

MARCADORES EPIGENÉTICOS MicroRNAs PARA TOLERÂNCIA AO FRIO EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758): IDENTIFICAÇÃO, PREDIÇÃO *IN SILICO* E DESENHOS DE PRIMERS

INGRID MEDEIROS LESSA¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; TONY
SILVEIRA³, LUCAS DOS SANTOS DA SILVA⁴; BRUNA FAGUNDES BARRETO⁵;
VINICIUS FARIAS CAMPOS⁶

¹Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – ingridmlessa@hotmail.com

²Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – williamwwe@yahoo.com.br

³Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – tony8.9@hotmail.com

⁴Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – lucassantos_17@hotmail.com

⁵Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – brunaf.barreto@live.com

⁶Laboratório de Genômica Estrutural, CDTec, Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é considerada uma das produções com maior desempenho no Brasil, chegando ao registro de R\$ 4,39 bilhões em 2015, sendo a piscicultura produtora de 70% deste rendimento e o cultivo de tilápias (*Oreochromis spp.*) ocupando a primeira posição neste crescimento de produção. Em 2015, a despesa da espécie chegou a 219,33 mil toneladas (IBGE, 2015) e conforme projeções da *Food and Agriculture Organization* (FAO), a estimativa é de que a produção de tilápia chegue a 9,2 milhões de toneladas até 2030 (FAO, 2014).

No Brasil, os estados que apresentam maior sucesso no cultivo da espécie, são: Ceará, Bahia, São Paulo e Paraná (IBGE, 2015). Essa limitação de regiões pode se dar devido à sensibilidade das espécies a baixas temperaturas, restringindo, assim, seu cultivo a regiões com temperaturas entre 27 e 32°C. Animais expostos a temperaturas inferiores a 22 °C, como as encontradas no Rio Grande do Sul, podem apresentar perda de apetite e risco de doenças aumentado, quadro que se agrava quando os animais são expostos a temperaturas próximas de 14 °C, podendo ser letal (OSTRENSKI; BOERGER, 1998).

Atualmente, diferentes linhagens de tilápias estão disponíveis para o cultivo em cativeiro, destacando-se as linhagens: Chitralada, mais cultivada no nordeste do país; um mutante genético selecionado a partir de espécies do gênero *Oreochromis*, a qual apresenta maior tolerância à salinidade e menor a baixas temperaturas; e a linhagem GST (*GenoMar Supreme Tilapia*), um híbrido de oito linhagens distintas oriundas da Ásia e da África, a qual possui um rápido crescimento (SOUZA, 2007). Entretanto, não se tem conhecimento de linhagens de tilápia que apresentem tolerância ao cultivo em baixas temperaturas nem de marcadores moleculares que sinalizem tal predisposição. Diversos processos fisiológicos e respostas a variações de condições ambientais vêm sendo compreendidos com o auxílio da análise do perfil de expressão de certos marcadores moleculares, sendo os microRNAs (miRNAs) um dos fatores epigenéticos mais promissores atualmente. Os miRNAs são fragmentos de RNA que podem variar de 18 a 22 nucleotídeos e não apresentam capacidade de codificar proteínas, podendo atuar no controle da expressão gênica pós-transcricional bloqueando a tradução do RNA mensageiro (mRNA) ou até mesmo degradando-o (RASAL et al., 2016).

Em vertebrados, diversos estudos demonstram a ação dos miRNAs sobre a expressão de genes relacionados ao controle do ciclo celular, processos

bioquímicos e celulares frente a exposição ao frio, sendo o primeiro passo para tais estudos a predição *in silico* da função e interações moleculares destes miRNAs. Visando subsidiar estudos futuros que busquem a utilização e validação de marcadores epigenéticos microRNAs para tolerância de *O. niloticus* (tilápia-do-Nilo) ao frio na região sul do estado, o presente trabalho teve por objetivo identificar miRNAs relacionados a tolerância de temperatura, bem como, seus presumíveis genes alvos com o auxílio de uma ferramenta online para predição *in silico*.

2. METODOLOGIA

2.1. BUSCA DE miRNAs RELACIONADOS À TOLERÂNCIA AO FRIO EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

A busca por miRNAs envolvidos em respostas fisiológicas de vertebrados expostos a baixas temperaturas se deu através da busca de trabalhos disponíveis em banco de dados como o PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Portal de Periódicos CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>) e *Scientific Electronic Library Online* (<http://www.scielo.org/php/index.php>). A partir deste levantamento, buscas para os miRNAs mais citados na literatura como participantes de respostas de tolerância ao frio em outros organismos foram realizadas no banco de dados *online* miRBase (<http://www.mirbase.org/>), visando identificar a existência destes para espécies de peixes.

2.2. PREDIÇÃO *IN SILICO* DAS INTERAÇÕES miRNA-mRNA

A identificação dos genes alvos para cada um dos miRNAs de interesse se deu através da utilização da ferramenta *online* miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>), utilizando os parâmetros sugeridos pelos próprios desenvolvedores da ferramenta.

Resumidamente, a ferramenta busca sítios de ligação do miRNA de interesse às regiões 3'UTR (*Untranslated region* – regiões não traduzidas) de seus possíveis genes alvos. O miRWalk comporta resultados de buscas em 12 diferentes programas de predição para interações miRNA-RNAm, sendo a maioria dos resultados já verificados experimentalmente.

