

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE
MICROSSATÉLITES NO GENE DA
MIOSTATINA COM PESO CORPORAL E
MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE UMA
POPULAÇÃO SINTÉTICA DE PACU (*Piaractus
mesopotamicus*)**

Gabriel Rinaldi Lattanzi

Jaboticabal, São Paulo

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE
MICROSSATÉLITES NO GENE DA
MIOSTATINA COM PESO CORPORAL E
MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE UMA
POPULAÇÃO SINTÉTICA DE PACU (*Piaractus
mesopotamicus*)**

Gabriel Rinaldi Lattanzi

Prof. Dr. Rafael Vilhena Reis Neto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2022

L364a Lattanzi, Gabriel Rinaldi
Associação do Polimorfismo de Microsatélites no Gene da Miostatina
com Peso corporal e Medidas Morfométricas de uma população sintética de
pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Gabriel Rinaldi Lattanzi. -- Jaboticabal,
2022
vi, 49 p. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2022
Orientador: Rafael Vilhena Reis Neto
Banca examinadora: Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, Gabriela Vanina
Villanova
Bibliografia

1. Melhoramento genético. 2. Genética. 3. Marcador molecular. 4.
Modelos lineares. I. Título. II. Jaboticabal - Centro de Aquicultura.

CDU 639.3:636.082

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE MICROSSATÉLITES NA REGIÃO REGULADORA DO GENE DA MIOSTATINA COM PESO CORPORAL E MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE UMA POPULAÇÃO SINTÉTICA DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

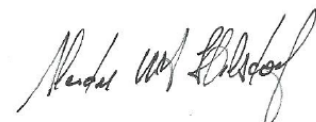
AUTOR: GABRIEL RINALDI LATTANZI

ORIENTADOR: RAFAEL VILHENA REIS NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RAFAEL VILHENA REIS NETO (Participação Virtual)
Engenharia de Pesca / Unesp Campus de Registro, Registro-SP



Prof. Dr. ALEXANDRE WAGNER SILVA HILSDORF (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes-SP



Profa. Dra. GABRIELA VANINA VILLANOVA (Participação Virtual)
Laboratório de Biotecnologia Acuática / Universidade Nacional do Rosário, Argentina

Jaboticabal, 21 de fevereiro de 2022

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me dado força e aptidão ao longo desses anos, permitindo-me superar todas as barreiras.

À minha esposa Cássia Regina Souza Lattanzi, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis e por ser muito importante na minha vida profissional e pessoal.

Aos meus pais, em memória, Lourenço Braz Lattanzi e Tânia Rinaldi Domiciano Lattanzi, por sempre terem me mostrado o caminho das pedras e como contorná-los com respeito, dedicação e muita fé. “Este título é pra vocês”.

Aos meus irmãos Guemael Rinaldi Lattanzi, George Rinaldi Lattanzi e Gustavo Rinaldi Lattanzi, por sempre me incentivarem a nunca parar de estudar.

Aos meus sobrinhos Gael e Maia por sempre me alegrarem, apesar da distância.

À minha querida tia Maristela Rinaldi Domiciano, pelo apoio moral e financeiro, e por nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Ao meu querido amigo Carlos Alberto Gasparetto, que foi muito importante para a realização dos meus sonhos. Nunca me esquecerei de quando ele me levou fazer o vestibular e de toda ajuda ao longo desses anos.

Ao meu querido amigo Eduardo Campos, sempre presente no dia a dia. Seu apoio foi muito importante.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Rafael Vilhena Reis Neto, pela oportunidade que tem me concedido todos esses anos, pelos ensinamentos e por toda paciência.

À Profa. Dra. Gabriela Vanina Villanova, ao Felipe Del Pazo e a todo o grupo de pesquisadores do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade Nacional de Rosário (UNR), Argentina, pela genotipagem dos animais, e por toda ajuda, ensinamentos e aprendizagem ao longo da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto, por todas as reuniões, ensinamentos e grandes contribuições para a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Dessimoni Dias, por todas as reuniões, ensinamentos estatísticos, análise dos dados, análise com os softwares e por todo incentivo.

A toda equipe do Prof. Rafael Vilhena Reis Neto, amigos e parceiros: Emelyn Eiko Rodrigues Tanabe Muniz, Fábio Augusto Paiva Camisa Nova, Thais Gornati Gonçalves, Jéssica Neto de Freitas, João Santos Mingato Neto e Woshington Rocha Gervaz.

Ao colega de equipe Woshington Rocha Gervaz, por servir de inspiração para todos nós, e a todos os Engenheiros de Pesca do Brasil, sempre nos fazendo acreditar que é possível realizar todos os nossos sonhos, com muito empenho e dedicação.

A Elisa Maia de Godoy, sua mãe Vânia e seu pai Edson, grandes amigos que levo de Registro-SP, pelo apoio, amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação, aos discentes, docentes, funcionários e diretoria do Centro de Aquicultura da Unesp – CAUNESP.

Aos membros da banca examinadora da qualificação da dissertação, Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto e Prof. Dr. Marco Aurélio Dessimoni Dias, e aos suplentes Profa. Dra. Dariane Beatriz Schoffen Enke e Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches, pela disponibilidade e participação nesta etapa de avaliação.

Aos membros da banca examinadora da defesa da dissertação, Prof. Dr. Rafael Vilhena Reis Neto, Profa. Dra. Gabriela Vanina Villanova e Prof. Dr.

Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, e aos suplentes Prof. Dr. Marco Aurélio Dessimoni Dias, Prof. Dr. Eduardo Antônio Sanches, Profa. Dra. Dariane Beatriz Schoffen Enke e Prof. Dr. Carlos Augusto Prata Gaona, pela disponibilidade e participação nesta etapa de avaliação.

A todas as pessoas que me ajudaram a ter êxito pessoal e profissional de forma direta e indireta.

APOIO FINANCEIRO

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pela bolsa de mestrado - processo 132829/2020-7.

LISTA DE TABELA

Tabela – 1 Média das características (\pm desvio padrão) e número de indivíduos por família.....	24
Tabela – 2 Frequências alélicas e genóticas das variáveis PESO1, PESO2, PESO3, CP2, LC2 e LC3 do STR-Miostatina para a espécie pacu.....	26
Tabela – 3 P Estatísticas Fc (F calculado) e valores de probabilidades (p) de associação entre os polimorfismos alélicos e genóticos de marcadores microssatélites do gene da Miostatina com variáveis de desempenho de uma população sintética de pacu <i>P. mesopotamicus</i>	27
Tabela – 4 Médias do peso (g) e das medidas morfométricas e ordenamento (°) dos alelos do marcador STR-Miostatina para uma população sintética de pacu <i>P. mesopotamicus</i>	28
Tabela – 5 Médias do peso (g) e das medidas morfométricas e ordenamento (°) dos genótipos do marcador STR-Miostatina para uma população sintética de pacu <i>P. mesopotamicus</i>	28
Tabela – 6 Correlação de Pearson entre os ordenamentos dos alelos para as características PESO2, PESO3, CP2 e LC2 (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre as características.....	29
Tabela – 7 Correlação de Pearson entre os ordenamentos dos genótipos para as características PESO2, PESO3, CP2 e LC2 (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre as características.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Melhoramento genético de peixes redondos	15
2.2 Miostatina como Gene Candidato	17
3 OBJETIVO GERAL	22
3.1 Objetivos específicos	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Formação das famílias e obtenção dos Fenótipos	22
4.2 Extração e verificação da integridade do DNA Genômico	23
4.3 Amplificação e Genotipagem da Região Alvo do Gene da Miostatina	24
4.4 Análises Populacionais e Estudo de Associação	25
5 RESULTADOS	26
6 DISCUSSÃO	32
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
8 REFÊRENCIAS	39

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o polimorfismo de marcadores microssatélites no gene da Miostatina e verificar sua associação com o peso corporal e as medidas morfométricas de uma população sintética de pacus (*Piaractus mesopotamicus*). Foram avaliados 232 animais pertencentes a 14 famílias de irmãos-completos em dois tanques escavados de concreto de 220m² (10x22m) nas instalações do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP). Durante o período de avaliação foram realizadas três biometrias em diferentes períodos: a primeira ocorreu cerca de 30 dias após a soltura dos animais, que foram pesados (PESO1) e medidos para largura corporal (LC1). A segunda ocorreu em torno de 60 dias após a primeira - nessa etapa, os animais foram pesados (PESO2) e medidos em largura corporal (LC2) e comprimento padrão (CP2). Na terceira biometria, que ocorreu 150 dias após a segunda, os peixes foram pesados (PESO3) e medidos para largura corporal (LC3). O DNA genômico foi extraído de cada indivíduo avaliado e o gene da Miostatina foi amplificado por PCR, utilizando-se primers desenhados especificamente para a região do gene. Após a amplificação os animais foram genotipados para um marcador microssatélite localizado na extremidade não codificante 3' UTR. Na população foram identificados oito alelos (208, 210, 220, 222, 224, 226, 230 e 232) e 22 combinações de genótipos. Foi constatada associação significativa entre o polimorfismo do marcador microssatélite e as características avaliadas PESO2, PESO3, CP2 e LC2. Os alelos de melhor efeito para as características foram 210, 222, 226 e 230. De forma geral, constatou-se uso potencial das informações observadas em modelos de predição genética como forma de aumentar a acurácia de seleção.

Palavra-chave: Análise de associação, Miostatina, Seleção assistida por marcadores.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the polymorphism of microsatellite markers in the Myostatin gene and to verify its association with body weight and as morphometric measures of a synthetic population of pacus (*Piaractus mesopotamicus*). A total of 232 animals belonging to 14 full-sib families were evaluated in two 220m² (10x22m) excavated concrete tanks at the Unesp Aquaculture Center (CAUNESP). During the evaluation period, three biometrics were performed in different periods: the first took place about 30 days after the animals were released, which were weighed (WEIGHT1) and measured for body width (BW1). The second took place around 60 days after the first - at this stage, the animals were weighed (WEIGHT2) and measured in body width (LC2) and standard length (CP2). In the third biometry, which took place 150 days after the second, the fish were weighed (WEIGHT3) and measured for body width (LC3). Genomic DNA was extracted from each individual evaluated and the Myostatin gene was amplified by PCR, using primers designed specifically for the region of the gene. After amplification the animals were genotyped for a microsatellite marker located at the non-coding 3' UTR end. Eight alleles (208, 210, 220, 222, 224, 226, 230 and 232) and 22 combinations of genotypes were identified in the population. A significant association was found between the microsatellite marker polymorphism and the evaluated characteristics WEIGHT2, WEIGHT3, BW2 and SL2. The best effect alleles for the traits were 210, 222, 226 and 230. In general, there was a potential use of information observed in genetic prediction models as a way to increase selection accuracy.

Keywords: Association analysis, Myostatin, Marker-assisted selection.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a busca por alimentos de alta qualidade tem se intensificado e, como consequência, o consumo mundial de pescado tem crescido de maneira exponencial. Entre os anos de 1961 e 2018, o consumo per capita cresceu de 9,0kg a 20,5kg, um aumento de 1,5% ao ano. Quando comparado ao consumo de carne de outros animais terrestres (aves, suínos, bovinos e ovinos), que juntos somam um crescimento anual de 2,1% de 1961 a 2017, nota-se que o consumo de peixes teve uma taxa média anual maior (3,1%) para o mesmo período (FAO, 2020).

