

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo será disponibilizado somente a partir de 11/02/2018.

Tese de Doutorado

Caracterização molecular de híbridos heteróticos das
linhagens Red Stirling e Chitralada da tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)

Marcos Edgar Herkenhoff

Botucatu, SP, Brasil.

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

Caracterização molecular de híbridos heteróticos das
linhagens Red Stirling e Chitralada da tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*)

Candidato: Marcos Edgar Herkenhoff

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pinhal

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu, SP, Brasil.

2017

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Herkenhoff, Marcos Edgar.

Caracterização molecular de híbridos heteróticos das linhagens Red Stirling e Chitralada da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Marcos Edgar Herkenhoff. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Danillo Pinhal
Capes: 50402005

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Heterose. 3. Híbridação.
4. Genética - Pesquisa. 5. MicroRNAs. 6. Expressão gênica.

Palavras-chave: Heterose; Proteoma; RT-qPCR; Tilápia do Nilo; miRNA.



Departamento de
Genética



Sumário

1.	Introdução	11
1.1.	Tilápia do Nilo: caracterização das linhagens investigadas	11
1.2.	Regulação hormonal do crescimento em peixes	13
1.3.	Miostatina (MSTN)	14
1.4.	Regulação gênica: o papel central dos microRNAs	16
1.4.1.	MicroRNAs e o melhoramento animal	18
1.4.2.	Descoberta de miRNAs utilizando sequenciamento de alta performance (RNA-Seq)....	19
1.5.	Proteômica.....	20
2.	Justificativa	23
3.	Objetivos	24
3.1.	Objetivo geral:.....	24
4.	Material e métodos	25
4.1.	Animais e condições experimentais.....	25
4.2.	Extração de RNA	26
4.3.	Análise de expressão gênica por PCR em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR) 26	
4.4.	Construção de bibliotecas enriquecidas e sequenciamento de alta performance (RNA-Seq) de miRNAs	28
4.5.	Análise de miRNAs in silico	29
4.6.	Análise de proteínas	30
4.6.1.	Extração de proteínas de eletroforese	30
4.6.2.	Aquisição e análises das imagens de géis	30
4.6.3.	Digestão Enzimática.....	31
4.6.4.	Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas e processamento dos dados	31
5.	Resultados	34
5.1.	Expressão gênica	34
5.1.1.	Expressão do gh	34
5.1.2.	Expressão de sl	34
5.1.3.	Expressão do ghr1 e ghr2	34
5.1.4.	Expressão do igf1 e igf2.....	35
5.1.5.	Expressão da mstn	37
5.2.	Análise de miRNAs por RNA-Seq	38
5.3.	Proteínas identificadas por ESI-q-TOF e shotgun	39
5.4.	Interação miRNA e proteína.....	51
6.	Discussão	53

6.1.	A relação dos genes do eixo GH/IGF e da MSTN com a heterose	53
6.2.	A relação dos miRNAs, seus alvos e a expressão dos genes do eixo GH/IGF e MSTN	55
6.3.	A relação dos miRNAs e as proteínas	56
7.	Conclusões	58
8.	Referências bibliográficas	60
Anexo I: Artigo		68
Anexo II: Artigo		88
Anexo III: Artigo de revisão		117

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), principalmente ao Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu-SP pelo espaço e pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao LGEM (Laboratório Genômica e Evolução Molecular), laboratório onde realizei a maior parte do meu doutorado, e aos seus membros, em especial: Pedro Gabriel Nachtigall, Arthur Casulli de Oliveira e Juliana Mara Costa.

Aos colaboradores, em especial Oliver Brödel e Marcus Frohme da Technische Hochschule Wildau (THW) em Wildau Alemanha; Lucilene Delazari dos Santos do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP-UNESP); Luiz Gustavo Chuffa, Luiz Augusto Bovolenta e Rafael Nakajima do Instituto de Biociências (IBB-UNESP); Aline Lago, Marco Aurélio Dessimoni Dias e Alexandre Wagner Hilsdorf da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC).

À equipe da Equus Group® - Vanessa Rosália Remualdo, Fabiano Paganini e Marcelo Ludovice - e à equipe da EvoDevo® - Natália Bortholazzi Venturelli, Arthur Casulli de Oliveira e Karina Alves - pela oportunidade de aplicar meu conhecimento e pelas ótimas equipes de trabalho. Sucesso a nós!

À Margarida Barros e ao Rafael Nóbrega por participar e contribuir na minha banca de qualificação. Aos membros da minha banca de defesa: Vinicius Farias Campos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Carlos Alexandre Henrique Fernandes da UNESP, Celso Luis Marino da UNESP e Vanessa Rosália Remualdo da Equus Group®.

A todos os membros da minha família, em especial aos meus avós Osmário e Ruth Puff, à minha mãe Rosilene Puff, e aos meus irmãos Thiago e Ricardo Herkenhoff.

À minha namorada e minha companheira fiel e sempre muito prestativa e carinhosa Natália Bortholazzi Venturelli e aos seus pais Lunardi Venturelli e Marlene Botholazzi Venturelli.

À todos os meus amigos da UNESP, de Botucatu-SP, Blumenau-SC e Berlin Alemanha pelo apoio e momentos de diversão.

Ao meu ex-orientador de iniciação científica e mestrado, Carlos André da Veiga Lima Rosa, por todo conhecimento passado.

Ao meu orientador de doutorado, Danillo Pinhal, pela paciência, orientação e apoio.

Às agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 158284/2013-5) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2014/03062-0) pela bolsa de estudos concedida; sem o vosso apoio financeiro, o doutorado não seria possível.

Resumo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) possui importância econômica na piscicultura mundial. Com a finalidade de atender à demanda do mercado consumidor, foram desenvolvidas várias linhagens com maior viabilidade econômica, dentre elas a Chitralada, que possui rápido crescimento, e a Red Stirling, com filé de cor rosado, mais apreciado pelo consumidor. Com o objetivo de combinar estas características, foi desenvolvido um híbrido, que apresentou heterose. A pesquisa genética em peixes mostrou a interferência direta e indireta de vários genes no desempenho animal, principalmente os genes relacionados ao eixo GH/IGF e a miostatina (MSTN). Além disso, uma classe de RNAs não-codificadores, os microRNAs (miRNAs), possuem papel fundamental na regulação de vários pontos em vias biológicas conhecidas, principalmente na modulação de genes codificadores de proteínas relacionadas ao crescimento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica dos genes relacionados ao eixo GH/IGF e MSTN; determinar os miRNAs envolvidos e seus alvos; e avaliar o conjunto de proteínas relacionando-as aos respectivos fenótipos. Amostras biológicas foram coletadas das linhagens Chitralada e Red Stirling e do híbrido (7/8 Chitralada). Para a análise de expressão gênica por RT-qPCR, foram coletadas amostras de cérebro, fígado e músculo branco. Para a análise de miRNAs por RNA-seq, foram utilizados *pools* das amostras de músculo branco, assim como para a análise por ESI-q-TOF e *shotgun*. Os genes relacionados ao eixo GH/IGF foram super expressos e a MSTN sub expressa no híbrido em relação aos seus parentais. Os dados de expressão dos miRNAs let-7, miR-122, miR-194 e miR-219 corroboram com os dados de expressão dos genes alvos.. Na comparação entre os perfis de expressão de miRNAs e proteínas, verificou-se que proteínas oriundas de genes alvos de miRNAs sub expressos estavam altamente expressas sugerindo atividade regulatória. Conclui-se que existe uma ação dos miRNAs em proteínas associadas às vias metabólicas relacionadas à heterose na tilápia do Nilo.