2.3. DESENHO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA CLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE EM *O. niloticus*

Após identificação dos miRNAs de interesse e seus genes alvos, foi realizado o desenho de *primers* específicos para os genes de interesse para *O. niloticus*. Por não se ter conhecimento das sequências dos genes escolhidos para a espécie de interesse, o desenho dos *primers* senso e antisenso específicos para *O. niloticus* utilizando a ferramenta *online* PriFi (<https://services.birc.au.dk/prifi/main.py>), com base no alinhamento de sequências destes genes já depositadas para outras espécies de peixes no GenBank.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os miRNAs inicialmente escolhidos foram miR-21 e miR-16, visto que diversos estudos correlacionam a ação destes miRNAs com a tolerância de

vertebrados ao frio e/ou ao congelamento (BIGGAR, 2009; BIGGAR, 2015; BANSAL, 2015).

Dentre os possíveis genes encontrados como alvos do miR-21, realizamos a escolha e desenho de *primers* específicos para os seguintes genes: STAG2, relacionado a separação das cromátides durante a divisão celular; LAMA4, que participa de processos de adesão, migração e diferenciação celular por sintetizar glicoproteínas que compõem a membrana basal das células; GID4, envolvido no processo de metabolismo da glicose; e CNKSR2, regulador da glicólise e do metabolismo oxidativo nas células.

Ao analisar a expressão do miR-16 em tartarugas expostas ao congelamento, BIGGAR; STOREY (2015) identificaram a ação deste miRNA sobre 820 genes, após exposição a 1 °C e a 173 genes quando expostas a 37 °C, dentre estes, genes relacionados ao crescimento e controle do ciclo celular. Sendo assim, dentre os resultados encontrados para os genes alvos do miR-16, até o presente momento, realizamos o desenho de *primers* específicos para os genes: CHEK1 (*Checkpoint Kinase 1*), enzima envolvida no controle do ciclo celular das células; BCL2, gene que atua como regulador da apoptose; e ATP2A2, responsável pela síntese da proteína SERCA Ca⁺-ATPases (bomba intracelular presente nos retículos sarcoplasmáticos de células musculares). Em *Thunnus orientalis* (atum-do-Pacífico), o gene SERCA apresentou um aumento de expressão em resposta à exposição ao frio, como demonstrado por JAYASUNDARA et al. (2013), indicando melhor absorção de Ca⁺ por células cardíacas de peixes e um melhor desempenho muscular (BANSAL et al., 2016).

O desenho destes *primers* específicos para os alvos do miR-16 e miR-21, tornará possível, pela primeira vez, a realização da clonagem molecular destes genes em *O. niloticus*, possibilitando assim a análise da expressão dos mesmos em estudos futuros desenvolvidos pelo grupo de pesquisa.

4. CONCLUSÕES

Com o resultado das predições realizadas até o presente momento, é possível concluir que miR-21 e miR-16 são miRNAs apresentados como potenciais no estudo de tolerância ao frio, visto que estão diretamente relacionados a processos básicos e essenciais para a manutenção das células.

Com isto, os próximos passos deste estudo serão a clonagem e sequenciamento dos genes alvos escolhidos, seguida da análise de expressão dos miRNAs e seus alvos em *O. niloticus* quando submetidos a condições de baixas temperaturas, buscando assim, a identificação de marcadores moleculares capazes de auxiliar na seleção genética de uma linhagem apta a se desenvolver em regiões frias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANSAL, S.; LUU, B. E.; STOREY, K. B. MicroRNA regulation in heart and skeletal muscle over the freeze-thaw cycle in the freeze tolerant wood frog. *Journal of Comparative Physiology B*, v. 186, n. 2, p. 229-241, 2016.

BIGGAR, K. K.; DUBUC, A.; STOREY, K.. MicroRNA regulation below zero: differential expression of miRNA-21 and miRNA-16 during freezing in wood frogs. *Cryobiology*, v. 59, n. 3, p. 317-321, 2009.

_____; STOREY, K. B. Low-temperature microRNA expression in the painted turtle, *Chrysemys picta* during freezing stress. **FEBS letters**, v. 589, n. 23, p. 3665-3670, 2015.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture:** opportunities and challenges. Roma: Food and Agriculture Organization of United Nations, p. 223, 2014.

IBGE. **Produção da pecuária municipal.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 43, p. 49, 2015.

JAYASUNDARA, N.; GARDNER, L. D.; BLOCK, B. A. Effects of temperature acclimation on Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) cardiac transcriptome. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 9, p. R1010-R1020, 2013.

OSTRENSKI, A.: BOERGER, W.. **Piscicultura:** Fundamentos e Técnicas de Manejo. Guaíba: Agropecuária, 1998. p.211.

RASAL, K. D. et al. MicroRNA in aquaculture fishes: a way forward with high-throughput sequencing and a computational approach. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 26, n. 2, p. 199-212, 2016.

SOUZA, M. E. **Caracterização genética de reprodutores de tilápia:** estratégias para a manutenção da variabilidade. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.