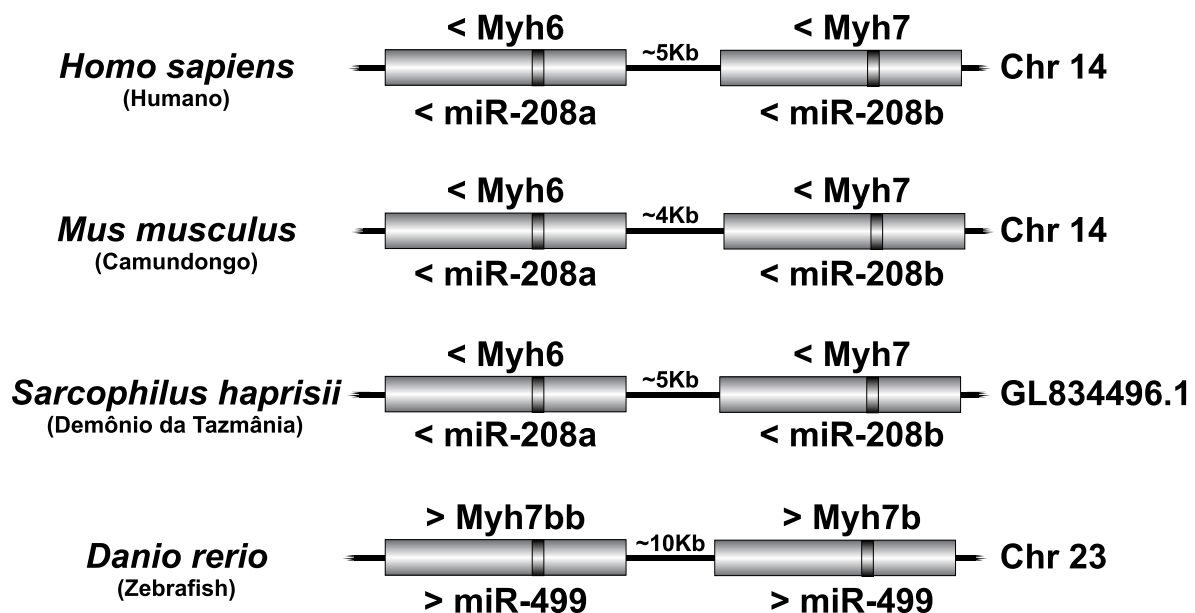


Figura 10. Esquema do padrão de organização do miR-208 e seu gene hospedeiro em mamíferos. As duas cópias do miR-499 e seu gene hospedeiro seguem o mesmo padrão de organização no genoma de *zebrafish*. ">" indica que o gene está no sentido senso; "<" indica que o gene está no sentido antisenso.

Os resultados obtidos sugerem que o aumento do número de cópias do miR-499 em peixes compensaria a falta do miR-208. Uma hipótese é que o miR-499 realizaria, nas espécies de peixes, as mesmas funções que o miR-208 possui em mamíferos. Isso porque o miR-499 pertence à mesma família do miR-208 (Tabela 4), pois ambos compartilham a mesma sequência *seed*, e, conseqüentemente, possuem diversos potenciais genes alvo em comum (Figura 11).

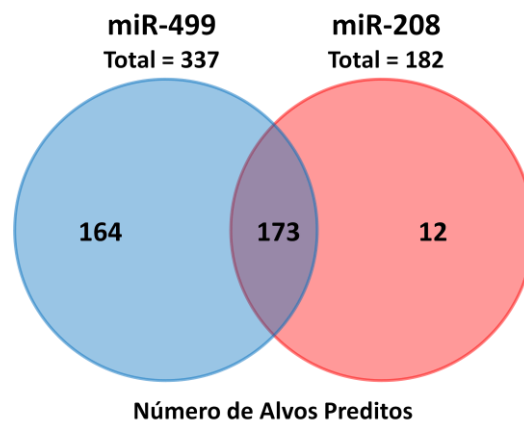


Figura 11. Número de genes alvos exclusivos e compartilhados entre miR-208 e miR-499 obtidos por predição *in silico*.

Outro dado interessante, foi a não detecção dos miRNAs miR-1-1/133a-2 no genoma das espécies *tetraodon* e *fugu*. A inexistência desses genes no genoma dessas espécies pode decorrer da falta de anotações, da disponibilização do genoma ainda incompleto ou mesmo da deleção desses genes na ordem Tetraodontiformes. Análises mais robustas estão em desenvolvimento para elucidar esses questionamentos.

Com relação aos miRNAs miR-1-2/-133a-1, -206/-133b, -214 e -499, foi possível realizar uma análise de sintonia das regiões cromossômicas flangeadoras. Essas análises, com o uso de zebrafish como referência, revelaram um alto grau de sintonia dos genes flangeadores dos miRNAs miR-499, miR-206/-133b e miR-1-2/-133a-1 (Figura 12, 13 e 14, respectivamente). Excepcionalmente, para o miR-1-2, o

genoma utilizado como referência foi o da tilápia do Nilo, pois esse gene se encontra em um *scaffold* ainda não associado aos cromossomos de *zebrafish*. Por isso, no caso específico do miR-1-2/-133a-1, a identificação de poucos genes flanqueadores no genoma de *zebrafish*, deve ser decorrente do tamanho limitado do *scaffold*, o qual contém apenas 281342pb.