Abstract

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) has great economic importance in world fish farming. To attend the commercial demand, several lines were developed, among them: Chitralada, with fast growth, and Red Stirling, with red color fillet of pink, which is more appreciated by the consumer. With the aim to combine the main characteristic of these lines, a crossbreed was developed, which also showed heterosis. Although crossbreeding between lines, or species, is a common breeding strategy for producing animals with heterosis, the molecular mechanisms that affect gene expression and biological pathways to create this phenotype still understood. Genetic research on fish showed the direct and indirect interference of several genes in animal performance, especially genes related to the GH/IGF axis and myostatin (MSTN). In addition, a class of non-coding RNAs, microRNAs (miRNAs), play a key role in regulating many biologically known pathways, mainly growth-related. Therefore, this study aimed to evaluate the GH/IGF axis genes expression and MSTN; determine the miRNAs involved and their targets; and the protein involved in the heterosis phenotype. Morphometric parameters, such as weight and length, were collected from the 4th to the 6th month of life. Biological samples were also collected from the Chitralada and Red Stirling, and their crossbreed (7/8 Chitralada). For the analysis of gene expression by RT-qPCR, brain, liver and white muscle samples were collected, ; for miRNA analysis, samples of white muscle were used, as well as ESI-q-TOF and shotgun GH/IGF axis genes were sup-regulated and the MSTN down-regulated in crossbreed in relation to their parents. Analysis of the miRNAs showed that let-7, miR-122, miR-194 and miR-219 in the crossbreed are associated with the qPCR data. Regarding the comparison of the miRNAs and with the proteins, several miRNAs showed to be sub expressed and consequently there was increase in the expression of the proteins that have targets of these miRNAs in their genes. We conclude that there is an action of miRNAs on proteins associated with the metabolic pathways and may be responsible for heterosis in Nile tilapia.

Lista de abreviações

CEVAP - Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos;

CHIT - Chitralada;

ESI – eletrospray;

GH - hormônio de crescimento (growth hormone);

GHR - receptores do GH;

GIFT - Genetic Improvement of Farmed Tilapia;

IBP – indústria brasileira de peixe;

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina (insuline-like growth fator);

mRNA - RNA mensageiro (messenger RNA);

miRNA - microRNA;

MREs - elementos de reconhecimento de miRNAs (miRNAs recognition elements);

MRF - fatores reguladores de miogênese (myogenic regulatory factors);

MS – espectrometria de massas (mass spectrometry);

MSTN - miostatina;

NCBI - National Center for Biotechnology Information;

ncRNAs - RNAs não-codificadores (non-coding RNA);

REDS - Red Stirling;

RIN – número de integridade do RNA (RNA integrity number);

RISC - complexo de indução de silenciamento de RNA (RNA-induced silencing complex);

RNAi - RNA de interferência;

SL – somatolactina;

SNP - polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism);

THW - Technische Hochschule Wildau;

TOF - tempo de flutuação (time of flight);

1. Introdução

1.1. Tilápia do Nilo: caracterização das linhagens investigadas

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e suas variedades pertencentes ao grupo dos ciclídeos africanos são considerados excelentes modelos experimentais para estudos em diversas áreas da genética (Wang et al., 2007; Cnaani et al., 2008; Poletto et al., 2010). A facilidade adaptativa da *O. niloticus* permite sua manipulação por diversas técnicas, como a inversão sexual através da administração de esteróides sexuais e a produção de linhagens transgênicas (Maclean et al., 2002). Outras características como fertilização externa e alta fecundidade tornam essa espécie particularmente adequada como organismo modelo para análises experimentais comparativas com diversos tipos de animais.

A tilápia do Nilo possui grande importância econômica para a aquicultura (Meurer et al., 2000; Boscolo et al., 2001), sua produção alcançou 4,85 milhões de toneladas no mundo em 2014 (FAO, 2015). É a espécie de peixe mais cultivada no Brasil, com a produção de 198,49 mil toneladas em 2014, correspondendo à 41,9% do total de pescados. Além disso, a espécie registrou um aumento de 17,3% em relação à produção obtida em 2013 (IBGE, 2014).

Esta espécie foi introduzida ao Brasil na década de 70 (Lovshin et al., 1976) e está muito bem adaptada às condições climáticas brasileiras, apresentando diversas características zootécnicas que a tornam adequada ao cultivo, tais como resistência ao manejo e a doenças, tolerância a baixos teores de oxigênio, hábito alimentar diversificado, rápido crescimento e alto rendimento de filé (Hilsdorf, 1995; Popma e Lovshin, 1995; Freitas et al., 2009).

Com o objetivo de aumentar a produtividade, variedades de tilápia foram desenvolvidas, e dentre elas, destacam-se as variedades GIFT (*Genetic Improvement of Farmed Tilapia*) (Eknath e Acosta, 1997), a Chitralada (ou Tailandesa) (Zimmermann, 2000) e as variedades vermelhas. Uma das variedades vermelhas atualmente utilizada com êxito é a Red Stirling

(REDS). Essa variedade foi originalmente obtida de uma população de *O. niloticus* selvagem do Lago Manzala, no Egito, em 1979, e desde então, tem sido mantida pelo Instituto de Aquicultura da Universidade de Stirling, Escócia (McAndrew e Majumdar, 1983). Embora as variedades vermelhas sejam mais apreciadas pelos consumidores, a REDS possui índices de produção inferiores às linhagens de tilápia não vermelhas (Moreira et al., 2005). Isso levou aquicultores e melhoristas a realizarem o cruzamento desta linhagem com uma outra de maior produtividade: a linhagem Chitralada (CHIT).

Juvenis da linhagem CHIT foram introduzidos no Brasil em 1996 em Londrina no Paraná. Essa linhagem foi domesticada desde a década de 40 inicialmente no Japão e depois na Tailândia (Zimmermann, 1999). Sua introdução concomitante à técnica de incubação artificial melhorou o desempenho e resolveu os problemas de baixa eficiência da técnica de reversão sexual tradicional.

Nos últimos anos o cruzamento das linhagens CHIT e REDS levou à produção de animais com heterose (Moreira et al., 2007). A heterose, ou também vigor híbrido, é um termo utilizado para caracterizar a superioridade média da prole em relação à média dos progenitores (Pereira, 2012). No caso das linhagens utilizadas nesse programa, a variedade REDS apresenta menor crescimento e menor ganho de peso em relação à CHIT, no entanto, possui a coloração vermelha apreciada pelo mercado consumidor. Em função dessas particularidades, estudos de variabilidade genética e de crescimento têm sido realizados comparando-se as variedades REDS, CHIT e híbridos vermelhos (Moreira et al., 2005). A análise do germoplasma parental dessas variedades gerou animais com baixos índices de endogamia e variabilidade genética suficiente para o desenvolvimento de processos de melhoramento por cruzamentos e seleção (Moreira et al., 2007).