Em 2018, a produção global de pescado atingiu 179 milhões de toneladas, com 45,81% provenientes da aquicultura e 54,19% advindos da pesca extrativista. A aquicultura atingiu valores próximos a 82 milhões de toneladas, e o extrativismo, 96 milhões, um valor considerado alto. Entretanto essa proporção tende a se inverter, uma vez que a produção de peixes a partir da aquicultura tem apresentado crescimentos anuais consideráveis e com ganhos cada vez maiores enquanto a pesca extrativista se encontra estagnada (FAO, 2020).

Considerando o cenário nacional, a produção aquícola no Brasil em 2018 foi de 605 toneladas, alcançando um resultado superior em 11,22% quando comparado com a produção de 2017, que foi de aproximadamente 537 toneladas. Para 2030, projeta-se um aumento de 32,2% com relação a 2018 chegando a valores próximos a 800 toneladas (FAO, 2020).

Esta projeção vem se confirmando segundo o boletim estatístico do IBGE (2018). A produção de espécies de “peixes redondos”, como o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), bem como alguns híbridos entre essas espécies, atingiu cerca de 143 mil toneladas, indicando um aumento de 8,72% em contraste com o ano de 2017, ficando atrás apenas da produção de tilápia (*Oreochromis sp.*), com cerca de 311 mil toneladas.

Apesar do destaque nacional na aquicultura, o Brasil possui condições naturais, como recursos hídricos, clima favorável, extenso litoral, geografias favoráveis e grande biodiversidade, que poderiam proporcionar uma produção ainda maior, tornando o país uma referência nesta atividade (Moreno, 2018).

Dessa forma, se faz necessário aliar o desenvolvimento econômico e a conservação da biodiversidade, estabelecendo programas de melhoramento genético e geração de tecnologias que visam ao aumento da produção de espécies nativas com as características zootécnicas de interesse e que, assim, reduzem a introdução de espécies exóticas na aquicultura nacional. (Gonçalves, 2017).

Com relação ao panorama do melhoramento genético de peixes, quando comparado a outras espécies zootécnicas, existem poucas iniciativas comerciais e apenas cerca de 10% da produção global de pescado é proveniente de programas de melhoramento genético (Gjedrem, 2012).

No Brasil, não existem programas comerciais de melhoramento voltados para a seleção genética de características de desempenho em pacu *P. mesopotamicus* (Costa et al., 2020), e, de modo geral, programas de melhoramento genético para espécies nativas de peixes ainda são escassos (Da Silva, 2018).

Pesquisas recentes que envolvem a área de melhoramento genético buscam otimizar o processo de ganho genético utilizando ferramentas moleculares, como os marcadores de DNA, que auxiliam na seleção de progenitores de valor genético extremo maximizando os ganhos genéticos por geração (Dias, 2014).

No universo dos marcadores moleculares, os microssatélites são bastante informativos tendo em vista sua expressão codominante e multiallelismo (O'Connell e Wright, 1997). Estes marcadores podem ser utilizados na identificação de diferentes estoques genéticos, no monitoramento do nível de endogamia e em programas de melhoramento genético por meio de estudos de associação de polimorfismos com o fenótipo promovendo um aumento na intensidade e acurácia de seleção (Melo et al., 2008).

Estudos de associação envolvem genes candidatos que possuem ligação direta ou indireta com características de interesse. Neste sentido, o gene da Miostatina (GDF-8 Growth and Differentiation Factor-8) pode ser considerado promissor, uma vez que está relacionado com a regulação do crescimento e envolvido com a modulação do desenvolvimento do músculo estriado esquelético nos vertebrados (McPherron e Lee, 1997). Segundo Langley et al. (2002), a Miostatina atua controlando o número de fibras musculares a serem formadas, regulando a proliferação e a diferenciação dos mioblastos no período embrionário,

e no ciclo pós-natal (Manceau et al., 2008). Em peixes, a função da Miostatina parece ser mais ampla, não sendo restrita apenas ao controle do crescimento muscular, participando também da fisiologia e regulação de outros tecidos (Ostbye et al., 2001).

Os efeitos do gene candidato em características de interesse podem ser identificados por meio de testes de associação, verificando se há influência ou não dos diferentes alelos, que são determinados por um único sítio polimórfico ou como haplótipos que possuem vários sítios polimórficos (Peixoto, 2004). As estimativas são feitas por modelos lineares, em que os efeitos fixos são os alelos ou os genótipos (Rothschild e Soller, 1999).

Um grupo de pesquisadores da Universidade Nacional de Rosário (UNR), na Argentina, identificou polimorfismo em um marcador microssatélite para o gene da Miostatina em pacu (Diaz, 2016). Com base nesse trabalho prévio, a etapa seguinte é testar a hipótese de associação desse polimorfismo com as características de desempenho em pacu e, assim, futuramente utilizá-lo em programas de melhoramento genético assistido por marcadores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Melhoramento genético de peixes redondos

Algumas tentativas de implementação de programas de melhoramento para espécies nativas já foram realizadas no Brasil, como, por exemplo, o projeto “Bases Tecnológicas para o Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura no Brasil – Aquabrazil”, que foi executado entre os anos de 2007 e 2011 (Resende, 2009).

Tentativas como essas ainda são muito restritas e se concentram principalmente em iniciativas isoladas quase sempre coordenadas por instituições de pesquisas. Embora gerem bons resultados, tais tentativas não culminam efetivamente com a oferta de animais de genética superior para os produtores (Perazza et al., 2017; Campos et al., 2020; Urrea-Rojas et al., 2021).

A inexistência de programas comerciais de melhoramento de peixes nativos no Brasil gera uma série de problemas, como, por exemplo, a escolha, pelos produtores, de uma espécie exótica como carro-chefe para a aquicultura nacional,

em vez de explorar o potencial genético das espécies nativas (Ribeiro, 2016), e a utilização de híbridos de forma desordenada na busca por animais de melhor desempenho e mais adaptados (Hashimoto, 2011).

É importante salientar que a produção de híbridos, quando feita de maneira correta e segura, não é um problema (Alves et al., 2014), contudo, de forma desordenada e sem um rigoroso controle dos estoques parentais, pode ocasionar riscos ambientais, tal como a extinção de populações nativas (Baggio et al., 2016).

Assim, iniciativas que estimulem a implementação de programas de melhoramento de espécies nativas são extremamente positivas, pois a maioria das espécies nativas produzidas na aquicultura da América do Sul ainda é resultante de peixes geneticamente não selecionados, dependendo de animais selvagens para repor os estoques reprodutores (Mastrochirico-Filho et al., 2019; Del Pazo et al., 2021; Freitas et al., 2021).

O melhoramento genético clássico é realizado por meio de seleção usando informações fenotípicas e de parentesco dos indivíduos avaliados. No entanto, existem esforços para melhorar as tecnologias. Nos últimos anos, pesquisas que buscam aperfeiçoar ou otimizar o melhoramento genético para peixes têm sido realizadas utilizando-se ferramentas moleculares (Gasques et al., 2013).

Os programas de melhoramento genético mais avançados, como os programas de trutas arco-íris e salmão, utilizam painéis comerciais de marcadores (SNP's) em alta densidade (acima de 50k) para estudos de associação genômica, e as informações geradas são usadas nos modelos de predição genética para características de desempenho e resistência a doenças (Yáñez & Martínez 2010; Yáñez et al., 2014).

Apesar de algumas empresas já disporem de painéis de alta densidade para diversas espécies de peixes, muitos ainda não estão validados. Além disso, não existem informações consistentes sobre a associação dos marcadores com características de interesse e sobre a eficiência da incorporação das informações geradas nos modelos de predição.

Dessa maneira, faz-se necessário o incentivo do uso de técnicas moleculares mais simples e acessíveis para tornar as predições genéticas mais

confiáveis, contribuindo para que os programas sejam mais eficientes e obtenham maiores ganhos genéticos por geração.

Neste sentido, os microssatélites ainda se mostram uma alternativa viável, principalmente para utilização em programas de Seleção Assistida por Marcadores (SAM) (Al-Tobasei et al., 2021; Yoshida et al., 2019). A Seleção Assistida, como descrita por Lande & Thompson (1990), é um método de melhoramento no qual se promove a incorporação de informações de marcadores moleculares em modelos clássicos de predição dos valores genéticos dos indivíduos. A vantagem dessa prática é que, em contraste à seleção baseada apenas no fenótipo, os marcadores não sofrem influência do ambiente e possuem herança mendeliana (herdabilidade =1), tornando as predições mais precisas (Taylor, 2014).

2.2 Miostatina como Gene Candidato

Em meados dos anos 90, um grupo de cientistas da Universidade Johns Hopkins University School of Medicine pesquisava por novos grupos de proteínas que regulassem o crescimento e o desenvolvimento de seres vivos (Chiu, 2006).

Em 1997, McPherron e Lee descobriram, então, a proteína GDF-8 que hoje é conhecida como fator de diferenciação e crescimento. Os pesquisadores da época atribuíram à essa proteína o nome de myostatin – em grego, myo significa músculo e statin deriva da palavra statos, cujo significado é parar (Chiu, 2006).

Nos primeiros estudos com o gene da Miostatina, conduzidos com camundongos, concluiu-se que, em vertebrados terrestres, a Miostatina é expressa em níveis elevados no músculo esquelético e possui como principal função regular negativamente o desenvolvimento e o crescimento muscular (McPherron e Lee 1997) e em níveis mais baixos no tecido adiposo, na glândula mamária e no músculo cardíaco (Ji et al., 1998).

A partir dessa descoberta, iniciaram-se estudos com outros animais em busca de mutações no gene da Miostatina. Comparando as sequências genéticas da Miostatina em ovelhas, porcos, galinhas, perus, vacas e peixes, McPherron e Lee descobriram que os genes da Miostatina eram muito semelhantes entre espécies de vertebrados (Chiu, 2006).

Esta proteína ganhou atenção mundial dos pesquisadores a partir de um fenômeno chamado double muscle, encontrado no gado da raça Bos Belgian Blue. Essa raça representa mais da metade do rebanho da Bélgica e é conhecida pelo seu prodigioso desenvolvimento de “músculos duplos”. (Chiu, 2006).

Muitos são os genes candidatos correlacionados com o crescimento. A maioria das pesquisas sobre tais genes estão relacionadas com a superfamília dos fatores de crescimento TGF- β (Transforming Growth Factor- β) e genes expressos no eixo somatotrófico como os genes GHRH, GHIH ou somatostatina, GH, IGF-I e -II e de proteínas transportadoras associadas e receptores que desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo e dos processos fisiológicos (De-Santis, 2007).

O gene da Miostatina é caracterizado como membro da superfamília dos fatores de crescimento TGF- β (Transforming Growth Factor- β), denominada GDF-8 (Growth and Differentiation Factor-8), e se destaca pela sua importância em processos de regulação do crescimento (McPherron e Lee 1997).

