**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Identificação de microRNAs envolvidos com a maciez da carne em
bovinos da raça Nelore**

Berna Inés Giménez Kappeler

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2015**

Berna Inés Giménez Kappeler
Licenciado em Genética

**Identificação de microRNAs envolvidos com a maciez da carne em
bovinos da raça Nelore**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Kappeler, Berna Inés Giménez

Identificação de microRNAs envolvidos com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore / Berna Inés Giménez Kappeler. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Bos indicus* 2. *Longissimus dorsi* 3. Força de cisalhamento 4. Expressão diferencial 5. miRDeep2 6. QuasiSeq 7. Redes I. Título

CDD 636.291
K17i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Para mi madre, motor de todos mis logros

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação de Ciência Animal e Pastagens, por proporcionarem um pilar de excelência em pesquisa e abrir as portas para o acesso e criação de conhecimento científico global.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, por contribuir e suportar meu desenvolvimento profissional, exigindo dedicação e busca pela superação frente aos desafios encontrados. Também por sua compreensão nos momentos de dificuldade e por proporcionar a oportunidade de trabalhar em um laboratório de renome e de referência na área de biotecnologia animal.

Ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão por ter demonstrado paciência e compreensão ao me apontar os atalhos no início de meus estudos, além de sua amizade.

À EMBRAPA Pecuária Sudeste e especialmente à Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano, por terem sido os idealizadores originais do meu projeto, fornecendo os dados e materiais necessários para todo o desenvolvimento desse estudo, tornando possível sua existência.

Aos colegas e técnicos do laboratório de Biotecnologia Animal e membros do GEMA, Nirlei, Ricardo, Jorge, Marcel, Marcela, Pilar, Karina, Clarissa, Sônia, Priscila, Gustavo, Luiza, Horácio, Gabi, Thaís, Ribamar, Rosi, Vinicius, Paula, Fábio, Luana, Priscila T., Lilian, Ariana, Mayara, Joana, Laiza, Simone, Juliana e especialmente ao Gabriel, Gregori e Tássia, pelo convívio pessoal engrandecedor, companheirismo e amizade durante os momentos de felicidade e de dificuldade.

Às pós-doutorandas e amigas Mirele, Andrezza e Aline pelo apoio, paciência e ótimos momentos de descontração.

Aos colegas do projeto de Bases Moleculares da Qualidade da Carne em Bovinos da Raça Nelore (Processo: 2012/23638-8) pela troca de conhecimento e pelos conselhos úteis.

À CAPES e FAPESP (Processo: 2014/00943-5), por fomentar a pesquisa científica de forma produtiva e garantir as condições econômicas necessárias para o sucesso e desenvolvimento desse trabalho.

À minha querida mãe, por ser uma pessoa incrivelmente amorosa e maravilhosa, quem nunca me deixou pensar que eu não poderia fazer na vida exatamente o que eu quisesse fazer ou ser quem eu queira ser e pelo seu incansável esforço de me fazer sentir perto dela, mesmo estando longe de casa.

Ao meu pai, pelo suporte, amor e compreensão e por me apoiar em todo momento nos meus projeto e sonhos.

À minha amada família, minha tia Mirta, minha prima Romina e nossos anjos (abuelito e abuelita), pelo carinho, estímulo e apoio incansável.

Ao Tiago, meu namorado, amigo e companheiro, por ter a paciência que o amor requer para me entender e acompanhar com tanto carinho em todos os momentos em que o estudo e o trabalho ocuparam meu tempo e esforço.

À Família Melito por me considerarem um membro em seu lar e me fazer sentir tão querida.

À Alcione, que foi acima de tudo uma amiga, conselheira e quem me fez manter a confiança e motivação.

Aos meus amigos que contribuíram indiretamente de diversas formas, me apoiando tanto nas dificuldades quantos nos momentos positivos.

À Deus e a Santíssima Virgem Maria pelas inumeráveis bênçãos recebidas.