Cruzamentos entre estas duas variedades de tilápia foram realizados objetivando maiores ganhos com a heterose, maior velocidade de ganho de peso, aumento da eficiência

produtiva, entre outros atributos desejáveis. Híbridos dessas linhagens (e.g., genótipo 7/8 Chitralada: 1/8 Red Stirling) têm sido produzidos por melhoramento clássico e analisados quanto a parâmetros zootécnicos diversos (Lago, 2014). No entanto, os mecanismos genéticos envolvidos no vigor desses híbridos ainda são pouco conhecidos.

Dentre os fatores que influenciam diretamente o crescimento dos peixes (um dos atributos da heterose), destaca-se o papel dos hormônios, principalmente os componentes do eixo GH (*growth hormone*)/IGF (*insuline-like growth factor*). O eixo GH/IGF corresponde à via pela qual a maioria dos fatores que atuam no processo de crescimento exercem sua ação.

1.2. Regulação hormonal do crescimento em peixes

Investigações genéticas em peixes demonstraram a interferência direta e indireta de vários genes nos índices produtivos. Particularmente se destacam genes relacionados ao eixo GH/IGF, assim como os receptores do GH (GHR) (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997; Bellinge et al., 2005), e os IGF1 e IGF2 (Martinelli et al., 2008

Estes genes atuam no crescimento animal, modulando as maiores vias endócrinas anabólicas do corpo através do aumento da síntese proteica e diminuição da proteólise (Reinecke et al., 1997; Butler e LeRoith, 2001; Rodgers et al., 2001; Jiao et al., 2006; Chen et al., 2007; Ma et al., 2007; Wang et al., 2008; Biga e Meyer, 2009), tornando-se alvos no estudo do crescimento e no melhoramento genético de animais de produção.

Nos peixes, os peptídeos IGF-1 e IGF-2 são produzidos principalmente no fígado, que é a principal fonte endócrina de IGFs, sob a influência do GH. Após serem liberadas na corrente sanguínea, estas moléculas atuam em diversos tipos de tecido. O IGF-1 desempenha um papel central em um sistema complexo que regula o crescimento, diferenciação e reprodução. Ele, seletivamente, promove mitogênese e diferenciação celular e também inibe a apoptose (Jones e Clemmons, 1995; Reinecke e Collet, 1998).

Embora os papéis fisiológicos do IGF-1 estejam claros, os do IGF-2 estão em discussão (Berishvili et al., 2010). A expressão desta molécula foi identificada no fígado, cérebro, brânquias, coração, trato gastrointestinal, pâncreas, rim, músculo esquelético, baço e nas gônadas masculina e feminina (Ayson et al., 2002; Caelers et al., 2004; Vong et al., 2003), porém algumas de suas funções necessitam ser testadas.

1.3. Miostatina (MSTN)

Em geral, o músculo esquelético é a principal parte comestível dos animais. Nos peixes, o processo que envolve a formação muscular inclui o crescimento por hiperplasia e hipertrofia em estágios pós-juvenis (Mommsen, 2001). A taxa de crescimento hipertrófico varia de acordo com a taxa de crescimento somático (hiperplásico) em diferentes fases de desenvolvimento (Braun e Gautel, 2011).

Em cada etapa da miogênese, processo responsável pelo crescimento hiperplásico do tecido muscular, proteínas diferentes realizam papéis cruciais para os processos de proliferação e diferenciação celular. Dentre estes, destaca-se um grupo de genes conhecidos como fatores de regulação miogênica (*myogenic regulatory factors* - MRFs) e que são indispensáveis e responsáveis pelo processo de transformação de células não-musculares em células musculares (Bentzinger et al., 2012; Rudnicki e Jaenisch, 1995; Weintraub et al., 1991). A principal função dos MRFs (MyoD, Miogenina, Myf5 e o MRF4) é realizar a ativação e inibição dos demais genes da via de diferenciação muscular, agindo de forma orquestrada (Bentzinger et al., 2012).

O processo de miogênese possui como etapa inicial o recrutamento de células do mesoderma, através da ação do gene Pax3 (**Figura 1**). A proteína PAX 3 é um fator de transcrição que inicia a preparação das células do mesoderma para que sejam transformadas

em células musculares, e promovem a expressão de dois outros MRFs (MyoD e Myf5) (Bentzinger et al., 2012).

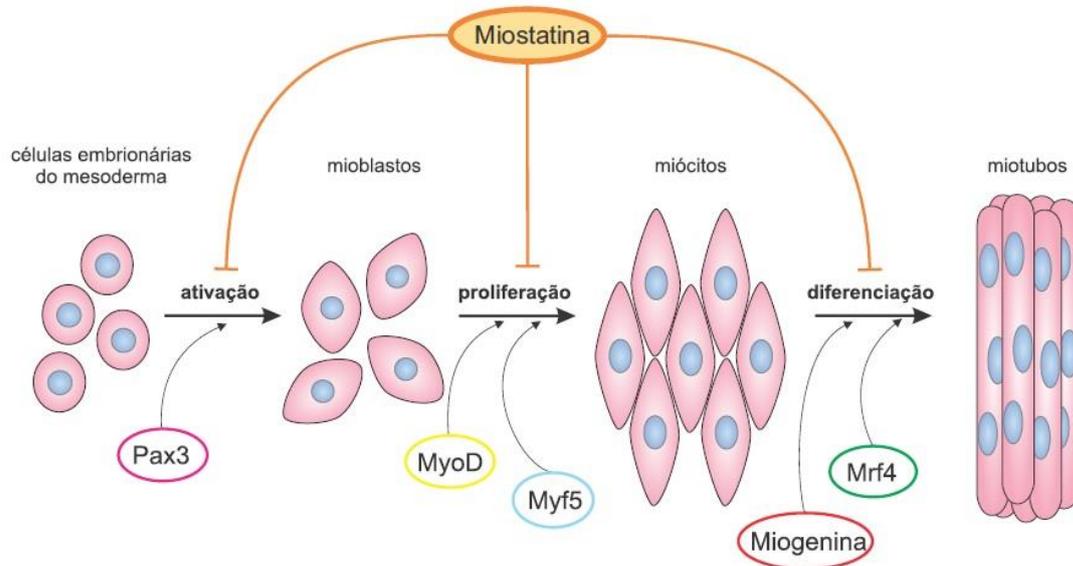


Figura 1. Na miogênese as células-tronco embrionárias do mesoderma são ativadas e recrutadas pela ação de Pax3, diferenciando-se nos mioblastos. Estes, por sua vez, proliferam e se diferenciam pela ação dos fatores MyoD e Myf5, transformando-se em miócitos. Durante a diferenciação por ação da miogenina e de MRF4, ocorre a organização dos miócitos em miotubos, formando o tecido muscular. A miostatina inibe a proliferação de células-tronco embrionárias do mesoderma impedindo a ligação de Pax3, que é a proteína recrutadora das células precursoras bloqueando a miogênese.