Em peixes, o mecanismo de ação da Miostatina ainda não é bem compreendido, no entanto foi apontada uma possível influência sobre as vias da miogênese controladas pelos MRFs - Fatores de Regulação Miogênica (Koganti et al., 2020). Essas influências, quando ocorrem, são denominadas comomutações que podem resultar em um padrão de aumento muscular - conforme observado em Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (McPherron e Lee, 1997; Ostbye et al., 2001).

Para que o gene seja denominado gene candidato, ele deve seguir algumas premissas, dentre as quais: sua função fisiológica deve ser conhecida e seu efeito direto ou indireto na expressão de uma característica quantificável. Normalmente, estudos de prospecção de genes candidatos são direcionados com base no conhecimento prévio de seu papel na regulação de vias metabólicas específicas que influenciam uma determinada característica quantitativa (De-Santis, 2007).

A partir desse embasamento, é necessário realizar pesquisas quanto ao polimorfismo, à associação estatística entre alelos específicos e à expressão fenotípica da característica de interesse. (Wei et al., 2014).

O gene da Miostatina tem um forte indício de gene candidato, pois, além de atender as premissas citadas, possui numerosas sequências identificadas

em peixes comercialmente importantes, como já observado em alguns trabalhos com as espécies *Coilia nasus* (Fukuan et al., 2014), *Paralichthys olivaceus* (Lee et al., 2016), *Siniperca chuatsi* (Liu et al., 2016), *Trichiurus lepturus* (Zhang et al., 2016), *Micropterus salmoides* (Li et al., 2017), *Protopterus annectens* (Ong et al., 2017), *Danio rerio* (Wang et al., 2018), *Cranoglanis boudierius* (Xie et al., 2019), *Oreochromis niloticus* (Zhao et al., 2019 e Segev-Hadar et al., 2020), *Ictalurus punctatus* (Zhang et al., 2020), *Megalobrama amblycephala* (Sun et al., 2020) e *Larimichthys crocea* (Lou et al., 2021).

Também foram realizados estudos com microssatélite envolvendo o gene da miostatina em peixes. Por exemplo (Maccatrazo et al., 2002), utilizando protocolos RT-PCR e RACE, com a espécie *Umbrina cirrosa*, obtiveram a sequência da miostatina, encontrando um cDNA completo com 2086 pb de comprimento e 376 aminoácidos. Além disso, foi encontrada na região não codificante 3'UTR do cDNA uma repetição de microssatélite (AC 29) – esta região de repetição foi examinada em nível genômico, revelando quatro alelos distintos e sugerindo que este microssatélite pode representar um marcador polimórfico útil para estudar a associação fenótipo/genótipo.

Estudos com bagre *Ictalurus punctatus* com base em análises de PCR (Zhong et al., 2015) concluíram que a invasão de microssatélites no gene MSTN pode ser um evento recente na evolução. O microssatélite trinucleotídico (AGC), selecionado no presente estudo, foi encontrado em uma região codificadora do gene MSTN. Tal marcador pode ser usado para identificar indivíduos puros e híbridos, além de poder ser utilizado em estudos de associação de polimorfismos com características de interesse.

Duas isoformas de miostatina foram identificadas em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) por RT-PCR. A isoforma I de Miostatina de salmão é transcrita no músculo esquelético branco como uma espécie de mRNA de 2346 nucleotídeos que codifica uma proteína precursora de 373 aminoácidos.

A Miostatina I de salmão apresenta 93% de identidade de sequência com a isoforma II que foi isolada do músculo branco como uma sequência parcial de cDNA de 1409 nucleotídeos. Quando comparados com os mamíferos, em peixes foram

identificados em mais tecidos, incluindo músculo branco, intestino, cérebro, brânquias, língua e olho (Ostbye et al., 2001).

Em estudos de clonagem e caracterização envolvendo o gene da Miostatina, foram relatados dados de sequência, expressão tecidual e posição no mapa para miogenina, MYOD1, miostatina e folistatina em três espécies de bagres (*Ictalurus punctatus*, *Ictalurus furcatus* e *Ictaluru catus*). Foram identificadas para o gene da Miostatina repetições de microssatélites polimórficos em regiões não codificantes 3'UTR e a confecção de um mapa de ligação com base na herança desses loci de microssatélites (Gregory et al., 2004).

Em estudos com o gene da Miostatina em uma espécie de peixe *Paralichthys olivaceus* foram identificadas quatro sequências de microssatélites em regiões não codificantes. A análise de expressão revelou que o gene da Miostatina foi expresso não apenas no músculo esquelético, mas também em outros tecidos, incluindo cartilagem, o que não havia sido relatado em peixes anteriormente. Além disso, concluiu-se que o gene MSTN em peixes pode desempenhar papéis diferentes em comparação com o de mamíferos *Paralichthys olivaceus* (Zhong et al., 2008).

Recentemente, um grupo de pesquisadores do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade Nacional de Rosario (UNR), na Argentina, realizaram um estudo de caracterização do gene da miostatina na espécie pacu descrevendo uma sequência de 2.967 pares de bases, correspondendo à região 3' do éxon 1 (29 pb), íntron 1 (528 pb), éxon 2 (370 pb), íntron 2 (454 pb) e éxon 3 (1586 pb). Nestes estudos os autores identificaram um marcador microssatélite (STR) do tipo dinucleotídeo TC localizados na extremidade não codificante 3' UTR, denominado como msnt-1 (Diaz, 2016).

Mediante as análises das sequências genômicas correspondentes ao cDNA e seguindo a regra dos sítios de splicing que doam e que recebem (GT...AG), os limites exon-intron foram determinados conforme demonstrado na figura 1 (Bursset et al. 2000; Diaz, 2016).

agagaccatcatgaccatggctacggagcgtgagtgccctttcccggtgctttttttattgaacgat	69
E T I M T M A T E	10
caaaattgagtcataaattgctggccgaagcggctttggcacgtgacggctttgogcaagaaggttcca	138
tgcattacgcccgagacacgcgcaaaaaagaacaggagaacgtggaaaagctgcctttttctgcgcac	207
ttaaagcagtggaagtttagtcgctgtctcgatgtatcgcggtttacgcaacgggtgacctggagc	276
gggtaaaagcgcacccggcctcatcttaaaacatgctgtccaaatgaattgtgtagtcgccagaataagc	345
gcctgtgtttgtgtaattgctgcttaaaatgtgtcaattcaatgatgaacgtagcgtagcagctggcttt	414
gtgatgtcagatgttttaggcacattcaggtctttctatgggctcgagaggaaaacttttattttatata	483
aaccttttaattgggtgtaagcgaattctctattttgctaacagctctctttttttattctctcattt	552
ctagccgaccccatcgttcaagttagaccgaaaaacaaaatgctgtttctctcctcagtcogaagatc	621
F D P I V Q V D R K P K C C F F S F S P K I	32
caagcgaatcgcacatcgtgagggcgcagctgtgggtgcatttggcggcggcggagggaagccaccacgtc	690
Q A N R I V R A Q L W V H L R A A E E A T T V	55
ttcttgcagatctcagcctgatgccctcacagacggaagggggcacataagaataaggctactgaag	759
F L Q I S R L M P V T D G R G H I R I R S L K	78
attgagtgaaacgctggggtcagctcttggcagacattgatgtaaacgaggtctcaccctggactgtg	828
I D V N A G V T S W Q S I D V K Q V L T V W L	101
aggcagcccgagacaaaactcggggatcaagataaatgcctacgacacgaaaggggaacgatttggctgtt	897
R Q P E T N S G I K I N A Y D T K G N D L A V	124
acctcagcagaggtggggcgaagagggcctggtaagttgctttagcttctcttcaagtgtcattttgaa	966
T S A E V G E E G L	147
ggtcaatttagagcagataaatgatgcatataaagtaaatgactgtatatgaatggaggatctgttgggtg	1035
gttctctgttctcagttatattaatgcataaactgaaatagcagtcataagagcagttactggattatg	1104
tgtagtacagtataataatcctttatgagcaataactgtttattctaaagtctagagtttaagggtt	1173
atgctgttatatcagagcctcgggagcaaatttaatatgaatgtattgggtcaaatttgtgttaacta	1242
aatagaatagactgcttcaagttgaaatgtagtagattggttaggtaataatggttgagagcactagaaggtct	1311
tctctttatgtctgtgaacctttttacacttttttaagaatcaaacctctccttttccaatgacag	1380
ttacccttcatggaggtcaaaaatctcagaggtcccaagcgcagcagagagaggtcaggactggactgt	1449
L P F M E V K I S E G P K R S R N E S G L D	147
gagcagaattcgtcggagtcgccgtgttggcggatccctcagcgtggactttgaagacttcggctgg	1518
D E N S S E S R R Y P L T V D F E D F G W	147
Gactggattattgctccgaaacgctacaaggccaattactgctcgggggagtgtagctacatgcacctg	1587
D W I I A P K R Y K A N Y S G E D Y M H L	147
cagaagtaccgcacaccacccctggtagcaaaagggcaccaccggcaccggccctatgctgcacc	1656
Q K Y P H T H L V N K A N P R G T A G P T	147
cccaccaagatgtcccccataacatgctttacttcaacggcaaaagagcagatcatctacggcaagatc	1725
P T K M S P I N M L Y F N G K E Q I I Y G K I	147
ccctccatggtggtggaccgctcgggtgctcgttagggccgccccaggcaggactcgatccgtctcaa	1794
P S M V V D R G S *	147
aaaccocgtcccccggagctcccaccacaacaccatcaaccattatcagtgctttccgcgaaagaa	1863
aaagaacactgtgcaatagaaccagagtagcagcaaggatgctcatccggttcccgagcaccgcttcac	1932
ttttactgacttcttttcttcttcttaccctaaatctttatctcggccacaggggtcagagggtta	2001
catggatgactggagaaatgcatgctggttggacttgggaatggacagcaagcttaattacggcat	2070
tctctgacaagcattcatctgtttgatgtatgaattcaactgtcatttatacgcctcctgtctcgtct	2139
tctttctctctctctctctctctctctctctctcaactctcaactctctctctctctctctctctct	2208
cact	2277
atattacacaaacgcttctccacaatattccatttagttctctctctctctctctctctctctctctct	2346
cagtgagcttgtttaaagtaaagtatccaagagcaacagagagggactcaaggacacttaacacaaaaaa	2415
aaaatgaagcttgaaaacctgtcgggaagatttaggcaacctgaaacaadccctccatgtaccataaaaa	2484
cagaacacactgcgcaatctgatataaattgttaattgtgtaactcttttcattatcagctgttcgaaa	2553
tgcctatacacttgaactgttattgaaaatcagttactggacagggagacttgaaacagtggtgact	2622
ttgaatgcagctctatatgttgaatgtgttaaagacagagaactttgaaaataagttatgaatgttaat	2691
accgctcacttaactctgtcttcaaaccacagctttgcaactatggcagaccaatagaaaagaaatgggt	2760
tgctaaaaaaaatgttgaaaaaactgattttgatatgtttgctaattgcattgtataacttgcattgtt	2829
tccattaaacagttgccttttttaacctctgttagttcgtgtataatacagcacattagcgaaaaatgta	2898
caatatcaaatctatgtatctgttaaaacaataaagggtgcttgccttataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	2967

Fig. 1 A sequência de nucleotídeos do gene da Miostatina em pacu é composta por (2967 pb). As sequências de aminoácidos obtidas são mostradas abaixo das sequências de codificação. O sítio de terminação da tradução é destacado em amarelo e indicado com um asterisco (*). Os nove resíduos de cisteína conservados estão destacados em verde. O suposto local de proteólise é destacado com uma caixa vermelha. O local do sinal de poliadenilação de consenso é marcado em azul claro. A sequência de microsatélites encontrada está sublinhada. Os sítios de ligação de miRNA putativos são marcados com caixas azuis, e os sítios SNP com círculos vermelhos.