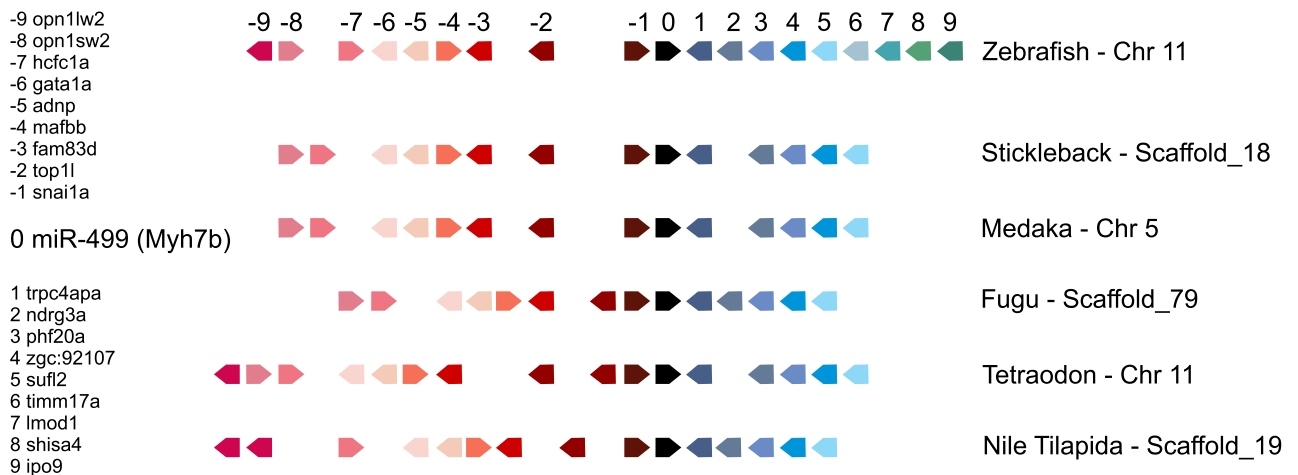


Figura 12. Representação esquemática de segmentos cromossômicos e *scaffolds* contendo a região sintênica do miR-499 e seu gene hospedeiro (Myh7b) utilizando o genoma de *zebrafish* como referência. Os números localizados à esquerda e acima dos pentágonos coloridos referenciam os mesmos genes em diferentes espécies de peixes. Em cada espécie, a localização genômica do segmento analisado está descrita à direita.

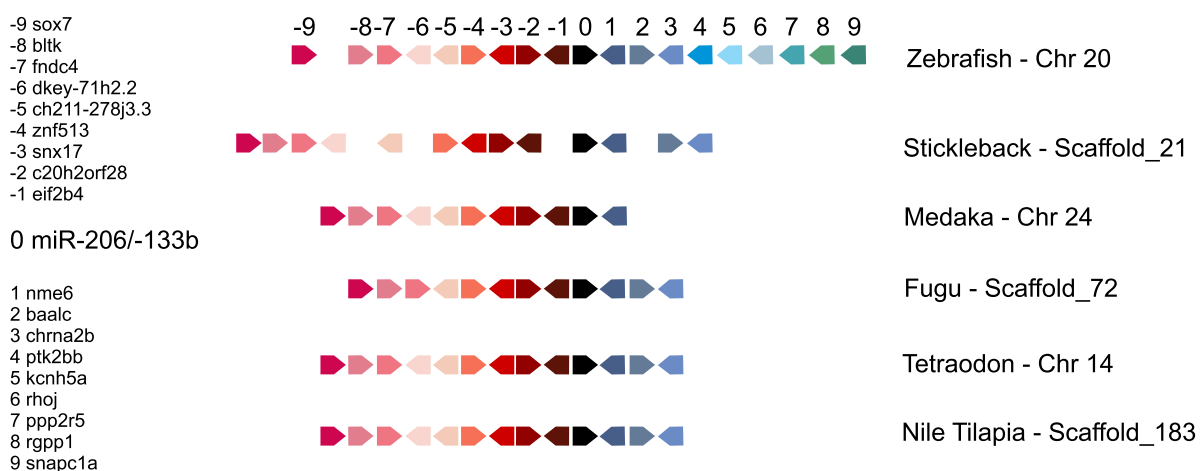


Figura 13. Representação esquemática de segmentos cromossômicos e *scaffolds* contendo a região sintênica do miR-206/-133b utilizando o genoma de *zebrafish* como referência. Os números localizados à esquerda e acima dos pentágonos coloridos referenciam os mesmos genes em diferentes espécies de peixes. Em cada espécie, a localização genômica do segmento analisado está descrita à direita.

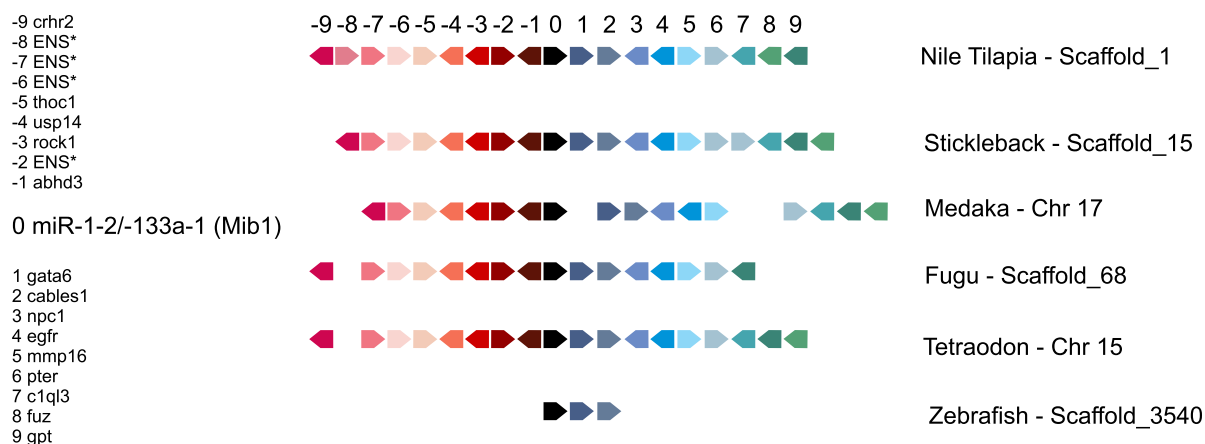


Figura 14. Representação esquemática de segmentos cromossômicos e *scaffolds* contendo a região sintênica do miR1-2/-133a-1 utilizando o genoma da tilápia do Nilo como referência. Os números localizados à esquerda e acima dos pentágonos coloridos referenciam os mesmos genes em diferentes espécies de peixes. Em cada espécie, a localização genômica do segmento analisado está descrita à direita. *ENS = gene anotado por similaridade a um gene de outra espécie.

De modo geral, o miR-214 também apresentou conservação no padrão dos genes flaqueadores nas espécies analisadas. Entretanto, no genoma de *tetraodon* foi encontrado um rearranjo nos genes próximos ao miR-214 (os genes *pigc*, *tmed5* e *c20h1orf9*), possivelmente, resultado de um evento de translocação nesses genes (Figura 15). Outro fato interessante sobre o miR-214, foi a detecção de duas cópias desse miRNA e seu gene hospedeiro em um locus diferente nos genomas das espécies *medaka*, *stickleback*, *tetraodon*, *fugu* e tilápia do Nilo. Por outro lado, no genoma de *zebrafish* apenas uma cópia foi detectada, resultado diferente do publicado por Thatcher et al. (2008), que havia mencionado a existência de duas cópias do miR-214 nessa espécie.