Quando um animal atinge a vida adulta, a miogênese tem sua atividade reduzida por uma série de fatores, dentre eles, a miostatina (MSTN) (Bentzinger et al., 2010; Kuang et al., 2008). A MSTN é membro da família TGF- β , que desempenha papel chave na regulação do crescimento do músculo esquelético (Lee, 2004). Esta proteína desempenha função inibitória sobre a proliferação celular, ou seja, inibe o crescimento hiperplásico se ligando ao receptor IIB da activina (Lee et al., 2016). O processo de bloqueio da miogênese promovido pela MSTN ocorre pela regulação negativa na expressão do fator de transcrição Pax3, o que acarreta na diminuição da expressão do gene MyoD (**Figura 1**) (Bentzinger et al., 2010; Kuang et al., 2008).

Ratos portadores de mutação no gene da MSTN apresentaram musculatura duas vezes maior do que aquela observada nos animais portadores do alelo selvagem, sugerindo que o aumento de massa seria o resultado da combinação de hiperplasia e hipertrofia muscular (McPherron et al., 1997). Estas mutações, que ocorrem de forma natural, foram identificadas também nas raças bovinas de dupla musculatura (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997; McPherron e Lee, 1997), em cães (Mosher et al., 2007) e até mesmo em seres humanos (Schuelke et al., 2004).

Acosta et al. (2005) realizaram estudo em zebrafish, onde a expressão da MSTN foi inibida por RNA de interferência (RNAi), resultando em fenótipo cujo tamanho corpóreo fora bastante superior em relação ao controle. No pirarucu, Carani et al. (2013) mostraram que a expressão deste gene é maior no músculo branco quando comparado ao músculo vermelho. Na truta, houve o desenvolvimento de uma musculatura dupla em um estudo utilizando animais transgênicos para o gene da folistatina, devido à sua ação na inibição da MSTN (Medeiros et al., 2009).

No estudo de Huang et al. (2012) houve um diferencial de expressão de MSTN entre duas linhagens de tilápia, com até 50% de redução na linhagem com maior crescimento. Portanto, este gene é um alvo importante para o melhoramento animal dos peixes em geral (Forabosco et al., 2013).

1.4. Regulação gênica: o papel central dos microRNAs

Na última década, diversos estudos mostram que virtualmente todos os genes têm sua expressão regulada pré ou pós-transcricionalmente por RNAs não-codificadores (ncRNAs; Mattick e Makunin, 2006). Para o completo entendimento das funções desempenhadas por diferentes produtos gênicos (e.g. IGFs e MSTN), torna-se necessária a análise de seus respectivos reguladores. Dentre os ncRNAs reguladores conhecidos, uma classe de pequenos

RNAs, os microRNAs (miRNAs), tem se destacado como moléculas chave em diversos processos biológicos.

Os miRNAs são transcritos formados por ~17-22 nucleotídeos encontrados no genoma de animais, plantas e vírus (Xia et al., 2011). Estas moléculas regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica por pareamento com sequências complementares em seus RNAs mensageiros (mRNA) alvo (Bartel, 2004), atuando desde a formação de heterocromatina até a regulação traducional (Chu e Rana, 2007; Filipowicz et al., 2008); sendo fundamentais em vários processos biológicos que permitem o controle do desenvolvimento, diferenciação, proliferação e morte celular (Ambros, 2004; Flynt et al., 2007, 2009; Shkumatava et al., 2009; Liu e Olson, 2010; Takacs e Giraldez, 2011).

A via canônica de ação dos miRNAs ocorre por meio da interação do miRNA ao RISC (RNA-induced silencing complex), e destes com sítios ligantes ou MREs (*miRNAs Recognition Elements*) na região 3' UTR do RNA mensageiro (mRNA) alvo inibindo a sua expressão (Lee e Dutta, 2009). Entretanto estudos recentes verificaram ainda a ação de miRNAs a partir de interações com outras porções dos mRNAs, incluindo éxons e região 5'UTR dos mRNAs (Rigoutsos, 2009).

A interação melhor descrita entre o mRNA alvo e o complexo miRNA-RISC ocorre devido à complementaridade - total em plantas e parcial em animais - de uma sequência de 7 nucleotídeos da região 5' do miRNA (nucleotídeos 2 a 8), chamada de sequência *seed*, com o mRNA (Lee e Dutta, 2009). Entretanto importância cada vez maior tem sido atribuída ao pareamento complementar da porção 3' do miRNA nesse processo (Broughton et al., 2016)., Estima-se que cada miRNA possa se ligar a até centenas de RNAs mensageiros e um único RNA mensageiro possa ter sua estabilidade ou tradução regulada por diversos miRNAs (Doench e Sharp, 2004; Brenneck et al., 2005; Lim et al., 2005).

De modo geral, os miRNAs são abundantes e altamente conservados entre os vertebrados estudados, o que sugere sua participação em processos celulares e ontogenéticos vitais comuns a esses organismos (Heimberg et al., 2010). Por outro lado, diversos miRNAs não conservados (i.e., "linhagem-específicos") foram também detectados em peixes, aves, répteis e mamíferos. Acredita-se que esses miRNAs evolutivamente divergentes poderiam desempenhar um papel no estabelecimento e manutenção da diversidade fenotípica entre diferentes organismos (Plasterk, 2006; Sempere et al., 2006; Xia et al., 2011).

Essas características inerentes aos miRNAs os tornam elementos chave para a determinação de vias específicas envolvidas em diversos processos biológicos (Esau et al., 2006).

1.4.1. MicroRNAs e o melhoramento animal

Por exercerem participação fundamental na regulação gênica, os miRNAs tornaram-se também alvos de investigações direcionadas ao melhoramento animal de animais de produção. Desta forma, estudos foram realizados em bovinos (Coutinho et al., 2007; Gu et al., 2007; Strozzi et al., 2009), suínos (Sharbati-Tehrani et al., 2008; Wernersson et al., 2005), em espécie de aves (Darnell et al., 2006, 2007; Glazov et al., 2008; Hicks et al., 2008, 2009) e inclusive na Tilápia do Nilo (Huang et al., 2012; Yan et al., 2012; Yan et al., 2013a, 2013b).

O estudo de Huang e et al. (2012) associou miRNAs e polimorfismos (SNPs) em alguns genes alvo, porém, seu não utilizou híbridos heteróticos como modelo experimental. A combinação de diferentes sequências dos miRNAs dos parentais podem ter ocasionado a heterose, pelo fato do fenótipo ser o resultado de mecanismos regulatórios na expressão gênica (Sun et al., 2004)

Considerando-se o grande número de miRNAs comumente detectados em vertebrados - grande parte tecido-específicos e de expressão restrita às etapas de desenvolvimento - um

amplo conjunto de miRNAs ainda estão por ser identificados na tilápia do Nilo. O uso da tilápia do Nilo como modelo biológico também contribui para estudos de evolução e comparação de genomas entre espécies, visto que genes reguladores do desenvolvimento, incluindo miRNAs, são altamente conservados entre peixes e humanos (Loh et al., 2011).