Projetando a utilização destas informações em programas de seleção, é necessário verificar o nível de polimorfismo deste marcador e sua associação com características de desempenho em populações bases para seleção.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o polimorfismo de microssatélites no gene da Miostatina em uma população sintética de pacu e verificar a associação do polimorfismo com características de desempenho.

3.1 Objetivos específicos

- Estimar parâmetros populacionais para um marcador microssatélite localizado no gene da Miostatina em uma população sintética de pacus.

- Verificar a associação do polimorfismo de marcador microssatélite no gene da Miostatina com o peso corporal e as medidas morfométricas de uma população sintética de pacus.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Formação das famílias e Obtenção dos Fenótipos

A população utilizada neste trabalho foi constituída de 292 indivíduos pertencentes a 14 famílias formadas por 4 fêmeas e 14 machos, sendo aproximadamente 21 peixes por família.

Essas famílias foram geradas a partir da reprodução artificial conforme protocolo descrito por Criscuolo-Urbinati et al. (2012). Após a reprodução, os embriões foram alocados em incubadoras cônicas de fibra de vidro de 20 litros. Assim que eclodiram, as larvas foram transferidas para caixas d'água de 250 litros, sendo utilizada uma caixa para cada família.

As famílias ficaram acondicionados separadamente nas caixas d'água até os alevinos atingirem um peso médio de 5,0 gramas, quando foram, então, identificados com microchips (Passive Integrated Transponder ou PIT-Tag)

implantados na cavidade abdominal e transferidos para dois tanques escavados de concreto de 220m² (10x22m), na densidade de 1,6 px/m², nas instalações do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP) na cidade de Jaboticabal, SP. Nessa fase, os alevinos foram alimentados com dieta comercial extrusada de acordo com a recomendação do fabricante para as diferentes fases de vida dos animais.

Após a transferência dos animais para os tanques escavados, procedeu-se o teste de crescimento, sendo realizadas três biometrias em diferentes períodos. A primeira ocorreu cerca de 30 dias após a transferência dos animais, que foram pesados (PESO1) e medidos em largura corporal (LC1).

Nessa primeira fase, os animais também foram submetidos a uma coleta de fragmento das nadadeiras posteriores (cerca de 1 cm²) para extração do DNA. Em seguida, o material foi armazenado em álcool absoluto e estocado no Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação (LaGeAC) no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP. Posteriormente o material coletado foi transferido para o Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade Nacional de Rosário da Argentina (UNR), onde foram realizadas as etapas de extração do DNA genômico, amplificação e genotipagem da região alvo do gene da Miostatina.

Na segunda biometria, que ocorreu em torno de 60 dias após a primeira, os animais foram pesados (PESO2) e medidos em largura corporal (LC2) e comprimento padrão (CP2). Na terceira, que ocorreu 150 dias após a segunda, os peixes foram pesados (PESO3) e medidos em largura corporal (LC3).

4.2 Extração e verificação da integridade do DNA Genômico

O DNA genômico do pacu foi extraído utilizando placas de extração de forma simultânea para um grande número de amostras e de acordo com o método descrito por Ivanova (2006). Inicialmente, 5mL de tampão de lise (100mM NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 8,0; 10mM EDTA, pH 8,0; SDS 0,5% (p/v)) que foi misturado com 0,5mL de Proteinase K (20mg/mL) e 50µL da mistura foi separada em cada poço da placa (Nunc, Sigma-Aldrich). Um fragmento de nadadeira caudal foi então adicionado a cada poço, em seguida a placa foi coberta e incubada a 55°C por 16 horas.

Posteriormente, foi centrifugado a 1.500g e 4°C por 15 segundos para reduzir a condensação nas tampas, e foram adicionados a cada amostra 100µL de mistura de ligação (3M de cloreto de guanidínio; 10mM de EDTA, pH 8,0; 5mM de Tris-HCl, pH 6,4; 4% (p/v) Triton X-100; 48% (v/v) etanol). A placa foi coberta com papel autoadesivo, agitada vigorosamente por 15 segundos e centrifugada a 1.000g e 4°C por 20 segundos.

Na etapa seguinte, o lisado (aprox. 150µL) foi transferido da placa de poço profundo para a placa de fibra de vidro (PALL1, Sigma-Aldrich), colocada em uma placa de poço quadrado. A placa foi selada com papel autoadesivo e centrifugada a 2.000g e 4°C por 20 minutos para ligar o DNA à membrana.

A primeira lavagem foi então realizada, adicionando-se 180µL de tampão de lavagem de proteína (1,56 M de cloreto de guanidínio; 5,2 mM de EDTA, pH 8,0; 2,6 mM de Tris-HCl, pH 6,4; Triton X-100 1 0,04% (p/v); Etanol 67 % (v/v)) para cada poço da placa e centrifugado a 2.000g e 4°C por 10 minutos. Para a segunda lavagem, 750 µL de tampão de lavagem (60% Etanol; 50mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,5mM EDTA, pH 8,0) foram adicionados a cada poço, coberto com papel autoadesivo e centrifugado a 2.000g e 4°C por 5 minutos.

A placa foi então descoberta e incubada a 55°C por 30 minutos para evaporar o etanol residual. Por fim, a placa de fibra de vidro foi colocada em uma placa coletora, onde foram adicionados 50 µL de água destilada e incubada em temperatura ambiente por 1 minuto. As placas foram seladas e centrifugadas a 2.000g e 4°C por 20 minutos. A placa coletora foi coberta e armazenada a -20°C.

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, sua concentração foi medida por espectroscopia de absorção UV-Vis (em $\lambda=260\text{nm}/280\text{nm}$) em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA) e a razão de absorbância 260nm/280nm foi medida para verificar sua qualidade.

4.3 Amplificação e Genotipagem da Região Alvo do Gene da Miostatina

Os primers (Fw: 5'GCAAGCTTAAATTACGGCATTTC3' e Rv: 5'GACATTTGTTTGCTTCGATGAC3') projetados por Diaz (2016) foram utilizados para a amplificação da região do microsatélite. O primer Fw foi marcado com fluorescência.

As condições de amplificação por PCR foram realizadas por termocicladores “Verity 96-Well Thermal Cycler” (Applied Biosystems Inc.) e Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, EEUU), utilizando o ciclo térmico geral: desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. A mistura da reação de PCR de 20 µl incluiu 2 µl de solução tampão de PCR 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 0,4 µl do primer (10 µM), 0,2 mM dNTP, 1 U de Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 50 ng DNA e 2,5 mM de MgCl₂.

A genotipagem foi realizada pelo método de sequenciamento semiautomático por meio de eletroforese capilar em equipamento ABI 3500 (Applied Biosystems). Os dados foram analisados usando o software Genemapper (Applied Biosystem), mostrando diferentes alelos que diferiram no comprimento da sequência do microssatélite.

4.4 Análises Populacionais e Estudo de Associação

As frequências alélicas e genóticas, as heterozigosidades observada (**H_o**) e esperada (**H_e**) e a probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (**PHW**) foram estimadas para o marcador microssatélite na população estudada pelo programa HW Quick-check (Kalinowski, 2006). O programa Cervus 3.0.7 (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007) foi utilizado para estimar a frequência de alelos nulos (**An**) e o conteúdo de informação polimórfica (**PIC**).

O programa FSTAT (version 2.2.3; GOUDET, 1995) foi utilizado para calcular coeficiente de endogamia (**F_s**), número de alelos (**A**), estimativas de riqueza alélica (**A_r**) e de diversidade gênica (**h_s**) (NEI, 1987). O software MICRO-CHECKER VAN OOSTERHOUT (2004) foi utilizado para inferir causas de algum desvio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em razão de alelos nulos.

As associações do marcador STR-Miostatina com as características avaliadas foram verificadas por meio de modelos lineares considerando os alelos ou genótipos como tratamentos. Os tanques de crescimento também foram considerados no modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = observação que recebeu o tratamento (i) no tanque (j) na repetição (k);

μ = média geral do experimento;

A_i (Alelo) e/ou G_i (Genótipo) = efeito do tratamento (i);

T_j = efeito do tanque (j=1 e 2);

$e_{(ij)}$ = erro da observação que recebeu o tratamento (i) no tanque (j) na repetição (k).

Para (i) e (j) os tratamentos foram desbalanceados, e os efeitos considerados fixos.

O efeito da idade não foi inserido no modelo porque os animais foram gerados no mesmo período e, portanto, possuem a mesma idade.

Para consistência da base de dados, foram realizadas análises visuais, sendo a função boxcox – codificada como bc () do pacote MASS – utilizada para corrigir problemas de normalidade ao se calcular a verossimilhança perfilhada, que maximiza o parâmetro lambda (Box & Cox, 1964).

O ordenamento dos alelos e genótipos pela média dos pesos e medidas morfométricas dos animais foi conduzido para as características com associação significativa com o polimorfismo do loco STR do gene da Miostatina.

5 RESULTADOS

Os animais das 14 famílias foram avaliados até um peso médio de $711,27 \pm 283,45$ g, com famílias variando com médias de $543,57 \pm 169,18$ g (F13) até $1021,17 \pm 377,77$ g (F5) (Tabela 1).

Tabela 1- Média das características (\pm desvio padrão) e número de indivíduos por família.