Por conta da ausência dessa cópia paróloga em *zebrafish*, daqui em diante referida como “miR-214-par”, uma análise dos genes flaqueadores desse miR-214-par foi realizada utilizando-se o genoma da tilápia do Nilo como referência. Esta análise revelou um alto grau de sintenia entre todas as espécies de peixes, exceto *zebrafish*, que não possui a cópia miR-214-par (Figura 16).

A partir desses resultados foi realizada uma análise no genoma de *zebrafish* na tentativa de localizar os genes flanqueadores do miR-214-par, e conseqüentemente, detectar a possível existência desse parólogo. Os dados obtidos mostram que esses genes flanqueadores estão, de fato, no cromossomo 20 do genoma de *zebrafish*, localizados *downstream* (3') à região que contém o miR-214 e seu gene hospedeiro (Dnm3). Porém esta região cromossômica, onde os genes flanqueadores foram localizados, não apresentou o miR-214-par nem o seu gene hospedeiro Dnm3 (Figura 17).

Juntos estes dados sugerem que no genoma dos peixes analisados, à exceção de *zebrafish*, ocorreram dois eventos: um primeiro evento de duplicação dos genes miR-214 e Dnm3, seguido por um segundo evento de transposição desses genes para um novo local do genoma. Embora esse seja um cenário plausível, análises mais aprofundadas se fazem necessárias para maiores inferências acerca da evolução do gene miR-214.

Outro fato interessante, foi que a partir de uma busca por parálogos dos genes miR-214 e Dnm3 em outras 48 espécies de vertebrados, realizada nas bases de dados miRBase e Ensembl, verificou-se que, assim como em *zebrafish*, apenas uma cópia do miR-214 e Dnm3 estão presentes no genoma dessas outras espécies de vertebrados, inclusive nas espécies de peixes *Gadus morhua* (bacalhau) e *Latimeria chalumnae* (celacanto).

Esta segunda análise sugere que os eventos de duplicação e translocação possivelmente se restringiram a algumas espécies, como *medaka*, *stickleback*, *tetraodon*, *fugu* e tilápia do Nilo. Filogeneticamente, essas espécies pertencem à mesma superordem, os Acanthopterygii, enquanto *zebrafish* e bacalhau pertencem à superordem Ostariophysii e Paracanthopterygii, respectivamente, e o celacanto

pertence à classe Sarcopterygii. Desse modo, pode-se hipotetizar dois diferentes cenários evolutivos. O primeiro, no qual o miR-214-par teria se originado em um ancestral comum à Osteichthyes e foi perdido em diversas linhagens, porém se manteve em Acanthopterygii; e um segundo, onde a duplicação gênica ocorreu especificamente em Acanthopterygii, o que é mais provável, uma vez que perdas de genes de miRNAs funcionais são extremamente raras (Sperling e Peterson, 2009).

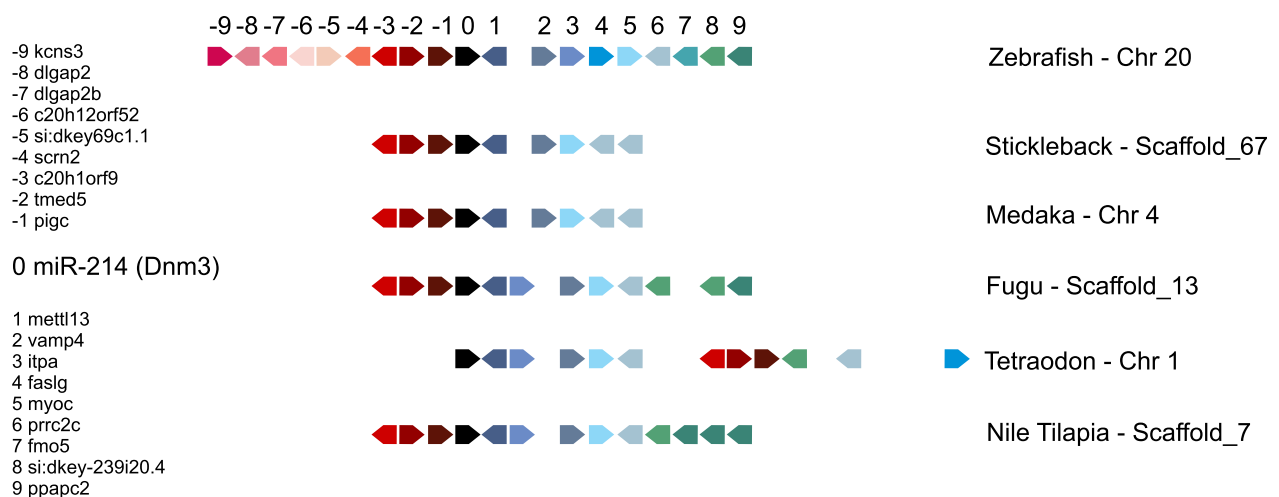


Figura 15. Representação esquemática de segmentos cromossômicos e *scaffolds* contendo a região sintênica do miR-214 e seu gene hospedeiro (Dnm3) utilizando o genoma de *zebrafish* como referência. Os números localizados à esquerda e acima dos pentágonos coloridos referenciam os mesmos genes em diferentes espécies de peixes. Em cada espécie, a localização genômica do segmento analisado está descrita à direita.

