

F. Reproducción y Mejora Genética I,II

Papel de los microRNAs en el desarrollo muscular de la lubina (*Dicentrarchus labrax*): aproximación *in vitro* e *in vivo*

**Isabel García-Pérez¹, Carla Díaz-Serrano¹, Albert Sánchez-Moya¹,
Inmaculada Rodríguez¹, Marine Herlin², Mariló López³, Josefina Blasco¹,
Joaquim Gutiérrez¹, Daniel Garcia de la serrana¹**

¹ Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Barcelona;

² Cooke Aquaculture, Canadá; ³ Culmarex S.A.U., España

Resumen

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA que modulan la expresión génica al unirse a mRNAs y bloquear su traducción o promover su degradación. Este trabajo pretende estudiar el papel de determinados miRNAs (*miR-1-1*, *miR-133a-2*, *miR-133b*, *miR-499* y *miR-221*) en el desarrollo muscular de la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Para ello, se examinó su conservación entre especies y su distribución en diferentes tejidos, así como su transcripción *in vitro* e *in vivo*: a lo largo de un cultivo de miocitos de músculo blanco y en muestras de músculo blanco y rojo de lubinas con distinto pedigrí sometidas a una prueba de esfuerzo. La mayoría de miRNAs mostraron alta expresión en músculo esquelético y/o cardíaco, con la excepción de *miR-221* con una mayor expresión en cerebro. Durante el desarrollo del cultivo, *miR-221* se expresó más en la fase de proliferación, mientras que los otros miRNAs aumentaron durante la diferenciación de las células musculares. La prueba de esfuerzo incrementó la expresión de *miR-221* en ambos músculos y *miR-133a-2* en músculo blanco. Además, estos miRNAs mostraron un patrón transcripcional diferente en músculo rojo en función del pedigrí. Este estudio contribuirá a comprender mejor los mecanismos que regulan el desarrollo y crecimiento muscular en la lubina.

Introducción

Comprender la regulación del desarrollo y crecimiento muscular en peces es importante en la optimización de la producción acuícola. Al estudiar los mecanismos que orquestan el proceso de miogénesis, es necesario considerar no solo la transcripción de genes, sino también la de los RNAs no codificantes como los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA que regulan la expresión génica al unirse a mRNAs diana complementarias, bloqueando su traducción o promoviendo su degradación. Aunque el conocimiento sobre las funciones de los miRNAs en mamíferos ha avanzado mucho en las últimas décadas, el estudio de estas moléculas en peces es muy limitado, y aún más su papel en el desarrollo muscular. En este contexto, el presente estudio se centra en dos objetivos principales: (i) caracterizar por primera vez en lubina determinados miRNAs (*miR-1-1*, *miR-133a-2*, *miR-133b*, *miR-499* y *miR-221*) que tienen un papel conocido en el desarrollo muscular en otras especies (Horak *et al.*, 2016), y (ii) analizar la expresión de estos miRNAs en diferentes condiciones experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Material y métodos

Las secuencias de los precursores primarios de los miRNAs (pri-miRNAs) y de los miRNAs maduros se obtuvieron usando las bases de datos Ensembl y miRBase, y se utilizaron para predecir sus posibles mRNAs dianas con el software RNAhybrid v.2.2.1. El grado de conservación de estos miRNAs entre especies, se realizó mediante análisis filogenéticos y de sintenia. Además, se analizó la expresión mediante qPCR de los pri-miRNAs (para distinguir entre la expresión de diferentes parálogos que tienen secuencias maduras similares) en diferentes condiciones experimentales *in vitro* e *in vivo*:

- En diferentes tejidos para estudiar primero su distribución. Tejidos analizados: músculo blanco y rojo, corazón, hueso, cerebro, hígado, estómago, intestino, adiposo, riñón cefálico, bazo y branquias (n = 4).

- En un cultivo primario de miocitos derivados de músculo blanco. Se realizaron seis cultivos primarios independientes y se recogieron muestras de RNA a días 2, 4, 6, 8, 10 y 12 de cultivo.
- En muestras de músculo blanco y rojo de lubinas de dos familias (FA y FB) con distinto pedigrí sometidas a una prueba de esfuerzo. Se hicieron pruebas de esfuerzo individuales (túnel de natación Loligo® Systems) a 12 peces (40 ± 10 g) de cada familia (EX), siendo considerados como control los otros 12 peces no sometidos a la prueba (CT).