MÉDIA DAS CARACTERÍSTICAS POR FAMÍLIA						
Família	PESO1	PESO2	CP2	LC2	PESO3	LC3
F1	12,93 \pm 3,54	37,26 \pm 11,59	10,55 \pm 1,21	3,24 \pm 0,38	708,88 \pm 168,40	26,67 \pm 17,58
F3	16,39 \pm 3,53	40,86 \pm 10,36	11,08 \pm 1,18	3,41 \pm 0,40	718,18 \pm 178,65	18,86 \pm 16,57
F4	12,61 \pm 2,60	57,39 \pm 19,75	12,19 \pm 1,49	3,87 \pm 0,48	749,41 \pm 399,90	18,40 \pm 15,10
F5	17,28 \pm 7,76	52,57 \pm 20,12	11,83 \pm 1,62	3,75 \pm 0,54	1021,17 \pm 377,77	19,57 \pm 17,81
F6	20,86 \pm 8,04	33,68 \pm 14,85	10,09 \pm 1,65	3,13 \pm 0,46	831,25 \pm 229,08	19,40 \pm 17,79

F7	16,17±7,71	42,41±13,39	11,05±1,19	3,60±0,46	905,45±514,24	12,32±12,37
F8	18,44±7,18	56,10±22,45	12,15±1,78	3,94±0,50	853,00±231,13	14,09±15,25
F9	15,96±5,83	29,30±13,18	9,58±1,45	3,22±0,41	553,33±169,60	18,22±16,27
F10	17,87±5,41	38,54±19,80	10,40±1,76	3,33±0,54	646,92±211,08	21,84±17,43
F11	17,90±6,97	28,35±8,26	9,53±1,16	2,97±0,35	593,33±279,94	18,87±17,46
F12	15,20±7,32	34,17±16,60	10,07±1,57	3,19±0,44	655,45±198,41	21,99±17,02
F13	13,66±2,51	38,15±9,32	10,56±0,81	3,36±0,21	543,57±169,18	14,59±15,14
F14	15,86±3,90	24,06±5,58	8,87±0,78	2,88±0,15	596,66±246,95	14,78±16,53
F15	16,91±5,69	33,91±9,80	10,09±1,09	3,28±0,34	581,11±173,59	20,58±15,65

Média Geral	16,29	39,05	10,57	3,37	711,27	18,58
-------------	-------	-------	-------	------	--------	-------

NÚMERO DE INDIVÍDUOS MENSURADOS PARA CADA CARACTERÍSTICA

Família	PESO1	PESO2	CP2	LC2	PESO3	LC3
F1	9	15	15	15	9	9
F3	11	16	16	16	11	11
F4	17	17	17	17	17	17
F5	20	22	22	22	17	17
F6	17	17	17	17	16	16
F7	16	16	16	16	11	11
F8	14	16	16	16	10	10
F9	16	18	18	18	15	15
F10	14	22	22	22	13	13
F11	13	14	14	14	12	12
F12	12	17	17	17	11	11
F13	15	18	18	18	14	14
F14	7	7	7	7	6	6
F15	10	17	17	17	9	9
Total de indivíduos	191	232	232	232	171	171

Comprimento Padrão (CP) e Largura Corporal (LC).

Na população avaliada, foi atribuído um total de 8 alelos com um polimorfismo médio (PIC) de 0,81 e uma diversidade gênica (h_s) de 0,84. A frequência média de alelos nulos foi de -0,00834. Os índices de heterozigidade observado ($H_o = 0,84$) e esperado ($H_e = 0,84$) foram próximos para a população, indicando um alto grau de polimorfismo.

A população de pacus não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, em contrapartida também não apresentou uma média alta (-0,00967) no índice de endogamia (F_{is}), o que pode ser atribuído ao alto número de indivíduos

heterozigóticos. Erros de genotipagem foram descartados devido aos baixos índices de alelos nulos na população.

Dos 8 alelos identificados (208, 210, 220, 222, 224, 226, 230 e 232), os de maior frequência foram 208 (0,22), 210 (0,20), 226 (0,20), 222 (0,12), 232 (0,12) e 230 (0,09), que, somados, representam 95% da população e refletem em sua maioria na frequência genotípica como observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequências alélicas e genotípicas das variáveis PESO1, PESO2, PESO3, CP2, LC2 e LC3 do STR-Miostatina para a espécie pacu.

Frequência Alélica							
Alelo	PESO1	PESO2	PESO3	CP2	LC2	LC3	Média
208	0,20	0,23	0,21	0,23	0,23	0,20	0,22
210	0,19	0,21	0,19	0,21	0,21	0,19	0,20
220	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
222	0,13	0,12	0,11	0,12	0,12	0,11	0,12
224	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02
226	0,21	0,19	0,22	0,19	0,19	0,22	0,20
230	0,09	0,08	0,10	0,08	0,08	0,10	0,09
232	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Frequência Genotípica							
Genótipo	PESO1	PESO2	PESO3	CP2	LC2	LC3	Média
208/208	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,03
210/210	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
222/222	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
226/226	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10
208/210	0,16	0,18	0,15	0,18	0,18	0,15	0,17
208/220	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
208/222	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02
208/226	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
208/230	0,04	0,00	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
208/232	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
210/220	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02
210/222	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07
210/230	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
210/232	0,11	0,12	0,11	0,12	0,12	0,11	0,11
220/230	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
220/232	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
222/226	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06
222/230	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
222/232	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
224/226	0,04	0,02	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03

226/230	0,06	0,05	0,07	0,05	0,05	0,07	0,06
230/232	0,04	0,02	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03

Comprimento Padrão (CP) e Largura Corporal (LC).

Foram identificadas 22 combinações de genótipos diferentes na população, sendo 208/210 (0,17), 210/232 (0,11), 226/226 (0,10), 208/226 (0,08), 210/222 (0,07), 222/226 (0,06), 226/230 (0,06) e 208/232 (0,05) os genótipos mais frequentes. Para as demais frequências, os valores não passaram de 0,04 (Tabela 2).

Os modelos lineares apontaram associação significativa entre os alelos do STR-Miostatina e todas as características avaliadas. Considerando os genótipos da população, não foi observada associação significativa com o PESO 1 (Tabela 3).

Tabela 3 - Estatísticas Fc (F calculado) e valores de probabilidades (p) de associação entre os polimorfismos alélicos e genotípicos de marcadores microssatélites do gene da Miostatina com variáveis de desempenho de uma população sintética de pacu *P. mesopotamicus*.

Variáveis	Alelos		Genótipos		C.V (%)
	Fc	p	Fc	p	
PESO1	2,18	0,03*	1,19	0,26 ^{ns}	36,18
PESO2	2,51	0,005**	4,02	0,000***	11,42
PESO3	2,04	0,02*	1,75	0,02*	10,52
CP2	2,81	0,005**	4,19	0,000***	5,77
LC2	3,39	0,0009***	4,17	0,000***	8,17
LC3	3,22	0,000***	6,52	0,000***	0

***p<0,0001 **p<0,01; *p<0,05; NS= não significativo. Comprimento Padrão (CP) e Largura Corporal (LC).

As análises realizadas para PESO1 e LC3 indicaram violações às pré-suposições do modelo, mesmo após as transformações Box-Cox — geralmente, este tipo de análise é utilizada para ajustar variância heteroscedástica e/ou não normalidade residual. Quando se realiza a transformação de dados Box-Cox, estabiliza-se a variância, deixando os dados o mais próximo da distribuição normal e, dessa forma, mais confiáveis. (Box, 1964 e Velasco 2017).

Dessa forma, mesmo apresentando associações significativas com o polimorfismo alélico e genotípico, optamos por não realizar inferências sobre estas características já que os resultados são pouco precisos.

Foi realizado o ordenamento dos alelos e genótipos pela média dos pesos e das medidas morfométricas dos animais. Os alelos que se destacaram com efeitos positivos sobre as características avaliadas foram: 222, 226 e 230, e os alelos de efeitos negativos foram: 208, 224 e 232 (Tabela 4).

Com relação aos genótipos, para PESO2, os de efeitos positivos foram: 222/222, 226/230, 226/226, 210/220 e 210/222. E os de efeitos negativos foram: 208/226, 208/232, 220/232, 210/210 e 230/232. Para PESO3, os genótipos de efeitos positivos foram: 226/226, 222/222, 220/230, 210/222 e 226/230. E os de efeitos negativos foram: 208/222, 208/230, 208/208, 222/232 e 220/232. Para CP2, os de efeitos positivos foram: 222/222, 226/230, 226/226, 210/220 e 210/222. E os de efeitos negativos foram: 220/232 208/226, 208/232, 210/210 e 230/232. Com relação ao LC2, os de efeitos positivos foram: 222/222, 226/230, 226/226, 210/222 e 208/222. E os de efeitos negativos foram: 208/230, 208/232, 210/210, 224/226 e 230/232, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 4 - Médias do peso (g) e das medidas morfométricas e ordenamento () dos alelos do marcador *STR-Miostatina* para uma população sintética de pacu *P. mesopotamicus*.

Alelos	MÉDIAS DO PESO E DAS MEDIDAS MORFOMÉTRICAS			
	PESO2	PESO3	CP2	LC2
208	35,99 (6)	711,69 (4)	10,32 (6)	3,29 (5)
210	39,57 (4)	725,00 (3)	10,73 (4)	3,41 (4)
220	36,92 (5)	624,00 (7)	10,53 (5)	3,28 (6)
222	43,53 (2)	668,33 (6)	11,03 (1)	3,58 (1)
224	32,57 (8)	778,57 (2)	9,92 (8)	3,03 (8)
226	44,20 (1)	815,59 (1)	11,01 (2)	3,51 (2)
230	41,59 (3)	687,57 (5)	10,81 (3)	3,41 (3)
232	33,43 (7)	587,07 (8)	9,96 (7)	3,20 (7)

Comprimento Padrão (CP) e Largura Corporal (LC).

Tabela 5 - Médias do peso (g) e das medidas morfométricas e ordenamento () dos genótipos do marcador *STR-Miostatina* para uma população sintética de pacu *P. mesopotamicus*.

GENÓTIPO	MÉDIAS DO PESO E DAS MEDIDAS MORFOMÉTRICAS			
	PESO2	PESO3	CP2	LC2
208/208	36,50(12)	543,33(20)	10,32(12)	3,14(16)
210/210	28,95(21)	720(11)	9,48(21)	3,05(20)
222/222	67,59(1)	856,66(2)	12,75(1)	4,07(1)
226/226	52,57(3)	1023,12(1)	11,83(3)	3,75(3)
208/210	40,22(7)	785,76(7)	10,78(9)	3,45(9)
208/220	33,60(14)	645(13)	10,03(14)	3,21(13)
208/222	38,31(10)	580(18)	10,46(10)	3,54(5)
208/226	31,03(18)	787,69(6)	9,76(19)	3,14(17)
208/230	31,70(17)	567,14(19)	9,81(17)	3,08(18)
208/232	30,92(19)	666,25(12)	9,70(20)	3,08(19)
210/220	46,36(4)	750(9)	11,61(4)	3,46(8)
210/222	44,84(5)	801,81(4)	11,31(5)	3,62(4)
210/230	39,94(8)	723,33(10)	11,18(6)	3,41(10)
210/232	34,82(13)	583,16(17)	10,13(13)	3,26(12)
220/230	31,91(16)	810,00(3)	9,89(16)	3,16(15)
220/232	29,59(20)	472,50(22)	9,80(18)	3,18(14)
222/226	36,65(11)	594,54(16)	10,38(11)	3,40(11)
222/230	38,85(9)	605(15)	11,07(7)	3,51(7)
222/232	44,00(6)	492,50(21)	10,96(8)	3,53 (6)
224/226	32,57(15)	778,57(8)	9,92(15)	3,03(21)
226/230	62,52(2)	793,33(5)	12,63(2)	4,00(2)
230/232	23,06(22)	633,33(14)	8,63(22)	2,82(22)

Comprimento Padrão (CP) e Largura Corporal (LC).

As correlações entre os ordenamentos dos alelos das variáveis analisadas são apresentadas na Tabela 6. As correlações foram altas entre as características medidas na segunda biometria, PESO2 e CP2 (0,98), entre PESO2 e LC2 (0,95) e entre CP2 e LC2 (0,98), porém essas características da segunda biometria demonstraram baixa correlação com a análise da terceira biometria, PESO3 e PESO2 (0,21), PESO3 e CP2 (0,095), PESO3 e LC2 (0,17), então sugere-se que os alelos podem não ser constantes na sua funcionalidade ou expressão em determinada característica de acordo com diferentes fases da vida de um indivíduo.