"Sé en quien he puesto mi confianza. Dios es mi protector" (Sal 62, 3)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	9
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Pecuária Brasileira	17
2.2. Qualidade da Carne	18
2.3. microRNAs	19
2.3.1. Biogêneses dos microRNAs	20
2.3.2. Mecanismo de ação dos microRNAs	22
2.3.3. microRNAs em bovinos	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Animais	27
4.2. Coleta de amostras	27
4.3. Análises de maciez e seleção de animais para o estudo de microRNAs	28
4.4. Extração de RNA total	28
4.5. Determinação do rendimento, qualidade e integridade do RNA total	29
4.6. Preparação das Bibliotecas de microRNAs	29
4.6.1. Purificação de cDNA	30
4.6.2. Eluição do Gel	31
4.6.3. Concentração final da Biblioteca e precipitação dos microRNAs	31

4.6.4.	Quantificação das Bibliotecas	32
4.7.	Sequenciamento	32
4.8.	Análises dos dados de sequenciamento.....	33
4.9.	Análises da expressão diferencial dos microRNAs	34
4.10.	Predição de genes alvos e Análises Funcional.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1.	Seleção dos Animais	37
5.2.	Extração e quantificação de RNA	37
5.3.	Determinação da qualidade do RNA total	39
5.4.	Obtenção das bibliotecas de microRNAs.....	40
5.5.	Sequenciamento	40
5.6.	Identificação e quantificação de microRNAs conservados e novos	42
5.7.	Identificação de microRNAs diferencialmente expressos, predição de genes alvos e redes funcionais	47
6.	CONCLUSÃO	65
7.	REFERÊNCIAS.....	67

RESUMO

Identificação de microRNAs envolvidos com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore

O Brasil ocupa a segunda posição mundial na produção de carne bovina, a implantação de novas ferramentas para a seleção de animais zebuínos (*Bos indicus*) com carne de melhor qualidade tem uma importante contribuição para a competitividade da pecuária de corte. Neste contexto, compreender os padrões de expressão de microRNAs específicos envolvidos nos processos que afetam a maciez da carne é fundamental para a sua produção, uma vez que essa característica organoléptica é de grande valor na aceitação deste alimento pelos consumidores. O advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração em conjunto com o uso de ferramentas de bioinformática tem permitido o estudo do genoma em larga escala de forma mais rápida e com menor custo. Para este estudo, foram utilizadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* de 34 animais da raça Nelore com medidas extremas de valor genético estimado (EBV) para força de cisalhamento (FC). Os RNAs totais foram extraídos, as bibliotecas de microRNA foram construídas e os sequenciamentos foram realizados em equipamento da plataforma Illumina (MiSeq). O processamento dos dados foi feito por meio dos softwares FastQC, Cutadapt e miRDeep2 e as análises de expressão diferencial foram realizadas por meio do programa estatístico QuasiSeq. Utilizando um critério de taxa de descoberta de falsos positivos (FDR) inferior a 0,1, três microRNAs (bta-mir-182, bta-mir-183, bta-mir-338) foram identificados como diferencialmente expressos entre os grupos de animais com valores extremos de EBV para FC. Um total de 1204 genes alvos foi previsto e análises funcionais de enriquecimento foram realizadas por ferramentas de bioinformática. Várias redes e vias metabólicas como a sinalização de apoptose e regulação dos mecanismos celulares pela protease calpaína foram obtidas, demonstrando assim que os genes alvos identificados estariam envolvidos em muitos processos metabólicos relacionados com a maciez da carne bovina.

Palavras-chave: *Bos indicus*; *Longissimus dorsi*; Força de cisalhamento; Expressão diferencial; miRDeep2; QuasiSeq; Redes

ABSTRACT

Identification of microRNAs involved in meat tenderness in Nellore cattle

Brazil occupies the second world position in beef production and thus, the implementation of new tools to select zebuine animals (*Bos indicus*) with better beef quality has an important contribution to the competitiveness of beef cattle. Inside this context, to comprehend the microRNAs expression patterns involved in the processes that are related to beef tenderness is essential to the meat production since this organoleptic characteristic has a high value in meat acceptance by the consumers. The advent of new generation sequencing technologies along with the biotechnology tools usage has allowed large-scale genome studies as well as faster and cheaper analysis. In this study, samples of the *Longissimus dorsi* muscle from 34 animals of Nellore cattle breed with extreme estimated genetic value (EBV) for shear force (FC) were used. The total RNAs were extracted, libraries of microRNA were built and finally the sequencing was performed using the Illumina (MiSeq) platform equipment. Data processing was done using FastQC, Cutadapt and miRDeep2 softwares while the differential expression analyzes were realized through the statistical package QuasiSeq. Using a false discovery rate (FDR) criteria below 0.1, three microRNAs (bta-mir-182, bta-mir-183, bta-mir-338) were identified as differentially expressed among the group of animals with extreme EBV values for FC. A total of 1024 target genes were predicted and functional analyzes of enrichment were performed using bioinformatics tools. Many metabolic networks and pathways such as the apoptosis signalization and cell regulation mechanisms by calpain protease were obtained, demonstrating therefore that the identified target genes would be involved in many metabolic processes related with the beef tenderness.