1.4.2. Descoberta de miRNAs utilizando sequenciamento de alta performance (RNA-Seq)

Evidências sugerem que o repertório completo de miRNAs de qualquer espécie - animal ou vegetal - compreende um conjunto de miRNAs conservados de origem evolutiva antiga, assim como muitos miRNAs espécie-específicos de origem recente (Plasterk, 2006; Rajagopalan et al., 2006; Zhao e Srivastava, 2007; Yan et al., 2012).

Existem duas abordagens utilizadas para a descoberta de miRNAs: análises de bioinformática e métodos experimentais, ambas com as suas limitações (Berezikov, 2011).

Tecnologias de sequenciamento de alta performance surgiram como uma poderosa abordagem para identificar e quantificar miRNAs. Por permitirem análises em larga escala, facilitaram a descoberta de miRNAs novos, espécie-específicos e de reduzida expressão em diversos organismos, pertencentes aos mais diversos táxons (Berezikov, 2011). Nesta abordagem, as ferramentas de bioinformática são utilizadas somente após a geração de dados experimentais.

Mesmo com a elevada capacidade de geração de sequências inerentes a essa tecnologia, estudos mostram que esse tipo de dado está longe da saturação, vide o grande número de novos miRNAs descobertos e representados apenas uma única vez no miRBase. Além disso, muitas das bibliotecas, de pequenos RNAs não codificadores analisados, foram geradas a partir de um número limitado de tecidos, e por isso uma ampla gama de miRNAs permanece desconhecida (Kloosterman et al., 2006; Reddy et al., 2009).

Portanto, estas tecnologias de sequenciamento em larga escala trazem inúmeras possibilidades para descoberta e análise de miRNAs e contribuem para estudos mais detalhados sobre a funcionalidade do genoma, particularmente quanto às interações genes-reguladores.

1.5. Proteômica

Uma proteína é o produto final da síntese de um mRNA e a sua tradução em uma sequência de aminoácidos. Essas moléculas contribuem decisivamente para determinar alterações fenotípicas, principalmente em decorrência de variações qualitativas e quantitativas nos vários tipos de tecidos orgânicos. Assim, sua produção está condicionada à expressão dos genes codificadores e respectivos ncRNAs regulatórios, como os miRNAs, atuantes nos diferentes tecidos.

O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto de proteínas responsáveis, direta ou indiretamente, pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos (Barbosa et al., 2012). Portanto, analisar o proteoma é conhecer o conjunto de proteínas resultantes da codificação do genoma e da interação com outras moléculas (Wilkins et al., 1996), inclusive outras proteínas e miRNAs. Portanto, um proteoma não é apenas o resultado dos produtos traduzidos a partir das sequências dos genomas, mas também o resultado de processos pós-transcricionais e pós-traducionais, assim como complexos formados por essas biomoléculas (Ahrens et al., 2010).

Além da complexidade, um proteoma é dinâmico e seu perfil se altera de acordo com o estado fisiológico, devido a condições ambientais e as fases da diferenciação celular. Estimativas sugerem que mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas estão presentes nas células em momentos distintos (Jensen, 2004). A proteômica estuda de forma descritiva e quantitativa o conjunto de proteínas de uma de uma célula, ou tecido, suas variações na

população, mudanças em resposta a um ambiente ou decorrentes do desenvolvimento normal ou alterado (Valledor e Jorin, 2011). As abordagens proteômicas têm permitido estudos em larga escala da expressão proteica nos mais variados tecidos e condições experimentais (Barbosa et al., 2012). Atualmente há várias técnicas disponíveis para a análise de proteínas, no entanto, destaca-se a utilização da espectrometria de massa (*mass spectrometry*, MS), que tem sido aplicada de forma abrangente na investigação de sistemas biológicos. (Domon e Aebersold, 2006; Sparkman, 2000).

A MS é a técnica instrumental mais apropriada para a investigação da estrutura e reatividade de íons. O alto vácuo produzido pelo espectrômetro é ideal para se estudar as propriedades iônicas das moléculas em fase gasosa, possibilitando estabelecer uma correlação com a fase condensada. Muitos íons difíceis de serem isolados podem ser facilmente gerados na fase gasosa por MS (Cabrini, 2007).

Muitas das técnicas empregadas em proteômica têm como foco a identificação de biomarcadores, mas são limitadas. Outras têm potencial para automatização e até utilização na rotina clínica. De maneira geral, as metodologias empregadas podem ser classificadas nos tipos *bottom-up* ou *top-down* (Barbosa et al., 2012).

As metodologias por *bottom-up*, mais conhecidas como *shotgun* (Ahrens et al., 2010), inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas, seguida de análise por MS. Já as metodologias por *top-down*, ao contrário, são processos em que as proteínas intactas são submetidas à MS (Barbosa et al., 2012).

O *shotgun* possui muitas vantagens, como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos. Embora as respostas obtidas são fragmentos de um todo, é possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos (Barbosa et al., 2012).

Associado a isso, o surgimento de técnicas de ionização, principalmente a ionização por Electrospray (ESI) expandiu a gama de moléculas que podem ser analisadas por espectrometria de massas (Diniz, 2011). Para auxiliar o método de ionização, analisadores são utilizados após os íons passarem pela câmara à vácuo. Os tipos mais comuns de analisadores são o TOF (Time Of Flight), o quadrupolo e o *ion trap* (May et al., 2011). Nos analisadores TOF, os íons são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. Este método é utilizado para derivar o valor m/z , o tempo decorrido entre a ionização e a detecção dos íons (Barbosa et al., 2012).

O potencial de aplicação das técnicas de proteoma para a produção animal é muito grande. Estudos têm sido realizados utilizando outros modelos biológicos de interesse econômico, como bovinos, como objetivo, por exemplo, analisar as alterações de proteomas em M. Músculos semitendinosos durante o armazenamento pós-mortem (Yu et al., 2017). Um dos estudos mais notáveis, mostrou que alimentação com restrição alimentar em bovinos não só leva à índices de produção diferenciadas como também na alteração da composição proteína da carne (Almeida et al., 2017). Em peixes, técnicas de proteoma foram utilizadas com objetivo avaliar resistência à infecção bacteriana na tilápia do Nilo (Chang et al., 2017; Li et al., 2017), na criopreservação de sêmen de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nynca et al., 2015), na qualidade e textura muscular da carne de salmão (*Salmo salar*) (Ørnholt-Johansson et al., 2017) e toxicologia hepática também em salmão (*S. salar*) (Hampel et al., 2015). No entanto, este é o primeiro estudo buscando informações sobre as diferenças no conjunto de proteínas no híbrido em questão, e também o primeiro estudo com o foco na heterose.

7. Conclusões

Os dados de expressão gênica demonstraram que os genes do eixo GH/IGF e a MSTN podem contribuir para o crescimento superior do híbrido heterótico devido ao aumento na síntese de proteínas e metabolismo. De uma maneira geral, a maioria dos genes relacionados ao eixo GH/IGF mostraram uma expressão maior no híbrido e a MSTN uma expressão menor em relação aos seus parentais. Esses genes atuam na heterose, embora não se sabe se são oriundos ou responsáveis por ela.