Tabela 6 – Correlação de Pearson entre os ordenamentos dos alelos para as características PESO2, PESO3, CP2 e LC2 (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre as características.

	PESO2	PESO3	CP2	LC2
PESO2	1	NS	***	***

PESO3	0,21	1	NS	NS
CP2	0,98	0,095	1	***
LC2	0,95	0,17	0,98	1

***p<0,0001 **p<0,01; *p<0,05; NS= não significativo

As correlações entre o ordenamento dos genótipos para as variáveis analisadas são apresentadas na Tabela 7. As correlações foram altas entre as características medidas na segunda biometria, PESO2 e CP2 (0,99), entre PESO2 e LC2 (0,92) e entre CP2 e LC2 (0,92), porém essas características da segunda biometria demonstraram baixa correlação com a análise da terceira biometria, PESO2 e PESO3 (0,40), PESO3 e CP2 (0,38), e PESO3 e LC2 (0,30).

Sugere-se que neste caso os genótipos podem não ser constantes na sua funcionalidade ou expressão em determinada característica de acordo com diferentes fases da vida de um indivíduo. No geral as análises realizadas entre o ordenamento dos alelos e genótipos evidenciaram diferença entre a segunda e a terceira biometria.

Tabela 7 - Correlação de Pearson entre os ordenamentos dos genótipos para as características PESO2, PESO3, CP2 e LC2 (abaixo da diagonal) e nível de significância (acima da diagonal) entre as características.

	PESO2	PESO3	CP2	LC2
PESO2	1	*	***	***
PESO3	0,40	1	*	NS
CP2	0,99	0,38	1	***
LC2	0,92	0,30	0,92	1

***p<0,0001 **p<0,01; *p<0,05; NS= não significativo

6 DISCUSSÃO

Os parâmetros populacionais são importantes para o presente estudo, pois possibilitam verificar a distribuição alélica e genotípica da população bem como a apuração da existência de possíveis fenômenos relacionados à estrutura genética das famílias. Conforme as estimativas, pode-se afirmar que a população avaliada possui uma estrutura genética propícia para estudos de associação, pois apresenta um bom nível de diversidade gênica e um valor de heterozigidade bastante alto.

Em um estudo conduzido por Diaz (2016), utilizando-se microssatélites do gene da Miostatina em pacus, verificou-se um total de oito alelos, uma heterozigosidade de H_o 0,88 e H_e 0,75, e um valor de F_{is} -0,0874. Neste estudo, os autores também afirmam que os parâmetros populacionais demonstram uma boa diversidade genética para o marcador do gene da Miostatina na população estudada.

Os modelos estatísticos utilizados apontaram associação significativa entre o STR–Miostatina e a maioria das características analisadas. O modelo em questão foi similar ao utilizado por Dias et al. (2019) e Jaser et al. (2017), que observaram associação significativa entre marcadores (STR e SNP) na região promotora do gene do GH e características de desempenho de tilápias.

A presença de polimorfismos no gene da Miostatina e sua associação com características de desempenho já foram verificadas em estudos envolvendo diferentes espécies terrestres, como equinos, ovinos, suínos e aves.

Em estudos com suínos (Guimaraes et al., 2007), identificaram-se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região promotora do gene da Miostatina. A determinação da expressão gênica foi obtida por PCR semiquantitativa em tempo real. Neste estudo, foram encontradas associações com características de crescimento e qualidade da carne em duas populações comerciais.

Em pesquisas realizadas com ovinos, De Azevedo (2017) buscou identificar polimorfismos no gene da Miostatina e verificar o efeito sobre as características de carcaça. Como resultado, encontraram-se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região 3'UTR do gene da Miostatina, por meio da técnica PCR semiquantitativa (PCR-RFLP) e associações estatísticas com peso carcaça fria (PCF), espessura de gordura de cobertura (EGC) e rendimento de carcaça quente (RCQ).

Com um estudo similar também com ovinos, Sahu et al. (2017), identificaram um marcador SNP na região do éxon 3 do gene da Miostatina, que foi confirmado por sequenciamento. Concluiu-se que houve associação significativa com o peso corporal.

Analisando equinos (Dall'olio et al., 2012), identificaram-se polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região promotora do gene da Miostatina e no primeiro intron. A metodologia utilizada foi PCR semiquantitativa, na qual os autores encontraram associações estatísticas para características morfológicas. Os resultados indicaram que os polimorfismos estão associados a características de interesse como, por exemplo, circunferência do osso do canhão, pernas e teor de músculo.

Estudando aves de corte, Bhattacharya et al. (2013) identificaram polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região codificadora do gene da Miostatina por meio da técnica (PCR-RFLP). Concluiu-se que o gene da Miostatina foi polimórfico e teve associação significativa nas características de crescimento em frangos de corte.

Também foram verificadas a associação e a presença de polimorfismos no gene da Miostatina com características de desempenho em moluscos bivalves (ostras, mexilhões e vieiras) e em crustáceos (camarão).

Em um estudo com mexilhões, a partir de uma sequência para o gene da Miostatina de 3.528 pares de bases (pb) – 161 pb de 5' UTR, 2.110 pb de 3' UTR – , utilizando-se marcadores SNP e técnica de amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE), foram detectados 28 SNPs na região não codificante 3' UTR e 9 SNPs na região de codificação (Núñez-acuña et al., 2014).

Nesse estudo, não foi testada a associação com características de desempenho, porém os autores sugeriram que os resultados obtidos são propícios a este tipo de estudo.

Em estudos envolvendo vieiras, (Fan et al, (2017) identificaram seis marcadores SNPs na região promotora do gene da Miostatina. A análise de associação demonstrou efeitos significativos na massa corporal, massa de tecidos moles e massa muscular adutora. Os autores concluem que esses resultados podem ser usados para embasar outros estudos com o gene.

Estudando camarões, Wang et al, (2021), identificaram 17 SNPs que apresentavam polimorfismo alélico, sendo seis loci SNP na região do intron e 11 loci SNP na região do éxon. A análise de associação revelou que dois loci SNP –

um g. *Mstn220* (localizado no intron) e um g. *Mstn567* (localizado no éxon 2) – foram associados ao peso e comprimento corporal.

Em relação aos peixes, foram encontradas associações significativas entre marcadores do gene da Miostatina e o desempenho nas espécies *Verasper variegatus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar*, *Aristichthys nobilis* e *Takifugu rubripes*.

Estudando-se *Verasper variegatus* (Li et al., 2012), identificaram-se na sequência genômica de 3078 pb três éxons, dois introns e uma sequência promotora. Uma avaliação primária da variabilidade da sequência revelou que existiam cinco polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região promotora. Foi também identificada uma forte associação com características de crescimento (comprimento corporal, profundidade corporal e massa total).

Em pesquisas relacionadas a carpas, (*Aristichthys nobilis*) utilizando-se como referência a sequência do gene da MSTN de 3.769 pb, que consistia em três éxons e dois introns, identificaram-se dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs); um no intron 2 e outro na região 3' UTR. A análise de associação mostrou que os marcadores foram significativamente associados ao comprimento total, comprimento corporal e peso corporal (Liu et al., 2012).

Analisando salmões (*Salmo salar*), Peñazola et al. (2013) identificaram marcadores SNPs na região flanqueadora 5' do gene da miostatina, sendo que um deles (g.1086C > T) teve associação significativa com as características Peso (kg), Peso Eviscerado (kg), Peso Decapitado (kg) e Peso do Filé (kg). Os autores ainda discutem que, embora o SNP explique uma pequena porcentagem da variância, os resultados indicam que uma variação na região flanqueadora 5' do gene da Miostatina está associada à regulação genética do crescimento em salmão do Atlântico.

Estudando-se baiacus (*Takifugu rubripes*), Wang et al. (2014) identificou dois SNPs, sendo um na região do éxon 2 e outro no intron 2 do gene da Miostatina. A determinação da expressão gênica foi obtida por (PCR-SSCP), e a análise de associação com características de crescimento foi significativa para as massas corporais, comprimento e altura corporal.

Estudando trutas (*Oncorhynchus mykiss*), Nazari et al. (2016) identificaram polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas regiões do intron 1 e 2 do gene da Miostatina. O método utilizado para a realização da genotipagem foi PCR (PCR-SSCP). Apenas um dos SNPs (*g.1904C > A*) apresentou associação com o comprimento e com o peso corporal aos 90 e 150 dias de idade.

No presente estudo, foi verificada a presença do polimorfismo na extremidade 3' UTR do éxon 3 do gene da Miostatina. Em um trabalho realizado em ovelhas, foi descrita uma mutação no gene da Miostatina, o qual gerou alterações na sequência da região 3'UTR do gene, produzindo mudanças no sítio de ligação no miRNA (miRNA-1 e miRNA206) e levando ao crescimento exagerado da musculatura (Clopp et al. 2006). Posteriormente, estudos de polimorfismos genéticos confirmaram alterações no sítio de ligação para miRNA (Zhou et al. 2010).

A ação da Miostatina é regulada por vários miRNAs, como miR-208a, miR-27b, miR-499, miR-1 e miR-206 (Clopp et al., 2006; Callis et al., 2009; Allen e Loh, 2011; Zhang et al., 2012; Huang et al., 2012; Yang et al., 2014). Os miRNAs são pequenas moléculas (19-23pb) que regulam a expressão gênica por meio de sua ligação aos mRNAs (Kosik 2010; Diaz, 2016). Fazem parte de uma classe de RNAs não codificantes, que estão envolvidos no silenciamento de genes pós-transcricionais (Ge et al., 2020), pois normalmente inibem a tradução ou promovem a degradação dos mRNAs ligando-se a 3'UTR ou CDS (coding DNA sequence) que os regula (Bartel, 2004; Hausser et al., 2013; Ge et al., 2020).

Os miRNAs que são especificamente expressos no músculo são chamados de myomiRs (Sweetman et al., 2008; Rooij et al., 2009; Soares, 2011; Ge et al., 2020) e incluem miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208a, miR-208b, miR-486 e miR-499 (McCarthy et al., 2008; Soares, 2011; Ma et al., 2015; Horak et al., 2016). A alta expressão de miR-1/206 no músculo inibe o nível de transcrição da Miostatina, contribuindo para a hipertrofia muscular (Clopp et al., 2006).

Tais myomiRs estão envolvidos em diversos processos da fisiologia muscular, incluindo a miogênese e o estabelecimento do tipo de fibra e regeneração muscular (Soares, 2011). Além disso, a desregulação da expressão de miRNAs

está associada a doenças musculares (Yuasa et al., 2008; Liu et al., 2012; Zacharewicz et al., 2013).

As mutações nas regiões 3'UTR ocorrem quando os miRNAs exercem a função de regular a expressão gênica por meio de ligação aos RNAs mensageiros mRNAs (Diaz, 2016). Este evento de ligação resulta na inibição da tradução e diferenciação de células musculares (Clou et al. 2006; Chen et al. 2015; Townley-Tilson et al. 2010; Lim et al. 2010; Guo et al. 2010) e desestabilização de mRNA (Giraldez et al. 2010).