Keywords: *Bos indicus*; *Longissimus dorsi*; shear force; differential expression; miRDeep2; QuasiSeq; Networks

1. INTRODUÇÃO

Os microRNAs (também conhecidos como miRNAs) são ácidos ribonucleicos (RNAs) endógenos, não codificantes, de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (LEE et al., 1993) que modulam a expressão de genes em animais, plantas e vírus ao nível pós-transcricional através da clivagem do RNA mensageiro (RNAm) alvo ou da repressão da tradução (BARTEL, 2004; MCDANELD, 2009).

O primeiro microRNA, *lin-4*, foi descoberto em 1993 sendo associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). O aumento das evidências atuais indicam que estas moléculas desempenham um importante papel regulador em vários processos biológicos, tais como a proliferação celular, a diferenciação, a neurogênese, a angiogênese e a apoptose (BARTEL, 2004). Em animais domésticos, tem sido demonstrado que os microRNAs são importantes reguladores do desenvolvimento embrionário, da função do músculo esquelético, do tecido adiposo, do tecido mamário e do tecido imune (COUTINHO et al., 2007; CUPP et al., 2009).

Até o momento, foram catalogados no banco de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 28.645 precursores de microRNAs e 35.828 produtos maduros, presentes em 223 espécies. No entanto, a caracterização de microRNAs em animais domésticos e entre estes, em bovinos, ainda é recente e limitada com 793 microRNAs anotados para *Bos taurus* em comparação com 2.588 microRNAs identificados para os seres humanos e 1.915 microRNAs anotados em *Mus musculus*.

Os bovinos são uma das espécies animais mais importantes para a produção de carne. O Brasil é possuidor de uma das maiores indústrias de produção deste alimento, tornando-se um dos principais exportadores de carne bovina do mundo (INDEX, MUNDI, 2015), com um rebanho estimado em 209 milhões de cabeças (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), 2015).

Entre as características de alto valor econômico para espécies de gado, a qualidade da carne e especificamente a maciez da carne é considerada o principal motor de satisfação sensorial entre os consumidores (SZCZESNIAK, 1998; KOOHMARAIE, 1992; OUALI, 2007; WARKUP; MARIE; HARRINGTON, 1995).

Muitos microRNAs foram relatados como reguladores de processos que afetam diretamente as características de importância econômica na pecuária. microRNAs como miR-1 e miR-133 são específicos do músculo e estão envolvidos na modulação da proliferação muscular (CHEN et al., 2006). O miR-486 tem sido descrito como um indutor de diferenciação de mioblastos (DEY; GAGAN; DUTTA, 2011) e miR-26a é induzido durante a regeneração do músculo esquelético (DEY et al., 2012).

Este estudo avaliou a maciez da carne do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos selecionados da raça Nelore. O objetivo foi identificar microRNAs conservados e novos, presentes no músculo e elucidar os padrões de expressão de microRNAs específicos envolvidos nos processos que afetam a maciez da carne.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pecuária Brasileira

A bovinocultura é uma das principais atividades produtivas do agronegócio brasileiro. O Brasil é possuidor do segundo maior rebanho comercial do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças de gado (ABIEC, 2015).

No primeiro trimestre do ano 2015 já foram abatidas 7,732 milhões de cabeças sob serviço de inspeção sanitária. A liderança no ranking nacional do abate de bovinos é do estado de Mato Grosso, seguido por Mato Grosso do Sul e São Paulo. Este número equivale a uma produção nacional de 1,837 milhões de toneladas de carcaças bovinas registradas para o mesmo período (IBGE, 2015).

Desde o ano 2004 o Brasil assumiu também a liderança nas exportações e vendas em mais de 180 países e segundo o Ministério da Agricultura, as previsões são de que as exportações brasileiras de carne bovina representem cerca de 60% do comércio mundial nos anos 2018/2019.

No entanto é importante destacar que o principal destino da produção da carne brasileira é o mercado interno, com cerca de 84% dessa produção consumida no país, equivalente a um consumo médio de 37 kg por habitante por ano (MAPA, 2015).

As raças zebuínas (*Bos indicus*) correspondem a aproximadamente 80% do rebanho brasileiro e dentre estas raças, 90% do gado de corte é Nelore (ABIEC, 2015).

A predominância da raça Nelore no processo de produção de carne e no desenvolvimento da pecuária brasileira se deve a maior adaptabilidade às condições tropicais brasileiras tanto ao ambiente quanto ao sistema de produção, à sua capacidade de resistência ao calor, menor exigência alimentar para se manter, resistência natural aos parasitas e elevada longevidade produtiva (LUCHIARI FILHO; MOURÃO, 2006), o que refletem em maior produtividade.