A análise dos miRNAs mostrou que o let-7 está mais expresso no híbrido em relação aos seus parentais, podendo desempenhar alguma função na heterose. Os dados das predições de alvos de miRNAs corroboram com alguns dos dados de expressão. As expressões aumentadas do miR-122, miR-194 e miR-219 no híbrido estão diretamente relacionadas a baixa expressão de *mstn* no mesmo. Desta forma, assim como a *mstn*, *sl*, *gh* e *ghrl*, a expressão destes miRNAs também está relacionado ao ganho de peso e tamanho do híbrido em relação aos seus parentais.

Em relação a comparação dos miRNAs e com as proteínas, vários miRNAs se mostraram sub expressos e conseqüentemente houve aumento na expressão das proteínas que possuem alvos destes miRNAs em seus genes. No caso, o miR-216, miR-153, miR-204 e miR205 comparando o híbrido com a CHIT; e o let-7e, miR-16 e miR-216 comparando o híbrido com a REDS. Esses dados mostram que existe uma ação dos miRNAs em proteínas associadas às vias metabólicas, relacionadas à heterose nas tilápias do Nilo.

8. Referências bibliográficas

- Acosta J, Carpio Y, Borroto I, González O, Estrada MP (2005) Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol*, 10;119(4):324-31.
- Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R (2010) Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 11(11):789-801.
- Almeida AM, Nanni P, Ferreira AM, Fortes C, Grossmann J, Bessa RJ, Costa P (2017) The longissimus thoracis muscle proteome in Alentejana bulls as affected by growth path. *J Proteomics*, 152:206-215.
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431:350-355.
- Ayson FG, de Jesus EGT, Moriyama S, Hyodo S, Funkenstein B, Gertler A, Kawauchi H (2002) Differential expression of insulin-like growth factor I and II mRNAs during embryogenesis and early larval development in rabbit *Wsh*, *Siganus guttatus*. *Gen.Comp. Endocrinol*, 126:165-74.
- Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, de Marqui ABT, Tajara EH (2012) Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 58(3).
- Barozai MYK (2012) Identification and characterization of the microRNAs and their targets in *Salmo salar*. *Gene*, 499:163-8.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116:281-297.
- Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW (2010) mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4):237-243.
- Bellinge RHS, Liberles DA, Iaschi SP, O'Brien PA, Tay GK (2005) Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal Genetics*, 36(1):1-6.
- Bentzinger CF, von Maltzahn J, Rudnicki MA (2010). Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem Cell Res Ther* 1: 27.
- Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1;4(2).
- Berezikov E (2011) Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet*, 12(12):846-60.
- Berg RT, Butterfield RM (1976) New concepts of cattle growth. Sydney: Sydney University, 240 p.
- Berishvili G, Baroiller JF, Eppler E, Reinecke M (2010) Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17 α -ethinylestradiol (EE2). *General and Comparative Endocrinology* 167:128-134.
- Biga PR, Meyer J (2009). Growth hormone differentially regulates growth and growth-related gene expression in closely related fish species. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 154:465-473.
- 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.
- Braun T, Gautel M (2011) Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:349-361.

- Brenneck J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3):e85.
- Butler AA, D LeRoith (2001) Tissue-specific versus gen-eralized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142:1685–1688.
- Cabrini GL (2007) Aplicação de Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear na detecção e caracterização de intermediários chave de reações orgânicas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- Caelers A, Berishvili G, Meli ML, Eppler E, Reinecke M (2004) Establishment of a real-time RT-PCR for the determination of absolute amounts of IGF-I and IGF-II gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, 137:196–204.
- Campo LFC (2001) Tilapia roja 2001: Una evolución de 20 anos, de la incertidumbre al éxito doce años despues. Cali, Valle. Christodoulou F et al. (2010) Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity. *Nature*, 463:1084–1088.
- Carani FR, Duran BOS, De Paula TG, Piedade WP, Silva MDP(2013). Morphology and expression of genes related to skeletal muscle growth in juveniles of pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimatidae, Teleostei). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 35(3):219-226.
- Chang CI, Chen LH, Hu YF, Wu CC, Tsai JM (2017) Determining the cleavage site for the mature antimicrobial peptide of Nile tilapia β -defensin using 2D electrophoresis, western blot, and mass spectrometry analysis. *Fish Shellfish Immunol*, 62:41-46.
- Chen C, Deng B, Qiao M, Zheng R, Chai J, Ding Y, Peng J, Jiang S (2012). Solexa sequencing identification of conserved and novel microRNAs in backfat of Large White and Chinese Meishan pigs. *PLoS One*, 7:e31426.
- Chen MH, Li YH, Chang Y, Hu SY, Gong HY, Lin GH, Chen TT, Wu JL. (2007) Co-induction of hepatic IGF-1 and progranulin mRNA by growth hormone in tilapia, *Oreochomis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*. 150:212–218.
- Chu CY, Rana TM (2007) Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of Cell Physiology*, 213(2):412-9.
- Cnaani A, Lee BY, Zilberman N, Ozouf-Costaz C, Hulata G, Ron M, D'Hont A, Baroiller JF, D'Cotta H, Penman DJ, Tomasino E, Coutanceau JP, Pepey E, Shirak A, Kocher TD (2008) Genetics of sex determination in Tilapiine species. *Sexual Development*, 2:43-54.
- Coutinho LL, Matukumalli LK, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Gasbarre LC, Capuco AV, Smith TP. (2007) Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. *Physiological Genomics*. 29:35–43.
- Darnell DK, Kaur S, Stanislaw S, Konieczka JH, Yatskievych TA, Antin PB (2006) MicroRNA expression during chick embryo development. *Developmental Dynamics* 235:3156–65.
- Darnell DK, Kaur S, Stanislaw S, Davey S, Konieczka JH, Yatskievych TA, Antin PB (2007) GEISHA: an in situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo. *Cytogenetic and Genome Research*. 117:30–5.
- De Santis C, Evans BS, Smith-Keune C, Jerry DR (2008) Molecular characterization, tissue expression and sequence variability of the barramundi (*Lates calcarifer*) myostatin gene. *BMC Genomics*, 9:82.
- Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes and Development*, 18(5):504-511.