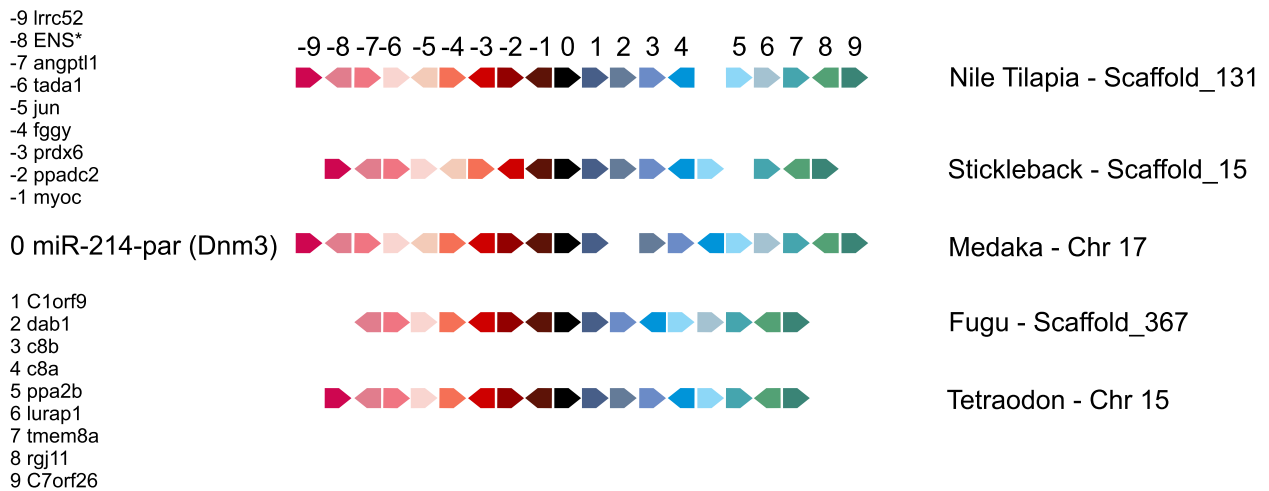


Figura 16. Representação esquemática de segmentos cromossômicos e *scaffolds* contendo a região sintênica do miR-214-par e seu gene hospedeiro (Dnm3) utilizando o genoma da tilápia do Nilo como referência. Os números localizados à esquerda e acima dos pentágonos coloridos referenciam os mesmos genes em diferentes espécies de peixes. Em cada espécie, a localização genômica do segmento analisado está descrita à direita. *ENS = gene anotado por similaridade a um gene de outra espécie.

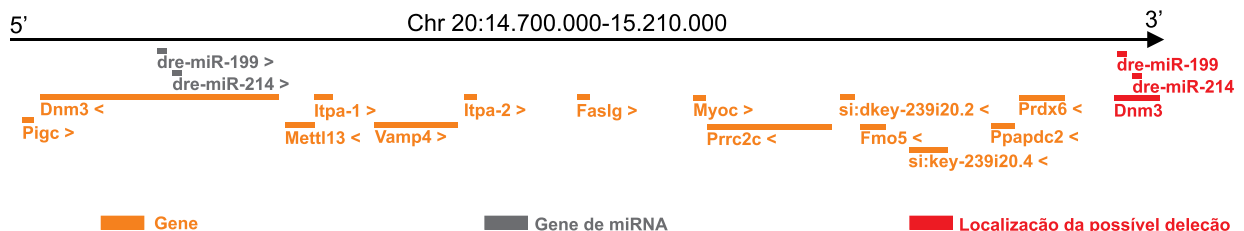


Figura 17. Segmento do cromossomo 20 de *zebrafish* que possui o miR-214. Em laranja estão representados os genes. Em cinza estão representados os genes de miRNAs. Em vermelho está representada a possível localização do parálogo identificado nas outras espécies de peixes, que é inexistente em *zebrafish*. Os símbolos “<” e “>” representam o sentido do gene.

Para confirmação do miR-214-par como um gene de miRNA e parálogo do miR-214, foi primeiramente realizado o alinhamento da sequência precursora (pré-miRNA) do miR-214-par detectado nas espécies de peixes e do miR-214 nas

mesmas espécies de peixes e em outros vertebrados (anfíbios, répteis, aves e mamíferos). Essa análise revelou um mesmo padrão de sequência precursora e a conservação do miRNA maduro, 100% de similaridade entre miR-214 e miR-214-par (Loh et al., 2011). Além do alinhamento, uma análise da estrutura secundária desses miRNAs foi realizada para confirmação do parálogo como um miRNA, uma vez que a estrutura secundária em forma de *hairpin* é essencial para o processo de biogênese (ver Berezikov, 2012). A partir do alinhamento, onde foram comparadas 49 espécies de vertebrados, uma árvore filogenética foi gerada para auxiliar na determinação da dinâmica evolutiva do gene miR-214.

Como resultado tem-se que o alinhamento da sequência precursora ressaltou a semelhança entre o miR-214 e o miR-214-par, confirmando a similaridade do miRNA maduro (Figura 17A). Além disso, a análise da estrutura secundária validou o parálogo como um gene de miRNA, devido à probabilidade do transcrito desse gene formar uma estrutura em *hairpin* (Figura 17B). Ainda, a árvore gerada para o miR-214 demonstrou que a diferença entre os parálogos, embora restrita a poucos nucleotídeos, é extremamente consistente, visto que o miR-214-par formou um clado distinto do miR-214 (98 de *bootstrap*; Figura 18). Além disso, o clado do miR-214-par surgiu a partir do clado do miR-214 de peixes (60 de *bootstrap*). De maneira intrigante, o miR-214-par e o miR-214 do *stickleback* ficaram muito próximos na árvore (100% de similaridade da sequência e 85 de *bootstrap*), isto indica que eles surgiram do mesmo ancestral e possuíram a mesma pressão evolutiva, o que manteve as duas cópias similares (Figura 17). Esses resultados confirmam o miR-214-par como um parálogo do miR-214 e ressaltam a evidência de que o evento de duplicação do miR-214 é restrito à superordem Acanthopterygii, além de revelar a necessidade de uma nova nomenclatura para esses genes de miRNA.

Figura 17. Alinhamento e estrutura secundária do miR-214. (A) Conservação da sequência precursora do miR-214 e miR-214-par. A barra cinza indica o miRNA maduro e a barra preta indica a região seed; (B) Estrutura secundária consenso do miR-214 e miR-214-par.