Neste trabalho, a associação entre os polimorfismos alélicos e genotípicos de marcadores microssatélites do gene da Miostatina demonstraram um efeito significativo, no entanto, mesmo que a associação tenha sido comprovada, é necessário hipotetizar quais processos biológicos podem explicar essa associação.

Em seus estudos De Azevedo (2017) sugere que alterações no marcador encontrado gera um sítio de ligação para miRNAs, como, por exemplo, os miR-1 e miR-206, que são altamente expressos nos músculos esqueléticos. Bartel (2004) afirma que o surgimento de alterações no comprimento do marcador pode influenciar de forma negativa ou positiva a ligação dos miRNAs, pois pode desencadear uma inibição na expressão do gene reprimindo a tradução do RNA alvo.

Na prática, isso foi observado para os alelos de melhor efeito nas faixas de amplitude de 210pb, 222pb, 226pb e 230pb. Conforme essa faixa se aproximava das extremidades, os efeitos negativos ficavam mais evidentes para 208pb e 232pb. Apesar dessa constatação, os alelos com efeitos positivos tendem a inibir os alelos com efeitos negativos quando associados.

De maneira geral, os genótipos de melhor efeito foram: 222/222, 226/230 e 226/226. Nesses casos, percebe-se uma influência dos alelos 222 e 226, que inibiram o alelo 230 - que está mais próximo da extremidade. Para os genótipos de efeitos negativos, observou-se uma queda no ordenamento daqueles que continham os alelos 208 e 232 que contribuem negativamente para os genótipos 230/232, 220/232 e 208/232.

Alguns genótipos que não apresentavam alelos com efeito negativo (208pb e 232pb), como, por exemplo, os 210/210 e 224/226, posicionaram-se de forma

ruim no ordenamento. Isso não era esperado, porém tal fato pode estar associado a um efeito ambiental residual negativo sobre os animais com esse genótipo, como o período em que os peixes ficaram estocados nas caixas d'água antes de serem identificados e transferidos para os tanques de avaliação.

As correlações entre o ordenamento dos alelos e genótipos evidenciaram diferença entre a segunda e a terceira biometria. Pode-se entender esse resultado de duas formas: os alelos podem não ser constantes na sua funcionalidade ou expressão em determinada característica para as diferentes fases da vida de um indivíduo, ou, no momento da segunda biometria, ainda existia um efeito residual do período em que as famílias permaneceram nas caixas de alevinagem.

Estudos de associação genética têm como objetivo identificar loci gênicos que contenham envolvimento com características de interesse. Uma vez provada e explicada a associação das características avaliadas, o passo seguinte é verificar a possibilidade de se utilizar essas informações em programas de melhoramento genético.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi constatado, na população estudada, polimorfismo do marcador microssatélite nas extremidades 3'UTR do gene da Miostatina, e esse polimorfismo está associado com o peso corporal e com as medidas morfométricas dos animais avaliados.

As alterações nas conformações do gene da Miostatina resultam em efeitos positivos e/ou negativos, onde se observou que os alelos nas faixas de 210pb, 222pb, 226pb e 230pb apresentam um efeito positivo, mesmo quando associados com alelos de efeito negativo – conforme essa faixa de amplitude aproxima-se das extremidades 208pb e 232pb, os alelos resultam em efeitos negativos.

Os resultados gerados neste trabalho são de grande importância, pois podem colaborar para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de uma espécie nativa promissora, o pacu *P.mesopotamicus*. As informações moleculares produzidas podem ser incorporadas em modelos de predição genética, o que implica em estimativas mais acuradas e, conseqüentemente, maiores ganhos genéticos por seleção.

8 REFÊRENCIAS

- ALLEN DL and LOH AS 2011. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 300, C124–C137.
- ALVES, A. L. et al. Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.
- ALVES, L. A.; Varela, E. S.; Moro, G. V.; Kirschnik, L. N. G. Riscos genéticos da produção de híbridos de peixes nativos. Palmas: **Embrapa Pesca e Aquicultura**, 2014. 60 p. (EMBRAPA Pesca e Aquicultura. Documentos, 03).
- AL-TOBASEI, Rafet et al. Genomic predictions for fillet yield and firmness in rainbow trout using reduced-density SNP panels. **BMC genomics**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2021.
- BAGGIO, Rafael A. et al. Hybrids between *Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) previously reported in the Upper Paraná River are likely escapes from aquaculture farms: evidence from microsatellite markers. **Zoologia (Curitiba)**, v. 33, n. 2, 2016.
- BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. Analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society*, v. 26, n.2, p.211-252, 1964.
- BURSET M, Seledtsov IA and Solovyev VV. (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4364–4375.
- BHATTACHARYA, T. K.; CHATTERJEE, R. N. Polymorphism of the myostatin gene and its association with growth traits in chicken. **Poultry Science**, v. 92, n. 4, p. 910-915, 2013.
- CALLIS TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH and Wang DZ 2009. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *Journal of Clinical Investigation* 119, 2772–2786.

CAMPOS, E. C. et al. Genetic parameters and response to selection for growth in tambaqui. **animal**, v. 14, n. 9, p. 1777-1785, 2020.

COSTA, Adriano Carvalho et al. Similarity between *Piaractus mesopotamicus*, *Colossoma macropomum* and their interspecific hybrids. **Aquaculture**, v. 526, p. 735397, 2020.

CHEN W, Ma X, Shen Y, Mao Y and He S. (2015). The fish diversity in the upper reaches of the Salween River, Nujiang River, revealed by DNA barcoding. *Scientific Reports* 5, Article number: 17437. doi:10.1038/srep17437.

CHIU, L. S. When a Gene Makes You Smell Like a Fish. 2006.

CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H.; PIROTTIN, D.; TORDOIR, X.; BIBÉ, B.; BOUIX, J.; CAIMENT, F.; ELSEN, J.M.; EYCHENNE, F.; LARZUL, C.; LAVILLE, E.; MEISH, F.; MILENKOVIC, D.; TOBIN, J.; CHARLIER, C.; GEORGES, M. Mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature genetics*, v.38, p.813-818, 2006.

CRISCUOLO – URBINATI, E., Kuradomi, R. Y., Urbinati, E. C., Batlouni, S. R. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology**, 78, 2087 – 2094.

DALL’OLIO, S. et al. Association of myostatin (MSTN) gene polymorphisms with morphological traits in the Italian Heavy Draft Horse breed. **Livestock Science**, v. 160, p. 29-36, 2014.

DA SILVA, G. F. et al. Programas de melhoramento genético na piscicultura. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Documentos (INFOTECA-E)**, 2018.

DE AZEVEDO, Amanda Silva. ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES DA MIOSTATINA E DA LEPTINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS DE CARÇA DE ANIMAIS SANTA INÊS E CRUZADOS COM DORPER.

DE-SANTIS, Christian; JERRY, Dean R. Candidate growth genes in finfish—Where should we be looking? **Aquaculture**, v. 272, n. 1-4, p. 22-38, 2007.

DEL PAZO, Felipe et al. Genetic diversity and structure of the commercially important native fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*) from cultured and wild fish populations: relevance for broodstock management. **Aquaculture International**, v. 29, n. 1, p. 289-305, 2021.

DIAS, MARCO AURÉLIO DESSIMONI. **Caracterização genética do gene do hormônio do crescimento em variedades de tilápia utilizando marcadores microssatélites**. 2014. Tese de Doutorado. Tese (D. Sc.). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DIAS, Marco Aurélio Dessimoni et al. Growth hormone gene polymorphism associated with grow-out performance of *Oreochromis niloticus* strains. **Aquaculture**, v. 503, p. 105-110, 2019.

DIAZ, JUAN. “**Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio y aprovechamiento sustentable de los recursos genéticos de peces de agua dulce**”. 2016. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Nacional do Rosário, Rosario, 2016.

FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome.

FAN, Sigang et al. Molecular characterization and expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in Noble scallop (*Chlamys nobilis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 212, p. 24-31, 2017.

FUKUAN Du, Gangchun Xu, Zhijuan Nie, Pao Xu, Ruobo Gu, **molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in *Coilia nasus***, *Gene*, 10.1016/j.gene.2014.03.016, **543**, 1, (153-160), (2014).

FREITAS, Milena V. et al. Genotype by environment interaction and genetic parameters for growth traits in the Neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 530, p. 735933, 2021.

GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. de. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 16, n. 1, p. 47-50, jan./jun. 2013.

GE, Luxing et al. Mutation in myostatin 3' UTR promotes C2C12 myoblast proliferation and differentiation by blocking the translation of MSTN. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 634-643, 2020.

- GIRALDEZ AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ and Schier AF. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*; 312:75–79.
- GONÇALVES, F.H.A.S. 2017. **Sustentabilidade dos sistemas de produção do lambari-do-rabo-amarelo**. Tese (Doutor em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista Centro de Aquicultura de Jaboticabal (CAUNESP). p.149.
- GOUDET, JFSTAT. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of heredity**, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.
- GUIMARAES, Simone EF et al. Myostatin promoter analysis and expression pattern in pigs. **Livestock Science**, v. 112, n. 1-2, p. 143-150, 2007.
- GUO H, Ingolia NT, Weissman JS and Bartel DP. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466:835–840.
- GJEDREM, Trygve. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: a personal opinion review. **Aquaculture**, v. 344, p. 12-22, 2012.
- GREGORY, D. J.; WALDBIESER, G. C.; BOSWORTH, B. G. Cloning and characterization of myogenic regulatory genes in three Ictalurid species. **Animal genetics**, v. 35, n. 6, p. 425-430, 2004.
- HASHIMOTO, Diogo Teruo et al. Marcadores de DNA no monitoramento de híbridos interespecíficos de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, p. 48-53, 2011.
- HAUSSER, A.P. Syed, B. Bilen, M. Zayolani Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation *Genome Res.*, 23 (2013), pp. 604-615.
- HORAK, J. Novak, J. Bienertova-Vasku Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development *Dev. Biol.*, 410 (2016), pp. 1-13.
- HUANG ZQ, Chen XL, Yu B, He J and Chen DW 2012. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423, 265–269.
- IVANOVA, Natália V.; DEWAARD, Jeremy R.; HEBERT, Paulo DN. Um protocolo barato e fácil de automatizar para recuperar DNA de alta qualidade. **Notas de ecologia molecular**, v. 6, n. 4, pág. 998-1002, 2006.