- Domon B e Aebersold R (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312:212-7.
- Eknath AE, Acosta BO (1998) Genetic Improvement of Farmed Tilapias (GIFT) Project: final report, March 1988 to December 1997. International Center for Living Aquatic Resources Management. Makati City, Philippines.
- Elmén J, Lindow M, Silahatoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, Hedtjárn M, Hansen JB, Hansen HF, Straarup EM, McCullagh K, Kearney P, Kauppinen S (2008) Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNAantimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Research*, 36:1153–1162.
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metabolism*, 3(2):87-98.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/336900/>>. Acesso em: janeiro 2017.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, 9(2):102-114.
- Fleige S, Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3):126-39.
- Flynt AS, Li N, Thatcher EJ, Solnica-Krezel L, Patton JG. (2007) Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nature Genetics*, 39(2):259-263.
- Flynt AS, Thatcher EJ, Burkewitz K, Li N, Liu Y, Patton JG (2009) miR-8: regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos. *Journal of Cell Biology*, 185:115-127.
- Forabosco F, Löhmusb M, Rydhmera L, Sundströmc LF (2013) Genetically modified farm animals and fish in agriculture: A review. *Livestock Science*, 153:1–9
- Freitas RTF et al (2009) Espécies exóticas e Nativas de importância para a piscicultura brasileira. Lavras: Editora UFLA
- Gahr, SA, Vallejo RL, Weber GM, Shepherd BS, Silverstein JT, Rexroad 3rd CE (2008) Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol. Genomics* 32:380–392.
- Galbreath PF, Barnes TA (1981) Consumer preference for colour and size of Tilapia sold in supermarkets. In: Proceedings third annual catfish farmers of america. Arkansas, USA: 47-48 p.
- Glazov EA, Cottee PA, Barris WC, Moore RJ, Dalrymple BP, Tizard ML (2008) A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Research*. 18:957–64.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Ménessier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature genetics*, 17:71-4
- Gu Z, Eleswarapu S, Jiang H (2007) Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Letters* 581:981–8.

- Hampel M, Alonso E, Aparicio I, Santos JL, Leaver M (2015) Hepatic proteome analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to environmental concentrations of human pharmaceuticals. *Mol Cell Proteomics*, 14(2):371-81.
- Heimberg AM, Cowper-Sal-lari R, Sémonc M, Donoghued PCJ, Peterson KJ (2010) microRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *PNAS*, 107(45):19379-83.
- Hicks JA, Tembhrne P, Liu HC (2008) MicroRNA expression in chicken embryos. *Poultry Science*, 87:2335–43.
- Hicks JA, Tembhrne P, Liu HC (2009) Identification of microRNA in the developing chick immune organs. *Immunogenetics*, 61:231–40.
- Hilsdorf AWS (1995) Genética e cultivo de tilápias vermelhas - Uma revisão. São Paulo: Boletim do Instituto de Pesca. 22:73-84.
- Hilsdorf AWS, Penman DJ, Farias EC, McAndrew B. (2002) Melanophore appearance in wild and red tilapia embryos. *Pigment Cell Research*, 15(1):57-61.
- Huang CW, Li YH, Hu SY, Chi JR, Lin GH, Lin CC, Gong HY, Chen JY, 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*). *Journal of Animal Science*, 90(12):4266-79.
- Huyen NT (2016) Another explanation for the cause of heterosis phenomenon. *Journal of Genetics*, 95, 1065–1072.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Produção da Pecuária em 2014. 2014. Disponível em: <
http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf> Acesso em: janeiro 2017.
- Jensen ON (2004) Modification-specific proteomics: characterization of posttranslational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, 8(1):33-41.
- Jiao B, Huang X, Chan CB, Zhang L, Wang D, Cheng CH (2006) The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36:23–40.
- Jones JI, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrinology Reviews*, 16:3–34.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TPL, Bass JJ (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7:910–915.
- Kelleher MM, Berry DP, Kearney JF, McParland S, Buckley F, Purfield DC (2017) Inference of population structure of purebred dairy and beef cattle using high-density genotype data. *Animal*, 11(1):15-23.
- Kloosterman WP, Steiner FA, Berezikov E, de Bruijn E, van de Belt J, Verheul M, Cuppen E, Plasterk RH (2006) Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish. *Nucleic Acids Research*, 34:2558–2569.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature*, 438: 685–689.
- Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA (2008). Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2: 22–31.
- Lago AA (2014) Retrocruzamento entre variedades de *Oreochromis niloticus* Red Stirling e Chitralada. Tese de Doutorado na UFLA. 122p.

- Lee EJ, Jan AT, Baig MH, Ashraf JM, Nahm SS, Kim YW, Park SY, Choi I (2016) Fibromodulin: a master regulator of myostatin controlling progression of satellite cells through a myogenic program.
- Lee, SJ (2004) Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20:61–86.
- Lee YS, Dutta A (2009) MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4:199-227.
- Li W, Wang HQ, He RZ, Li YW, Su YL, Li AX (2017) Major surfome and secretome profile of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Insight into vaccine development. *Fish Shellfish Immunol*, 55:737-46.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027):769-773.
- Liu N, Olson EN (2010) MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Developmental 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.
- Lovshin LL, Peixoto JT, Vasconcelos EA (1976) Considerações ecológicas e economicas sobre a tilapia no nordeste do Brasil. Ed.:Vargas JI, Loureiro CGC, Andrade RM. Centro de Recursos Naturais, Belo Horizonte, MG: Fundação João Pinheiro, Diretoria de Tecnologia e Meio Ambiente.
- Ma X Liu X, Zhang Y, Zhu P, Ye W, Lin H (2007). Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Molecular characterization, tissue distribution and expression profiles in the gonad during the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry*, 147:325–339.
- Macleán N, Rahman MA, Sohm F, Hwang G, Iyengar A, Ayad H, Smith A, Farahmand H (2002) Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene*, 295(2):265-77.
- Martinelli CE, Custódio RJ, Aguiar-Oliveira MH (2008) Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 52(5):717-725.
- Mattick JS, Makunin IV (2006) Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics*; 15(1):R17–R29.
- May C, Brosseron F, Chartowski P, Schumbrutzki C, Schoenebeck B, Marcus K (2011) Instruments and methods in proteomics. *Methods Mol Biol.*, 696:3-26.
- McAndrew BJ, Majumdar KC (1983) Tilapia stock identification using electrophoretic markers. *Aquaculture*. 30:249-261.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387:83–90.
- McPherron AC, Lee SJ (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *PNAS*, 94:12457–12461.
- Medeiros EF, Phelps MP, Fuentes FD, Bradley TM (2009) Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling. *American Journal of Physiology*, 297:235-42.
- Meurer F, Hayashi C, Soares CM, Boscolo WR (2000) Utilização de levedura "spray dried" na alimentação de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 22(4):479-484.
- Mommsen TP (2001) Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology* 129:207–219.