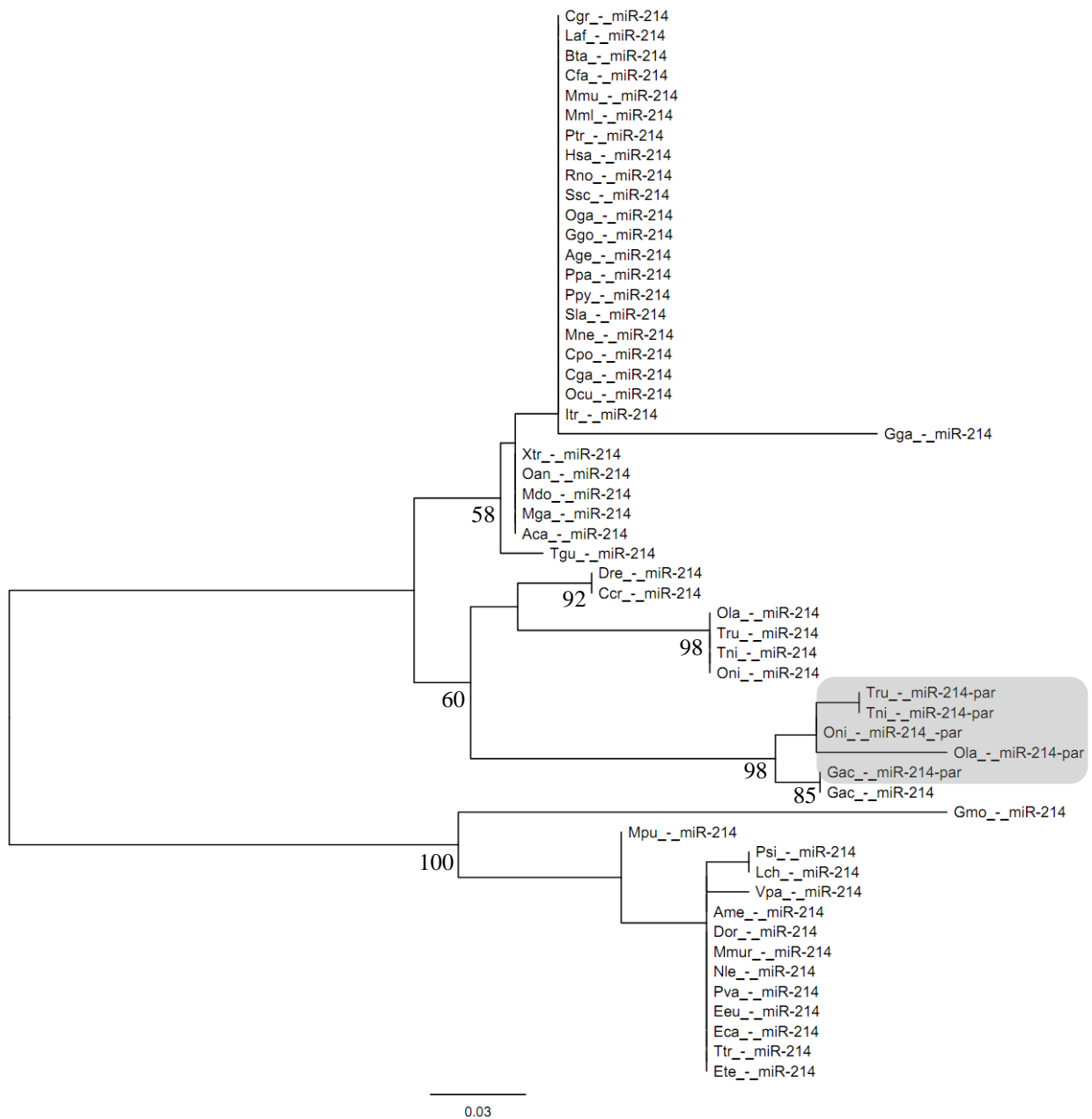


Figura 18. Árvore filogenética do miR-214. Em destaque esta representado o clado divergente formado pelas sequências precursoras do miR-214-par presente no genoma de algumas espécies de peixes. Aca – lagarto; Age – Macaco-aranha; Ame – Panda; Bta – Boi; Ccr – Carpa; Cga - Sagui; Cgr - Hamster; Cpo – Porquinho-da-Índia; Dor – *Kangaroo rat*; Dre - *Zebrafish*; Eca – Cavalo; Eeu – Porco-espinho; Ete – *Tenrec*; Gac – *Stickleback*; Gga – galinha; Ggo - Gorila; Gmo – Bacalhau; Hsa – Homem; Laf - Elefante; Lch - Celacanto; Mdo – Gambá; Mga – Peru; Mml – *Rhesus*; Mmu – Camundongo; Mne - Macaco; Mmur - Lêmure; Mpu - Furão; Nle - Gibão; Oan – Ornitórrinco; Ocu - Coelho; Oga - *Bushbaby*; Ola - *Medaka*; Oni - Tilápia; Ppa - Bonobo; Ppy - Orangotango; Psi - Tartaruga; Ptr – Chimpanzé; Pva - *Megabat*; Rno - Rato; Sla - Sagui; Tgu – Tentilhão; Tni – *Tetraodon*; Tru – *Fugu*; Ttr – Golfinho; Vpa - Alpaca; Xtr – Sapo.

5. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos por RT-qPCR e hibridação *in situ* constatou-se a importância dos miRNAs para regulação de vias biológicas relacionadas à manutenção do fenótipo particular exibido por células vermelhas e brancas do músculo estriado esquelético. Assim, conclui-se que o alto nível de expressão do miR-499 no músculo vermelho confirma sua atividade regulatória em fibras de contração lenta em peixes. Além disso, pode-se afirmar que o miR-499 exerce um papel regulatório sobre os genes Sox6 e o Rod1, na tilápia do Nilo, e sugerir que essa via regulatória apresenta-se evolutivamente conservada entre peixes e mamíferos. Porém, alguns experimentos ainda são necessários para auxiliar na compreensão do conjunto de genes envolvidos nas vias de diferenciação de fibras musculares em peixes.

Do ponto de vista genômico, os dados das análises comparativas mostraram-se promissores para a compreensão da dinâmica evolutiva de genes de miRNAs. Esses resultados permitem concluir que o miR-208 não está presente no genoma das espécies de peixes, considerando-se os genomas atualmente disponíveis. Sugerem ainda a existência de uma cópia paróloga do miR-214 restrita à superordem Acanthopterygii. Portanto, uma nova nomenclatura para referenciar corretamente os parálogos do miR-214 será proposta (i.e. miR-214-1 e miR-214-2).