- JASER, Suhaila Karim Khalil et al. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone gene of *Oreochromis niloticus* and their association with growth performance. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 12, p. 5835-5845, 2017.
- JI, S.Q., LOSINSKI, R.L., CORNELIUS, S.G., FRANK, G.L., WILLIS, G.M., GERRARD, D.E., DEPREUX, F.F.S., SPURLOCK, M.E. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 44, 1265-1273. 1998.
- KALINOWSKI, Steven T. hw-quickcheck: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy–Weinberg expectations. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 974-979, 2006.
- KALINOWSKI, Steven T.; TAPER, Mark L.; MARSHALL, Tristan C. Revisar como o programa de computador CERVUS acomoda o erro de genotipagem aumenta o sucesso na atribuição de paternidade. **Ecologia molecular**, v. 16, n. 5, pág. 1099-1106, 2007.
- KERR T, Roalson EH, Rodgers BD. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evol Dev* 7: 390–400, 2005.
- KOGANTI, Prasanthi; YAO, Jianbo; CLEVELAND, Beth M. Molecular mechanisms regulating muscle plasticity in fish. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 61, 2020.
- KOSIK KS. (2010). MicroRNAs and cellular phenotypy. *Cell*; 143:21–26.
- LANDE, R. Thompson R. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits *Genetics*, 124 (1990), pp. 743-756
- LANGLEY B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin Inhibits myoblast differentiation by down-regulating myoD expression. **J Biol Chem.** 2002, 277(51): 49831-40.
- LEE, Sang Beum et al. Myostatin inhibitory region of fish (*Paralichthys olivaceus*) myostatin-1 propeptide. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 194, p. 65-70, 2016.
- LI, Shengjie et al. Transcriptome assembly and identification of genes and SNPs associated with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Genetica**, v. 145, n. 2, p. 175-187, 2017.

LI et al., 2012 H. Li, J. Fan, S. Liu, Q. Yang, G. Mu, C. He Characterization of a myostatin gene (MSTN-1) from spotted halibut (*Verasper variegatus*) and association between its promoter polymorphism and individual growth performance *Comp. Biochem. Physiol. B*, 161 (2012), pp. 315-322.

LIM E, Wu D, Pal B, Bouras T, Asselin-Labat ML, Vaillant F & Visvader JE (2010). Research article Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways.

LIU et al., 2012 L. Liu, X. Yu, J. Tong Molecular characterization of myostatin (MSTN) gene and association analysis with growth traits in the bighead carp (*Aristichthys nobilis*) *Mol. Biol. Rep.*, 39 (2012), pp. 9211-9221.

LIU N., Williams A. H., Maxeiner J. M., Bezprozvannaya S., Shelton J. M., Richardson J. A., et al. (2012). microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 2054–2065 10.1172/JCI62656.

LIU, L. et al. Molecular characterization of the myosatin gene and the effect of fasting on its expression in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*). **Genet. Mol. Res.**, v. 15, 2016.

LOU, Zhengjia et al. MiR-2014-5p and miR-1231-5p regulate muscle growth of *Larimichthys crocea* by targeting MSTN gene. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 252, p. 110535, 2021.

MACCATROZZO, L. et al. Characterization of the myostatin gene and a linked microsatellite marker in shi drum (*Umbrina cirrosa*, Sciaenidae). **Aquaculture**, v. 205, n. 1-2, p. 49-60, 2002.

MANCEAU, M.; GROS, J.; SAVAGE, K.; THOMÉ, V.; MCPHERRON, A.; PATERSON, B.; MARCELLE, C. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. **Genes & Development**, v. 22, p. 668-681, 2008.

MASTROCHIRICO-FILHO, Vito Antonio et al. Assessing genetic diversity for a pre-breeding program in *Piaractus mesopotamicus* by SNPs and SSRs. **Genes**, v. 10, n. 9, p. 668, 2019.

- MELO, D. C. et al. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 220-224, out./dez. 2008.
- MORENO, L. T. A NOVA AQUICULTURA BRASILEIRA: MAIS UMA FRENTE DE EXPANSÃO DO AGROHIDRONEGÓCIO. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 7, p. 102-120, 2018.
- MCCARTHY MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR BBA-Gene Regul Mech, 1779 (2008), pp. 682-691.
- MCPHERRON, A. C.; Lee, S.J. 1997. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, 12457-12461.
- NAZARI, Sajad et al. Association between myostatin gene (MSTN-1) polymorphism and growth traits in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Agri Gene**, v. 1, p. 109-115, 2016.
- NEI, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- NÚÑEZ-ACUÑA, Gustavo; GALLARDO-ESCÁRATE, Cristian. The myostatin gene of *Mytilus chilensis* evidences a high level of polymorphism and ubiquitous transcript expression. **Gene**, v. 536, n. 1, p. 207-212, 2014.
- O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in Fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, n. 3, p. 331-363, Sept. 1997.
- OLIVEIRA, M. Produção da pecuária municipal 2018. **Catalog of the Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, v. 84, n. 01014234, p. 1-8, 2019.
- ONG, Jasmine LY et al. Molecular characterization of myostatin from the skeletal muscle of the African lungfish, *Protopterus annectens*, and changes in its mRNA and protein expression levels during three phases of aestivation. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 187, n. 4, p. 575-589, 2017.
- OSTBYE, Tone-Kari et al. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 20, p. 5249-5257, 2001.

- PEÑALOZA et al., 2013
C. Peñaloza, A. Hamilton, D.R. Guy, S.C. Bishop, R.D. Houston A SNP in the 5' flanking region of the myostatin-1b gene is associated with harvest traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*) BMC Genet., 14 (2013), p. 112.
- PEIXOTO, Jane de Oliveira. Associação entre polimorfismos no gene candidato Leptina e características quantitativas em suínos. 2004.
- PERAZZA, Caio Augusto et al. Lack of intermuscular bones in specimens of *Colossoma macropomum*: An unusual phenotype to be incorporated into genetic improvement programs. **Aquaculture**, v. 472, p. 57-60, 2017.
- PPM Pesquisa Pecuária Municipal <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>> Acesso em 10/08/2021
- RESENDE, E. K. (2009). Pesquisa em rede em aquicultura: Bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil. Aquabrazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 52– 57. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1590/S1516-35982009001300006>
- RIBEIRO, Ricardo Pereira et al. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 2375-2385, 2016.
- RODGERS, Buel D. et al. A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 2, p. E371-E372, 2007.
- ROTHSCHILD, M. F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal, 1999, Viçosa. **Anais...Viçosa**: p. 219 – 242, 1999.
- ROOIJ, D. Quiat, B.A. Johnson, L.B. Sutherland, X. Qi, J.A. Richardson, R.J. Kelm Jr., E.N. Olson A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance Dev. Cell, 17 (2009), pp. 662-673
- SAHU, Amiya Ranjan et al. Polymorphism in exon 3 of myostatin (MSTN) gene and its association with growth traits in Indian sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 81-84, 2017.

SEGEV-HADAR, Adi et al. Identification and Characterization of a Non-muscular Myostatin in the Nile Tilapia. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, p. 94, 2020.

SOARES, Ricardo José Ribeiro - Skeletal muscle atrophy: the role of miRNAs = Atrofia do músculo esquelético: a função dos miRNAs [em linha]. Coimbra: [s.n.], 2011. Disponível na WWW:<<http://hdl.handle.net/10316/20416>>. Tese de doutoramento.

SUN, Yuan et al. Disruption of mstna and mstnb gene through CRISPR/Cas9 leads to elevated muscle mass in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Aquaculture**, v. 528, p. 735597, 2020.

SWEETMAN, K. Goljanek, T. Rathjen, S. Oustanina, T. Braun, T. Dalmay, A. Munsterberg Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133 Dev. Biol., 321 (2008), pp. 491-499

TAYLOR, J.F. (2014). **Implementation and accuracy of genomic selection. Aquaculture**, 420–421, S8-S14.

TOWNLEY-TILSON WD, Callis TE & Wang D (2010). MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(8), 1252-1255.

URREA-ROJAS, Angela Maria et al. Genetic variability in Tambaqui generations of the breeding program in the Central-West Region of Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 3Supl1, p. 1785-1796, 2021.

VAN OOSTERHOUT, Cock et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

VELASCO, Lázaro; DE JESÚS, Ángel. Ferramentas de seleção para uniformidade de produção em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2017.

WANG, Ying et al. Identification of two SNPs in myostatin (MSTN) gene of Takifugu rubripes and their association with growth traits. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, n. 4, p. 200-203, 2014.

WANG, Chao et al. Deletion of mstna and mstnb impairs the immune system and affects growth performance in zebrafish. **Fish & shellfish immunology**, v. 72, p. 572-580, 2018.

WANG, Jiajia et al. A potential negative regulation of myostatin in muscle growth during the intermolt stage in *Exopalaemon carinicauda*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 314, p. 113902, 2021.

WEI, Y., Su, J., Liu, H., Lv, J., Wang, F., Yan, H., et al. (2014). MetalPrint: an information repository of mammalian imprinted genes. *Development* 141, 2516–2523. doi: 10.1242/dev.105320

XIE, Shaolin et al. Effects of fasting and re-feeding on mstn and mstnb genes expressions in *Cranoglanis boudierus*. **Gene**, v. 682, p. 1-12, 2019.

YANG, T. et al. MicroRNA-27a promotes porcine myoblast proliferation by downregulating myostatin expression. **animal**, v. 8, n. 11, p. 1867-1872, 2014.

YOSHIDA GM, Lhorente JP, Correa K, Soto J, Salas D, Yanez JM. Genome-Wide Association Study and Cost-Efficient Genomic Predictions for Growth and Fillet Yield in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *G3 (Bethesda)*. 2019;9(8):2597–607.

YÁÑEZ JM, Lhorente JP, Bassini L, et al. (2014) Genetic variation between resistance against both *Caligus rogercresseyi* and *Piscirickettsia salmonis*, and body weight in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture** 433: 295-298.

YÁÑEZ, J. M., and Martínez, V. (2010). Factores genéticos que inciden en la resistencia a enfermedades infecciosas em salmónidos y su aplicación en programas de mejoramiento. **Arch. Med. Vet.** 42, 1–13.

YUASA K., Hagiwara Y., Ando M., Nakamura A., Takeda S., Hijikata T. (2008). MicroRNA-206 é altamente expresso em fibras musculares recém-formadas: implicações quanto ao potencial de regeneração e maturação muscular na distrofia muscular. *Estrutura da Célula. Funcionar.* 33, 163–169 10.1247/csf.08022.

ZACHAREWICZ, Evelyn; LAMON, Séverine; RUSSELL, Aaron Paul. MicroRNAs no músculo esquelético e sua regulação com exercício, envelhecimento e doença. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 266, 2013.

ZHANG LL, Liu JJ, Liu F, Liu WH, Wang YS, Zhu B and Yu B 2012. MiR-499 induces cardiac differentiation of rat mesenchymal stem cells through wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420, 875–881.

ZHANG, Hui et al. Identification of myogenic regulatory genes in the muscle transcriptome of beltfish (*Trichiurus lepturus*): A major commercial marine fish species with robust swimming ability. **Genomics data**, v. 8, p. 81-84, 2016.

ZHANG, Shiyong et al. Functional identification and characterization of IpMSTNa, a novel orthologous myostatin (MSTN) gene in channel catfish *Ictalurus punctatus*. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 1-10, 2020.

ZHAO, Zaoya et al. miR-181b-5p may regulate muscle growth in tilapia by targeting myostatin b. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 812, 2019.

ZHONG, Qiwang et al. The isolation and characterization of myostatin gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): Ubiquitous tissue expression and developmental specific regulation. **Aquaculture**, v. 280, n. 1-4, p. 247-255, 2008.

ZHONG, Liqiang et al. A species-specific microsatellite marker to discriminate blue catfish, channel catfish and F1 hybrids. **Conservation genetics resources**, v. 7, n. 4, p. 827-829, 2015.

ZHOU, Bin et al. Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 17-18, p. 1287-1290, 2010.