2.2. Qualidade da Carne

A carne bovina é um alimento de alto valor biológico e nutritivo, (LUCHIARI FILHO, 2000). Seu processo de obtenção tem sido bastante estudado visando disponibilizar para o mercado consumidor produtos de qualidade.

A definição de qualidade de carne, segundo Moraes et al., (2011) pode ser dividida atendendo a dois aspectos: o subjetivo, considerando a qualidade como um produto da mente do consumidor e que não pode ser mensurada de maneira objetiva e determinada e uma segunda definição que considera apenas os atributos cientificamente mensuráveis como a cor, a maciez, a composição de ácidos graxos, etc.

Dentre estas características a maciez assume uma posição de destaque. Considerada como uma característica organoléptica de maior influência na aceitação da carne por parte dos consumidores (PAZ; LUCHIARI FILHO, 2000), observou-se que estes estão dispostos a pagar mais pela maior maciez (MILLER et al., 2001).

A genética do animal, a raça, a idade ao abate, o sexo, a alimentação e os tratamentos post-mortem são alguns dos fatores que incidem na maciez, além de ser afetada também por todos os elos da cadeia de produção da carne como o transporte, o armazenamento, a manipulação, a exposição e o preparo da carne (ALVES et al., 2007).

No Brasil, uma das principais dificuldades do sistema de produção é precisamente em relação à sua qualidade. Pesquisas anteriores investigaram a característica de maciez da carne e demonstraram que os bovinos da raça Nelore apresentam carne com menor maciez (PFLANZER; FELICIO, 2009; OLIVEIRA et al., 2012; LAGE et al., 2012).

Uma possível explicação para este fato pode ser atribuída à atividade da calpastatina (LAGE et al., 2012). Vários estudos anteriores indicaram que os animais *Bos indicus* apresentam concentrações de calpastatina no músculo superiores aos animais *Bos taurus* (WHEELER et al., 1990; WHIPPLE et al., 1990). Corroborando assim outros trabalhos avaliando as raças Brahman e

Hereford onde foi observada que a diminuição da maciez em animais zebuínos devia-se ao incremento da atividade desta mesma proteína (WHIPPLE et al., 1990; SHACKELFORD et al., 1991).

A calpastatina é o inibidor da enzima proteolítica calpaína durante o processo de proteólise post-mortem. Alterações durante este processo correspondem a 85% da variabilidade na maciez da carne enquanto que os 15% restantes são devido às diferenças em marmoreio e colágeno (KOOHMARAIE, 1992).

A herança genética parece ter uma grande influência na velocidade e extensão da proteólise que se verifica no processo de conversão do músculo em carne. A média de herdabilidade para maciez da carne é de cerca de 0,3 (KOOHMARAIE, 2003).

É importante conhecer a base genética da variação da maciez da carne bovina para o desenvolvimento e estabelecimento de critérios de seleção para melhoria dessa característica (PAGE et al., 2002). Dessa forma, estão sendo realizados estudos do genoma e transcriptoma, particularmente dos microRNAs, com o objetivo de aperfeiçoar o entendimento dos mecanismos genéticos e biológicos envolvidos nessa complexa característica.

2.3. microRNAs

Os microRNAs, também conhecidos como miRNAs, são ácidos ribonucleicos (RNAs) endógenos não codificantes de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento (LEE et al., 1993) que modulam a expressão de genes em animais, plantas e vírus ao nível pós-transcricional através da clivagem do RNA mensageiro (RNAm) alvo ou da repressão da tradução (BARTEL, 2004; MCDANELD, 2009). São altamente conservados, de nematóides a bovinos e humanos (COUTINHO et al., 2007).

O primeiro microRNA foi descoberto em 1993, associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans*. Foi denominado lin-4 devido a

sua ação de repressão da expressão do gene que codifica a proteína lin-14 (LEE et al., 1993).

Até o momento foram catalogados na base de dados miRBase 28.645 precursores de microRNAs e 35.828 produtos maduros presentes em 223 espécies, muitos destes correspondendo a microRNAs tecido-específicos e evolutivamente conservados.