Em linhas gerais, conclui-se que os dados gerados podem servir como ferramenta tanto em estudos de genômica funcional, pela validação de protagonistas nas vias moleculares relacionadas à biologia muscular, quanto para nortear o entendimento da estruturação dos genomas, ao auxiliar na validação de genes de miRNAs como marcadores de processos evolutivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altringham JD, Johnston IA (1988) The innervation pattern of fast myotomal muscle in the teleost *Myoxocephalus scorpius*: A reappraisal. *Fish Physiology and Biochemistry*, 6(5):309-313.
- Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS (2008) The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science*, 319(5871):1787-9.
- An C, Dong Y, Hagiwara N (2011) Genome-wide mapping of Sox6 binding sites in skeletal muscle reveals both direct and indirect regulation of muscle terminal differentiation by Sox6. *BMC Developmental Biology*, 11:59.
- Ason B et al (2006) Differences in vertebrate microRNA expression. *PNAS*, 103(39):14385–14389.
- Avril-Sassen S et al (2009) Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. *BMC Genomics*, 10: 548-63.
- Bannister SC, Tizard ML, Doran TJ, Sinclair AH, Smith CA (2009) Sexually dimorphic microRNA expression during chicken embryonic gonadal development. *Biol Reprod*, 81:165–176.
- Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, 141(3):988-99.
- Barik S (2008) An intronic microRNA silences genes that are functionally antagonistic to its host gene. *Nucleic Acids Res*, 36:5232–5241.
- Baskerville S, Bartel DP (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11:241–247
- Bartel DP, Chen CZ (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nature*, 5:396-400.
- Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI (2001) Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197:283-301.
- Begemann G (2008) MicroRNAs and RNA interference in zebrafish development. *Zebrafish*, 5(2): 111-9.
- Bell ML, Buvoli M, Leinwand LA (2010) Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. *Mol. Cell. Biol.*, 30(8):1937.
- Berezikov E et al. (2006) Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nature Genet.* 38: 1375-1377.
- Berezikov E (2012) Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews*, 12:846-860.

- Bilen J, Liu N, Burnett BG, Pittman RN, Bonini NM (2006) MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell*, 24:157–163.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12): 1097-1101.
- Borges AM, Moretti JOC, McManus C (2005) Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo de linhagem chiltralada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(2):153-159.
- Boscolo WR, Hayashi C, Soares CM (2001) Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5):1391-1396.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3):e85.
- Brown RH (2012) A reinnervating microRNA. *Science*, 326:1494.
- Burke JE, Sashital DG, Zuo X, Wang YX, Butcher SE (2012) Structure of the yeast U2/U6 snRNA complex. *RNA*, 18(4):673-83.
- Bustin SA et al (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4):611–622.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12):1957-66.
- Callis TE et al (2008) Muscling through the microRNA world. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(2):131-8.
- Campbell LI et al (2011) MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *PNAS*, 108(38):15921.
- Campo-Paysaa F, Semon M, Cameron RA, Peterson KJ, Schubert M (2011) MicroRNA complements in deuterostomes: origin and evolution of microRNAs. *Evol Dev*, 13:15-27.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740):1559-63.
- Chang TC, Mendell JT (2007) Roles of microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8:215-239.
- Chen JF, Callis TE, Wang DZ (2009) microRNAs and muscle disorders. *JCellSci*, 122:13–20.
- Cheung L, Gustavsson C, Norstedt G, Tollet-Egnell P (2009) Sex-different and growth hormone-regulated expression of microRNA in rat liver. *BMC Mol Biol* 10: 13.
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3):532-4;536-7.

- Christodoulou F et al (2010) Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature* 463:1084-1088.
- Ciaudo C, Servant N, Cognat V, Sarazin A, Kieffer E et al (2009) Highly dynamic and sex-specific expression of microRNAs during early ES cell differentiation. *PLoS Genet*, 5.
- Cnaani A et al (2008) Genetics of sex determination in Tilapiine species. *Sexual Dev*, 2:43-54.
- Cohen-Barak et al (2003) Sox6 regulation of cardiac myocyte development. *Nucleic Acids Research*, 31(20):5941-5948.
- Costa FF (2008) Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*, 410:9–17.
- Darnell DK et al (2006) MicroRNA expression during chick embryo development. *Developmental Dynamics*, 235:3156–3165.
- Doench JG, Sharp PA, Sharp S (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 18(5):504-511.
- Dorak MT (2006) Real-time PCR. Ed.: Dorak MT. ED.: Taylor & Francis e-Library.
- Driedzic WR, Hochachka PW (1976) Control of energy metabolism in fish white muscle. *Am. J. Physiol.*, 230:579-582.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A. 2009. Geneious v4.8.5, Available from <http://www.geneious.com>.
- FAO (2006) World aquaculture production of fish, crustaceans, mollusks, etc, by principal species in 2006.
- Ferreira IA, Martins C (2008) Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, 39:411-418.
- Flynt AS et al (2007) Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet*, 39(2):259-263.
- Fu X, Adamski M, Thompson EM (2008) Altered miRNA repertoire in the simplified chordate, *Oikopleura dioica*. *Mol Biol Evol*, 25(6):1067–1080.
- Fu Y, Shi Z, Wu M, Zhang J, Jia L, Chen X (2011) Identification and differential expression of MicroRNAs during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *PLoS ONE*, 6(7):e22957.
- Gagan J, Dey BK, Dutta A (2012) MicroRNAs regulate and provide robustness to the myogenic transcriptional network. *Cur Op in Phar*, 12:1–6.
- Garofalo M, Croce CM (2011) MicroRNAs: master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu. Rev. Pharm. Toxic.*, 51:25-43.
- Ge Y, Chen J (2011) MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*, 10(3):441-448.
- Greer-Walker M, Pull A (1975) A survey of red and white muscle in marine fish. *Journal of Fish Biology*, 7:295–300.

Griffiths-Jones S (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*, 342:129-38.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*,36:D154-8.

Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW (2007) Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev*, 16(5):857-68.

Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL (2008) The Vienna RNA Websuite. *Nuc Aci Res*, 36:W70-W74.

Guttman M et al (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235):223-7.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5):887-901.

Hammond SM (2006) MicroRNAs as oncogenes. *Curr Opin Genet Dev*, 16:4-9.

Heimberg AM, Sempere LF, Moy VN, Donoghue PC, Peterson KJ (2008) MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *PNAS*, 105:2946-2950.

Heimberg AM et al (2010) MicroRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *PNAS*, 107(45):19379-19383.

Horgan GW, Rouault J (2000) Introduction to randomization tests. *Biomathematics and Statistics Scotland*.