Resultados y discusión

El estudio de la sintenia y el análisis filogenético revelaron una alta conservación de estos miRNAs y sus bloques genómicos en diferentes especies, indicando una fuerte presión selectiva sobre estas moléculas. Se demostró que todos los miRNAs estudiados eran específicos del músculo esquelético y/o del cardiaco, con la excepción de *miR-221*, que mostró una baja expresión en los tejidos musculares y una alta transcripción en el cerebro. A pesar de esto, en los primeros días de cultivo, el *miR-221* mostró una alta expresión, sugiriendo un importante papel en la proliferación de los mioblastos, mientras que *miR-1-1*, *miR-133a-2*, *miR-133b* y *miR-499* aumentaron su expresión progresivamente a lo largo del cultivo, indicando un posible papel en las etapas de diferenciación de los miocitos y maduración de los miotubos. La prueba de esfuerzo disminuyó la transcripción de *miR-133a-2* y *miR-499* en músculo rojo y *miR-1-1* en ambos músculos; mientras que *miR-133a-2* aumentó en músculo blanco y *miR-221* en ambos músculos (Figura 1). En el músculo rojo, *miR-1-1*, *miR-133a-2*, *miR-499* y *miR-221* mostraron una expresión diferencial entre las dos familias, siendo menor en las lubinas de la familia B (FB) (Figura 1B). En conclusión, este estudio ayuda a comprender mejor los mecanismos que regulan el desarrollo y crecimiento muscular en la lubina y presenta determinados miRNAs como posibles marcadores moleculares con potencial para futuros programas de selección en esta especie.

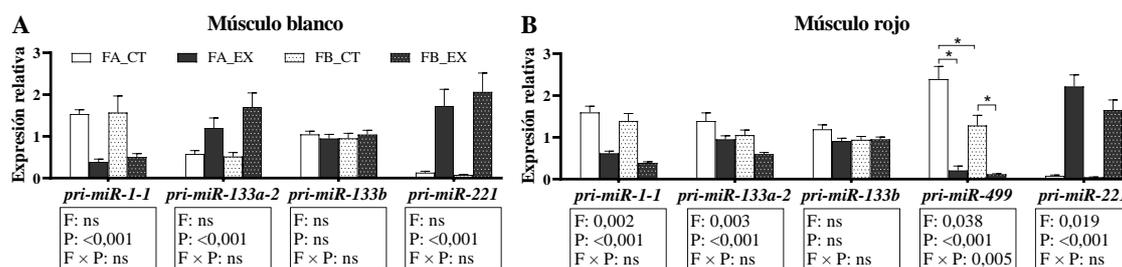


Figura 1. Efectos de una prueba de esfuerzo en la expresión de *pri-miR-1-1*, *pri-miR-133a-2*, *pri-miR-133b*, *pri-miR-499* y *pri-miR-221* en músculo blanco (A) y rojo (B) de lubinas de dos familias con distinto pedigrí. Datos representados como la media (n = 12) + error típico. Se realizó un ANOVA de dos vías con familia (F) y prueba de esfuerzo (P) como factores independientes y su interacción (F x P). Se muestran los valores de $p < 0,05$ y ns como no significativo. Las comparaciones por pares se analizaron con una *t-Student* con la corrección de Bonferroni ($* p < 0,05$).

Palabras Clave

miRNAs, músculo, miocitos, prueba de esfuerzo, pedigrí

Bibliografía

Horak, M., J. Novak y J. Bienertova-Vasku. 2016. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology*. 410(1): 1–13.

Agradecimientos

Trabajo financiado por el proyecto “APIDE” (RTI2018-100757-B-I00, MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y “FEDER Una manera de hacer Europa”). Las pruebas de esfuerzo fueron financiadas por el proyecto CDTI (IDI-20220244), cofinanciado por el fondo Europeo Marítimo y de la Pesca. I.G.-P disfruta de una beca predoctoral FPI (PRE2019-089578; MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y “FEDER Una manera de hacer Europa”).

Correo del Autor

isabelgarcia@ub.edu / isabel301297@gmail.com