Estão envolvidos na regulação de vários processos biológicos como a proliferação celular, diferenciação, neurogênese, angiogênese e apoptose (BARTEL, 2004). Em animais domésticos, têm sido demonstrado que os microRNAs são importantes reguladores do desenvolvimento embrionário, da função do músculo esquelético, do tecido adiposo, do tecido mamário e do tecido imune (COUTINHO et al., 2007; CUPP et al., 2009) atuando dessa forma no controle de várias características de elevada importância econômica como a maciez. São considerados candidatos a biomarcadores de várias doenças autoimunes, metabólicas, cardiovasculares, e câncer (FATIMA; MORRIS, 2013).

2.3.1. Biogêneses dos microRNAs

Genes de microRNAs, localizados em regiões intergênicas ou introns de genes codificadores de proteínas são transcritos pela RNA-polimerase como precursores longos, produzindo os microRNAs primários (pri-microRNAs) (BARTEL, 2004). Estes são processados no núcleo pela ação do complexo microprocessador Drosha-DGCR8, cujo principal interveniente é uma endonuclease tipo III, (Drosha). Com este processo acontece a formação dos precursores de microRNA (pré-microRNAs) de aproximadamente 60 a 70 nucleotídeos (nt), os quais apresentam uma estrutura do tipo *hairpin*. (LEE et al., 2003; KIM, 2005).

Os pré-microRNAs são exportados ativamente para o citoplasma por uma Ran-GTP e pelo receptor de exportação Exportina-5 (YI et al., 2003), onde são clivados pela RNase III Dicer para formar RNAs de cadeia dupla (HUTVAGNER et al., 2001).

Após isto, uma das cadeias é selecionada e incorporada no complexo proteico RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) tornando-se assim um microRNA maduro que pode exercer a sua função de silenciamento gênico (KHVOROVA et al., 2003) (Figura 1).

Figura 1 - Biogênese dos microRNAs (Adaptado de Wienholds; Plasterk, 2005)

2.3.2. Mecanismo de ação dos microRNAs

O microRNA pode regular a expressão do seu RNA mensageiro (RNAm) alvo por meio de dois mecanismos pós-transcricionais dependendo do grau de complementariedade com a região 3'UTR do RNAm alvo.

Estes dois mecanismos consistem na clivagem do RNAm ou a repressão da tradução (BARTEL, 2004) (Figura 2).

Uma complementariedade imperfeita conduz à repressão da tradução enquanto que uma complementariedade perfeita ou quase perfeita leva à clivagem do RNAm.

Em animais a complementariedade é geralmente imperfeita e assim o principal mecanismo de atuação dos microRNAs é por meio da inibição da tradução (ZENG et al., 2002), interferindo diretamente nos fatores de iniciação da tradução ou perturbando a função da cauda poli-A (GEBAUER; HENTZE, 2004).

Nas plantas, por estas apresentarem no geral uma complementariedade quase perfeita com a região 3'UTR do RNAm, o mecanismo principal de ação dos microRNAs é a clivagem do RNAm alvo. No entanto alguns microRNAs de animais como é o caso do microRNA miR-196, regulador da expressão da proteína homeobox HOXB8 em embriões de camundongos também possuem este mecanismo (YEKTA et al., 2004).

Uma última maneira de atuação do microRNA para regular a expressão do RNAm é por meio do processo de deadenilação da cauda poli-A do RNAm. Animais como o *Danio rerio* (peixe paulistinha ou zebrafish) são um dos exemplares que apresentam este mecanismo de ação.

Figura 2 - Mecanismo de ação dos microRNAs (Adaptado de Wienholds; Plasterk, 2005)

2.3.3. microRNAs em bovinos

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS, *Next Generation Sequencing*) são métodos eficazes e de baixo custo que estão se tornando uma técnica cada vez mais comum para a análise do transcriptoma e dentre deste para o estudo de microRNAs.

A versão 21 do banco de dados miRBase contém anotadas para *Bos taurus* 808 sequências precursoras de microRNAs e 793 microRNAs maduros. Este numero demonstra que a descoberta e caracterização de microRNAs em animais domésticos são mais recentes e ainda limitadas comparado com os 2.588 microRNAs identificados para humanos ou com os 1.915 microRNAs anotados para *Mus musculus*. No entanto, estão a aumentar.

Os bovinos constituem uma das espécies pecuárias mais importantes para a produção de carne e para estudos biológicos e de genoma comparativa por serem considerados como organismos modelo de mamíferos (GIBS et al., 2002).

Estudos anteriores demonstraram que os microRNAs desempenham um papel importante na miogênese e desenvolvimento muscular, além de ter grande impacto sobre a massa muscular, tipo de fibra muscular e doenças relacionadas com os músculos (SOKOL, 2012; LUO et al., 2013).