Hosoda T et al (2011) Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation*, 123:1287-1296.

Huang CW, Li YH, Hu SY, Chi JR, Lin GH, Lin CC, Gong HY, Chen RH, Chang SJ, Liu FG, Wu JL (2012) Differential expression patterns of growth-related microRNA in the skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Anim Sci*.

Huang J et al (2011) Solexa sequencing of novel and differentially expressed microRNAs in testicular and ovarian tissues in Holstein Cattle. *Int J of Bio Sci*, 7(7):1016-1026.

Hui J, Bindereif A (2005) Alternative pre-mRNA splicing in the human system: Unexpected role of repetitive sequences as regulatory elements. *Biol Chem*, 386:1265-1271.

Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M (2010) RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnology*, 9:102.

Imbeaud S et al (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nuc Ac Res*, 33(6):e56.

Jorgensen S, Baker A, Moller S, Nielsen BS (2010) Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. *Methods*, 52(4):375-81.

- Kapranov P et al. (2007) Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nature Review Genetics*, 8(6):413-423.
- Kiessling A et al (1991) Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*O. Mykiss*) in relation to ration and age. I. Growth dynamics. *Aquaculture*, Amsterdam, 93:335-356.
- Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5):376-385.
- Kim HK et al. (2006) Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol*, 174(5):677-87.
- Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2):126-39.
- Kocher TD (2004) Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature*, 5:288-298.
- Koumans JTM, Akster HA (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp Biochem Physiol*, 110(A):3-20.
- Krutzfeldt J, Poy MN, Stoffel M (2006) Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat Genet*, Suppl:S14-9.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, 12:735–739.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14(23):2162-2167.
- Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G (2007) Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res*, 101(12):1225-36.
- Lee CT, Risom T, Strauss WM (2007) Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *Dev Cell Biol*, 26:209-218.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843-54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415-419.
- Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, Kim VN (2006) Drosha in primary microRNA processing. *CSH Symp Quant Biol*.
- Lee YS, Dutta A (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4:199-227.
- Lefever S et al (2009) RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, 37(7):2065-2069.

- Lim LP et al (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027):769-773.
- Liu N et al (2008) MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.*, 22:3242Y54.
- Liu N, Olson EN (2010) MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell*, 18:510–525.
- Loh YHE, Yi SV, Strelman JT (2011) Evolution of microRNAs and the diversification of species. *Genome Biol Evol*, 3:55–65.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654):95-98.
- Lyson TR et al (2011) MicroRNAs support a turtle + lizard clade. *Biol Lett*, 203:52-56.
- Manly B (1998) Randomization, bootstrap and monte carlo methods in biology. London: Chapman & Hall.
- Maselli V, Di Bernardo D, Banfi S (2008) CoGemiR: A comparative genomics microRNA database. *BMC Genomics*, 9:457.
- Mattick JS (2009) Deconstructing the dogma: a new view of the evolution and genetic programming of complex organisms. *Ann N Y Acad Sci*, 1178:29-46.
- McCarthy JJ, Esser KA, Andrade FH (2007) MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(1):451-7.
- McCarthy JJ, Esser KA (2007) MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*, 102:306–313.
- McCarthy JJ (2008) MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta*, 1779(11):682–691.
- Meurer F, Hayashi C, Soares CM et al (2000) Utilização de levedura "spray dried" na alimentação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum – Animal Sciences* 22(4):479-484.
- Moyle PB, Cech JJ (2000) *Fishes: an introduction to ichthyology*. 4th ed., Prentice Hall.
- Muffato M, Louis A, Poisnel CA, Crollius AR (2009) Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. *Bioinformatics*, 26(8):1119-1121.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881):1344-9.
- Naguibneva I et al. (2006) The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*, 8(3):278-84.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the world*. 4^a. ed. J. Wiley and Sons, Hoboken. 601 pp.

- Obernosterer G, Martinez J, Alenius M (2007) Locked nucleic acid based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat. Protoc.* 2, 1508-1514.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai E. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130:89–100.
- Olena AF, Patton JG (2010) Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*, 222: 540–545.
- Pasquinelli AE et al. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408:86-89.
- Peterson KJ, Dietrich MR, McPeck MA (2009) MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays*, 31:736-747.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nuc. Ac. Res.*, 30(9):e36.
- Phelps RP, Popma TJ (2000) Sex Reversal of Tilapia. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J. E.(Ed.). *Tilapia aquaculture in the Americas*. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2:34-59.
- Plasterk RH (2006) MicroRNAs in animal development. *Cell*, 124(5):877-81.
- Poletto AB et al (2010) Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genet*, 11:5-10.
- Popma TJ, Lovshin L (1996) Worldwide prospects for commercial production of tilapia. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Research and Development, Auburn: Auburn University, Alabama. Series n.41, p.23.
- Proença CEM, Bittencourt PRL (1994) Recursos hídricos. In: Manual de piscicultura tropical. Brasília. IBAMA/DIREN/DEPAQ/DIPEA. p.52-76.
- Prochnik SE, Rokhsar DS, Aboobaker AA (2007) Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. *Dev Genes Evol*, 217:73-77.
- Qi L, Li X, Zhang S, An D (2006) Genetic regulation by non-coding RNAs. *Sci China C Life Sci*, 49:201-17.
- Quiat D, Voelker KA, Pei J, Grishinc NV, Grange RW, Bassel-Duby R, Olson EN (2011) Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor Sox6. *PNAS*, 108(25): 10196–10201.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339:62–66.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4):621-9.