- Moreira AA, Hilsdorf AWS, da Silva JV, Souza VR (2007) Genetic variability of two Nile tilapia strains by microsatellites markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 42(4):521-526.
- Moreira A A, Moreira HLM, Hilsdorf AWS (2005) Comparative growth performance of two Nile tilapia (Chitralada and Red-Stirling), their crosses and the Israeli tetra hybrid ND-56. *Aquaculture Research*. 36(11):1049-1055.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA (2007) A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genetics*. 3(5):779–786.
- Nuez-Ortín WG, Carter CG, Nichols PD, Wilson R (2016) Sequential protein extraction as an efficient method for improved proteome coverage in larvae of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Proteomics*, 16(14):2043-7.
- Nynca J, Arnold GJ, Fröhlich T, Ciereszko A (2015) Cryopreservation-induced alterations in protein composition of rainbow trout sêmen. *Proteomics*, 15(15):2643-54.
- Oliveira AC, Bovolenta LA, Nachtigall PG, Herkenhoff ME, Lemke N, Pinhal D (2017) Combining results from distinct microRNA target prediction tools enhances the performance of analyses. *Front Genet*, 16;8:59.
- Oliveira AMS (2014) Civas de crescimento de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem gift. Dissertação de mestrado na UEMS. 122p.
- Ørnholt-Johansson G, Frosch S, Gudjónsdóttir M, Wulff T, Jessen F (2017) Muscle protein profiles used for prediction of texture of farmed salmon (*Salmo salar* L.). *J Agric Food Chem*, 65(16):3413-3421.
- Pereira JCC (2012) Melhoramento genético aplicado à produção animal. 6ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2012. 758 p.
- Plasterk RH (2006) Micro RNAs in animal development. *Cell*, 124:877–881.
- Poletto AB, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Nakajima RT, Mazzuchelli J, Ribeiro HB, Venere PC, Nirchio M, Kocher TD, Martins C (2010) Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. *BMC Genetics*, 11:5-10.
- Popma TJ, Lovshin LL (1995) Worldwide prospects for commercial production of tilapia. Alburn: International Center for Aquaculture, Alburn University: 41 p.
- Rajagopalan R, Vaucheret H, Trejo J, Bartel DP (2006) A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, 20:3407-3425.
- Reddy AM, Zheng Y, Jagadeeswaran G, Macmil SL, Graham WB, Roe BA, Desilva U, Zhang W, Sunkar R (2009) Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs. *BMC Genomics*, 10:65.
- Reinecke M, Collet C (1998) The phylogeny of the insulin-like growth factors. *Int. Rev. Cytol.* 183, 1–94.
- Reinecke M, Schmid A, Ermatinger R, LoYng-Cueni D (1997). Insulinlike growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: Gene sequence, tissue expression, and cellular localization. *Endocrinology* 138:3613–3619.
- Rigoutsos I (2009) New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Research*, 69:3245–48
- Rodgers BD, Weber GM, Sullivan CV, Levine MA (2001) Isolation and characterization of myostatin complementary de-oxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142:1412–1418.

- Rudnicki MA, Jaenisch R (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* 17: 203–209.
- Santos SG, Diniz CG, Silva VL, Lima FL, Andrade HM, Chapeaurouge DA, Perales J, Serufo JC, Carvalho MA, Farias LM (2011) Differentially regulated proteins in *Prevotella intermedia* after oxidative stress analyzed by 2D electrophoresis and mass spectrometry. *Anaerobe*, 18(1):76-82.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *New England Journal of Medicine*, 350:2682–2688.
- Sempere LF, Cole CN, McPeck MA, Peterson KJ (2006) The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *Journal of Experimental Zoology Part B*, 306:575–588.
- Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Scholven J, Einspanier R (2008) Concatameric cloning of porcine microRNA molecules after assembly PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375:484–9.
- Shkumatava A, Stark A, Sive H, Bartel DP (2009) Coherent but overlapping expression of microRNAs and their targets during vertebrate development. *Genes and Development*, 23:466-481.
- Sparkman, O. D. (2000). *Mass spectrometry desk reference*. Pittsburgh: Global View.
- Sun Q, Wu L, Ni Z, Meng F, Wang Z, Lin Z (2004) Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross. *Plant Science*, 166(3):651-657.
- Strozzi F, Mazza R, Malinverni R, Williams JL (2009) Annotation of 390 bovine miRNA genes by sequence similarity with other species. *Animal Genetics* 40:125.
- Sun Y, Guo C-Y, Wang D-D, Li XF, Xiao L, Zhang X, You X, Shi Q, Hu GJ, Fang C, Lin HR, Zhang Y (2016) Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms underlying growth superiority in a novel grouper hybrid (*Epinephelus fuscogutatus*♀ × *E. lanceolatus*♂). *BMC Genetics*, 17:24.
- Takacs CM, Giraldez AJ (2011) MicroRNAs as genetic sculptors: fishing for clues. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21:760-767.
- Thatcher EJ, Bond J, Paydar I, Patton JG (2008) Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC Genomics*, 9:253.
- Valledor L, Jorriñ J (2011) Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *J Proteomics*, 74(1):1-18.
- Vong QP, Chan KM, Cheng CH (2003) Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. *Journal of Endocrinology*, 178:513–521.
- Xia JH, He XP, Bai ZY, Yue GH (2011) Identification and Characterization of 63 MicroRNAs in the Asian seabass *Lates calcarifer*. *Plos One*, 6(3):e17537.
- Yan B, Guo JT, Zhao LH, Zhao JL (2012) MicroRNA expression signature in skeletal muscle of Nile tilapia. *Aquaculture*, 364–365:240–246.
- Yan B, Guo JT, Zhu CD, Zhao LH, Zhao JL. (2013a) miR-203b: a novel regulator of MyoD expression in tilapia skeletal muscle. *Journal of Experimental Biology*, 216:447-451.0,

- Yan B, Zhu CD, Guo JT, Zhao LH, Zhao JL. (2013b) miR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression. *Journal of Experimental Biology*, 216:1265-1269.
- Yu Q, Wu W, Tian X, Hou M, Dai R, Li X (2017) Unraveling proteome changes of Holstein beef *M. semitendinosus* and its relationship to meat discoloration during post-mortem storage analyzed by label-free mass spectrometry. *J Proteomics*, 154:85-93
- Zhang D, Lu K, Dong Z, Jiang G, Xu W, Liu W (2014) The effect of exposure to a high-fat diet on microRNA expression in the liver of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *PLoS One*, 9(5):e96132.
- Zhang H, Xu X, He Z, Zheng T4, Shao J (2017) De novo transcriptome analysis reveals insights into different mechanisms of growth and immunity in a Chinese soft-shelled turtle hybrid and the parental varieties. *Genes*, 20(605):54-62.
- Zhao Y, Srivastava D (2007) A developmental view of microRNA function. *Trends Biochemical Science*, 32(4):189-197.
- Zimmermann S (1999) Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aquicultura* 9(4):15-21.
- Zimmermann S (2000) O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. *Panorama da Aquicultura*. Rio de Janeiro.
- Wang WS, Hung SW, Lin YH, Tu CY, Wong ML, Chiou SH, Shieh MT (2007) Purification and localization of nitric oxide synthases from hybrid tilapia (Nile tilapia x Mozambique tilapia). *J Aquat Anim Health*, 19(3):168-78.
- Wang DS, Jiao B, Hu C, Huang X, Liu Z, Cheng CH (2008) Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 367:336–341.
- Wei C, Salichos L, Wittgrove CM, Rokas A, Patton JG (2012) Transcriptome-wide analysis of small RNA expression in early zebrafish development. *RNA*, 18(5):915-29.
- Weintaub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al. 1991. The myoD gene family:Nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251: 761–766.
- Wernersson R, Schierup MH, Jørgensen FG, Gorodkin J, Panitz F, Staerfeldt HH, Christensen OF, Mailund T, Hornshøj H, Klein A, Wang J, Liu B, Hu S, Dong W, Li W, Wong GK, Yu J, Wang J, Bendixen C, Fredholm M, Brunak S, Yang H, Bolund L (2005) Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*, 6:70.
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH (2005) MicroRNA Expression in Zebrafish Embryonic Development. *Science*, 209:310-311.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*,13:19-50.