Muitos microRNAs como o miR-1 e miR-133, são músculo-específicos e estão envolvidos na modulação da proliferação do músculo (CHEN et al., 2006). Encontram-se participando de processos biológicos como a diferenciação, proliferação, apoptose e homeostase (BARTEL, 2004), sugerindo desta maneira, o papel regulatório destas moléculas no desenvolvimento do tecido muscular da carne bovina e no controle da complexa característica de maciez.

Este trabalho, além de pretender contribuir com a identificação desse conjunto abrangente de microRNAs, considerando que isto facilitará o nosso entendimento da organização do genoma bovino, sua biologia e evolução (GLAZOV et al., 2009), procura identificar também quais microRNAs são ativos em um determinado conjunto de condições experimentais de maneira a mudar o padrão no ambiente celular dinâmico e intervir no controle da maciez.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este projeto tem como objetivo a identificação de microRNAs que possam estar envolvidos com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore.

3.2. Objetivos Específicos

Identificar, por sequenciamento, os microRNAs expressos no tecido muscular.

Identificar microRNAs diferencialmente expressos entre animais representantes de extremos fenotípicos para valor genético estimado (EBV) para força de cisalhamento (FC).

Identificar sítios putativos de interação destes microRNAs com genes expressos no tecido muscular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados animais da população de raça Nelore gerada dentro do projeto em rede intitulado “Estratégias genéticas para produção de carne bovina de qualidade” ou Rede de pesquisa BifeQuali da Embrapa concluído em Abril de 2012.

Nesse projeto foram escolhidos como parentais 34 touros da raça Nelore utilizando-se como guia para a seleção os catálogos de diferentes centrais de inseminação do país, a disponibilidade de sêmen e as genealogias no intuito de ter representadas nos animais selecionados as principais linhagens que compõem a raça Nelore no país. Segundo esses critérios foram produzidos 310 novilhos machos descendentes desses touros que representam as principais genealogias usadas no Brasil.

Os animais foram criados em confinamento entre os anos de 2009 e 2011 na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, sob a mesma condição de nutrição e manejo.

Após aproximadamente 100 dias de confinamento, em uma idade média de 25 meses, os animais foram abatidos, e as medidas de composição e qualidade de carcaça e da carne foram coletadas.

4.2. Coleta de amostras

Amostras para extração de RNA foram coletadas do músculo *Longissimus dorsi* entre a 12ª e 13ª costelas da meia carcaça direita, com o auxílio de um perfurador no momento do abate e armazenadas em nitrogênio líquido.

As carcaças foram resfriadas a 2°C e 24 horas após a morte, foram coletados três bifes de 2,54 cm de espessura do músculo *Longissimus dorsi*, da meia carcaça esquerda, entre as 12ª e 13ª costelas para a obtenção das medidas de força de cisalhamento. Os bifes foram identificados e embalados individualmente a vácuo em filme de alta barreira e, em seguida, armazenados em câmara fria entre 0 e 2 °C por até 14 dias para maturação.

4.3. Análises de maciez e seleção de animais para o estudo de microRNAs

O valor da força de cisalhamento foi determinado em cada um dos três bifes coletados, os quais foram analisados após 24 horas, 7 e 14 dias após o abate, seguindo a metodologia descrita por Wheeler et al. (1995). Para esta análise foi utilizado um analisador de textura TA XT2i acoplado a uma lâmina de Warner-Bratzler com 1,016 milímetro de espessura (TIZIOTO et al., 2013).

Após a obtenção das medidas de força de cisalhamento da população utilizada (310 animais) foram estimados os valores genéticos dos animais. Assim os animais foram classificados segundo os valores genéticos estimados (EBV) para força de cisalhamento aos 7 (EBVSF7) e 14 (EBVSF14) dias de maturação. Os valores genéticos para força de cisalhamento (EBVSF) foram calculados usando a metodologia BLUP sob modelo animal (HENDERSON, 1972; MRODE, 2005) por meio do procedimento MIXED. De acordo com a alta correlação entre EBV e SF14 (0,83), os valores de EBV para força de cisalhamento aos 14 dias (EBVSF14) foram usados para selecionar os grupos de animais com maiores (grupo H) e menores (grupo L) valores de força de cisalhamento.

4.4. Extração de RNA total

A extração do RNA total foi feita empregando-se o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.). Aproximadamente 100 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido. O tecido macerado foi transferido para um tubo de 15 mL, acrescentou-se 1 mL de Trizol agitando em vortex até a solubilização do tecido. Em seguida, incubou-se por cinco minutos a temperatura ambiente. Ao tubo, adicionou-se 200 µL de clorofórmio agitando vigorosamente várias vezes e incubando a temperatura ambiente por cinco minutos. Após procedeu-se à centrifugação a 11.000 rpm por quinze minutos a 4°C, recuperando a fase aquosa em um tubo novo.