- Reinhart BJ et al (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403:901-906.
- Rodriguez A et al (2004) Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *CSH*, 14:1902–1910.
- Rowlerson A, Veggetti A (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species In: Johnston IA, *Muscle Development and Growth*, Academic Press, London. p.103-139.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149):83-6.
- Sanger AM, Stoiber W (2001) Muscle fiber diversity and plasticity. In: JOHNSTON, I.A. (Ed.). *Muscle development and growth*. v.18. London: Academic Press. p.187-250.
- Sayed D et al (2007) MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 100(3):416-24.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7:3.
- Sempere LF, Cole CN, McPeck MA, Peterson KJ (2006) The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J Exp Zool B*, 306:575-588.
- Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 7(6): 633-636.
- Sluijter JP, Mil A, Vliet P, Metz CH et al (2010) MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30:859-868.
- Small EM et al (2010) Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *PNAS*, 107(9):4218–4223.
- Song et al. (2010) In situ hybridization detection of microRNAs. *Methods Mol Biol*, 629:287-94.
- Sperling EA Peterson KJ (2009) MicroRNAs and metazoan phylogeny: big trees from little genes. In: *Animal Evolution: Genomes, Fossils, and Trees*. Ed.: Maximilian J. Telford and D.T.J. Littlewood.
- Stadler M et al (2012) Contributions of mRNA abundance, ribosome loading, and post- or peri-translational effects to temporal repression of *C. elegans* heterochronic miRNA targets. *Genome res*.
- Sweetman D et al (2008) Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev Biol*, 321(2):491-9.
- Szcesniak MW et al (2011) miRNEST database: an integrative approach in microRNA search and annotation. *Nucleic Acids Research*, 40:D198–D204.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731-2739.
- Thatcher EJ, Flynt AS, Li N, Patton JR, Patton JG (2007) MiRNA expression analysis during normal zebrafish development and following inhibition of the hedgehog and notch signaling pathways. *Developmental Dynamics*, 236:2172–2180.
- Thatcher EJ, Bond J, Paydar I, Patton JG (2008) Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC Genomics*, 9:253.
- The International Cichlid Genome Consortium (2006) Genetic basis of vertebrate diversity: the cichlid fish model.
- Thum T, Catalucci D, Bauersachs J (2008) MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*, 79(4):562-70.
- Valente GT et al (2009) Comparative cytogenetics of cichlid fishes through genomic in-situ hybridization (GISH) with emphasis on *Oreochromis niloticus*. *Chrom Res*, 17:791–799.
- van Rooij E et al (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 316(5824):575-9.
- van Rooij E, Liu N, Olson EM (2008) MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet*, 24(4):159-66.
- van Rooij E et al (2009) A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*, 17(5):662–673.
- von Hofsten J, Elworthy S, Gilchrist MJ, Smith JC, Wardle FC, Ingham PW (2008) Prdm1- and Sox6-mediated transcriptional repression specifies muscle fibre type in the zebrafish embryo. *EMBO Rep*, 9(7):683-9.
- Wang D, Lu M, Miao J, Li T, Wang E, Cui Q (2009) Cepred: predicting the co-expression patterns of the human intronic microRNAs with their host genes. *PLoS One*, 4:e4421.
- Wang XG, Ono Y, Tan SC, Chai RJF, Parkin C, Ingham PW (2011) Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development*, 138:4399-4404.
- Weatherley AH, Gill HS (1987) *The biology of fish growth*. London: Academic Press Inc. 443p.
- Weatherley AH et al. (1988) Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J. Fish Biol.*, London, 33:851-859.
- Wheeler, BM et al. (2009) The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evol Dev*, 11:50-68.
- Wienholds E et al (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 309:310-311.

- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*; 75(5):855-62.
- Williams AH et al (2009) MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science*, 326:1549Y54.
- Yamamoto H, Tsukahara K, Kanaoka Y, Jinno S, Okayama H (1999) Isolation of a mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator. *Mol Cell Biol*, 19:3829–3841.
- Yan B, Guo JT, Zhao LH, Zhao JL (2012) MicroRNA expression signature in skeletal muscle of Nile tilapia. *Aquaculture*, 364(365):240–246.
- Yang JS et al (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*, 17:312-326.
- Yi R et al (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Gen Dev*, 17:3011-3016.
- Yuan X, Liu C, Yang P, He S, Liao Q, Kang S, Zhao Y (2009) Clustered microRNAs coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol*, 3:65.
- Zeng Y, Cullen BR (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem*, 280(30): 27595-27603.
- Zhang G, Swank DM, Rome LC (1996) Quantitative distribution of muscle fiber types in the scup *Stenotomus chrysops*. *Journal of Morphology*, 229:71-81.
- Zhou H, Lin K (2008) Excess of microRNAs in large and very 5' biased introns. *Biochem Biophys Res Commun*, 368:709–715
- Zhou X et al (2010) Profiling sex-specific piRNAs in zebrafish. *Genetics*, 186:1175-1185.
- Zimmerman AM, Lowery MS (1999) Hyperplastic development and hypertrophic growth of muscle fibers in the white seabass (*Atractoscion nobilis*). *J. Exp. Zool*, 284:299-308.

8. APÊNDICES:

Apêndice A. Resultados de quantificação, qualidade e integridade do RNA extraído das amostras de tecido muscular da tilápia do Nilo.

Amostra	Concentração (ng/ μ l)	A _{260/280} ¹	A _{230/280} ²	RIN
M2MB	593,2	2,001	1,849	9
M2MV	2514	1,976	1,875	7,8
M3MB	212,4	1,996	1,696	9
M3MV	1190	2,011	1,544	8,7
M6MB	2602	1,850	1,720	8,5
M6MV	1484	1,905	1,201	8,3
M7MB	383,6	1,949	1,291	8,2
M7MV	1091	1,943	0,984	8,4
M8MB	643,2	2,013	1,639	8,7
M8MV	2482	1,955	1,533	8,8
M9MB	421	1,955	1,697	8,4
M9MV	822	1,955	1,728	8,1
M10MB	486	1,940	1,610	8,3
M10MV	1780	1,990	1,740	8,5
M20MB	821,6	1,964	1,620	8,2
M20MV	1012	1,939	1,572	8,1
F2MB	294,8	2,101	1,972	8,8
F2MV	439,2	2,056	1,858	7,8
F3MB	439,2	2,056	1,858	9
F3MV	303,6	1,408	1,818	7,5
F5MB	732	1,847	1,756	7,6
F5MV	743	1,913	1,702	7,6
F7MB	530,4	2,040	1,922	8,8
F7MV	458	1,985	1,919	8
F8MB	351	2,014	1,852	9,1
F8MV	519	1,979	1,645	8
F9MB	969	2,018	1,540	8,5
F9MV	657,2	1,928	1,618	8,7
F10MB	1825	1,902	1,755	7,8
F10MV	318,8	2,024	1,847	7,9
F12MB	291,2	1,916	1,828	8,7
F12MV	2319	1,943	1,620	8,5

¹Relação de absorvância relativa à contaminação por proteínas. ²Relação de absorvância relativa à contaminação por compostos orgânicos (i.e., álcool, fenol, entre outros).