A este foram adicionados 500 µL de isopropanol seguindo-se de incubação por dez minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por dez minutos a 4°C e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 75%, sendo procedida nova centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O *pellet*

foi desidratado a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 μ L de água-DEPC (0,01%).

4.5. Determinação do rendimento, qualidade e integridade do RNA total

A quantificação do rendimento do RNA total foi determinada por meio de espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop 200 (Thermo Scientific. Wilmington. Delaware E.U.A.). A avaliação da integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% e com o equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), utilizando o RNA 6000 Nano kit.

4.6. Preparação das Bibliotecas de microRNAs

A construção das bibliotecas de microRNAs foi realizada a partir de 1 μ g de RNA total de cada uma das 34 amostras utilizando o *Kit Illumina TruSeq smallRNA Sample Prep*, conforme recomendações do fabricante.

A metodologia do kit baseia-se no emprego da estrutura natural que é comum à maioria das moléculas de microRNAs conhecidas. Estas possuem um grupo fosfato 5' e um grupo hidroxila 3', resultados da via celular que é utilizada para a criação das mesmas.

Os adaptadores do *Kit Illumina TruSeq smallRNA Sample Prep* são desenhados para ligar direta e especificamente a estas moléculas de microRNAs (Figura 3). O adaptador 3' está modificado para ligar-se a microRNAs alvos e outros pequenos RNAs que possuem o grupo 3'-hidroxila com ajuda da enzima T4 RNA *Ligase 2 Deletion Mutant*, em seguida acontece a ligação do adaptador 5' por meio da enzima T4 RNA *Ligase 2*.

A partir disso é realizada a síntese do cDNA mediante uma reação de transcrição reversa utilizando a enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen), seguida de uma reação de PCR utilizando um *primer* comum e um *primer* contendo uma das 48 sequências do index. O cDNA foi amplificado e analisado mediante o uso do chip *High Sensitivity DNA chip* (Agilent Technologies Genomics) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, foi realizada a montagem de *pools* de amostras para serem sequenciadas. Para isso, foram combinados volumes de 5 µl de cada uma das amostras.

Figura 3 - Processo de Preparação da Biblioteca de microRNAs mediante o uso do Kit Illumina TruSeq smallRNA Sample Prep (Adaptado do protocolo da Illumina: Truseq Small RNA Sample Preparation Guide)

4.6.1. Purificação de cDNA

Os *pools* das bibliotecas de microRNAs foram submetidos à electroforese em um gel de poliacrilamida (PAGE) 6% durante 60 minutos a 145 V para permitir a separação dos pequenos RNAs presentes nas amostras.

Uma vez terminada a corrida, os géis foram corados com *Syber Safe* (5µL/50µL de Tampão) durante 30 minutos e observados num transiluminador *Dark Reader* o qual permitiu visualizar as bibliotecas dos microRNAs.

Utilizando uma lâmina, foram cortadas as bandas que correspondiam aproximadamente às frações ligadas aos adaptadores de 60 nt, derivadas dos fragmentos de 22 e 30 nucleotídeos dos pequenos RNAs.

Para isto, se alinhou a lâmina com a parte superior da banda de 160 nt do *Custom Ladder*, e em seguida, com a parte inferior da banda de 145 nt, extraíndo o fragmento de gel.

4.6.2. Eluição do Gel

O fragmento do gel cortado foi colocado num microtubo de 0,5ml perfurado 3-4 vezes com uma seringa, o qual por sua vez foi colocado dentro de outro microtubo de 2mL. Subsequentemente, estes tubos foram levados a centrifugação a 20.000xg por 2 minutos a temperatura ambiente, obtendo-se assim a fragmentação do gel. A estes foram adicionados 300 µL de água ultrapura e incubados em agitador a temperatura ambiente durante 2 horas.

Após o processo de agitação, os pedaços de gel junto com a água foram transferidos para a parte superior de uma ponteira com filtro colocada dentro de um microtubo de 1,5 mL e centrifugados a 600xg por 10 segundos com a finalidade de permitir a retenção dos pedaços de gel pelo filtro da ponteira e a passagem da água contendo os microRNAs eluídos.

4.6.3. Concentração final da Biblioteca e precipitação dos microRNAs

A fração que contém os microRNAs foi precipitada adicionando 2 µL de Glicogênio, 30 µL de Acetato de Sódio 3M e 975 µL de Etanol 100% gelado, seguido de centrifugação a 20.000xg por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com 500 µL de Etanol 70% a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 20.000xg por 2 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* foi seco em banho seco a 37°C por 10 min., seguido de ressuspensão em 10 µL de água ultrapura.

4.6.4. Quantificação das Bibliotecas

As amostras foram quantificadas mediante uma reação de PCR em tempo real utilizando o *KAPA Library Quantification kit* (KAPA Biosystems). As concentrações das amostras foram calculadas por meio de uma regressão linear definidas pelas seis amostras padrões presentes no kit, e em seguida elas foram diluídas para 20 pM para posterior sequenciamento.

4.7. Sequenciamento

As amostras foram sequenciadas no equipamento *Illumina MiSeq* (sequenciamento *singled-end*), primeiramente utilizando o *MiSeq Reagent Nano Kit v2* adaptado para 50 ciclos, o que permite a geração de um milhão de *reads* por sequenciamento e posteriormente com a finalidade de aumentar a cobertura por amostra, as mesmas foram sequenciadas utilizando o *MiSeq Reagent Kit v3* – 150 ciclos, o que permite a geração de 25 milhões de *reads* como produtos do processo de sequenciamento. Em ambas situações, as leituras obtidas foram single reads de 36 pb.

Como durante a preparação das bibliotecas as amostras já foram ligadas aos adaptadores, isto permite a fixação delas ao suporte de sequenciamento por meio da hibridização com um dos adaptadores nele fixados. No primeiro ciclo de amplificação, os nucleotídeos não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento que se encontra imobilizado no suporte e, após isto, o fragmento forma uma estrutura em ponte com a superfície de sequenciamento para que ocorra a extensão da fita complementar também “em ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos várias vezes, de maneira que cada fragmento desta PCR de fase sólida permaneçam próximos para formar os clusters de sequenciamento. As etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada cluster. A alta densidade destes possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma

intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. A leitura das bases é feita mediante a análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010; SHENDURE; JI, 2008).

4.8. Análises dos dados de sequenciamento

A ferramenta *Consensus Assessment of Sequence and Variation* (CASAVA, Illumina – San Diego, EUA) foi utilizada para o processamento inicial dos dados. Esta ferramenta permite as análises das imagens brutas produzidas pelo sequenciamento determinando o ruído de cada uma dessas imagens, a leitura de cada uma das bases e o demultiplex das amostras (retirada dos index) assim como a transformação dos arquivos do formato *.Bcl ao formato *.Fastq.gz (arquivos FASTQ compactados). Uma vez descompactados os arquivos para o formato *.fastq, a determinação da qualidade das sequências foi feita mediante a utilização do programa FastQC (versão 0.9.5 - <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>).

Com base na qualidade das sequências de cada uma das amostras, as mesmas foram processadas pelo Cutadapt (versão 1.2.1 - <http://code.google.com/p/cutadapt/>). Este procedimento permitiu retirar a sequência de adaptador Illumina (AATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGC), o número mínimo de *missing bases* (número mínimo de bases necessárias sem “*match*” para o reconhecimento do adaptador) foi 3, qualidade ≥ 24 e tamanho mínimo da sequência ≥ 17 .

Uma vez realizada a limpeza e filtragem das amostras, as mesmas foram analisadas por meio do software mirDeep2 (FRIEDLÄNDER et al., 2012). Primeiramente, utilizando o módulo mapper.pl as sequências foram alinhadas contra o genoma de referência de *Bos taurus* versão UMD3.1.

Apenas os alinhamentos com zero *mismatches* na região *seed* (primeiros 18 nt da sequência) mapeada foram selecionadas.

Os microRNAs conservados e novos foram identificados mediante a utilização do módulo mirDeep2.pl. Para isto, as sequências maduras e precursoras dos microRNAs de *Bos taurus* em formato FASTA foram tomadas do miRBase

(versão 21). Também sequências de microRNAs maduros de espécies relacionadas como *Sus scrofa*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Equus caballus* em formato FASTA foram utilizadas como arquivos de entrada.

Entre os novos microRNAs que foram identificados pelo software mirDeep2, aqueles que tiveram uma relação de sinal-ruído de 10:1 foram mantidos. A quantificação dos microRNAs conservados detectados nas amostras foi feita mediante o módulo quantifier.pl.

4.9. Análises da expressão diferencial dos microRNAs

O pacote estatístico QuasiSeq (LUND et al., 2012) desenvolvido em R foi utilizado para a detecção dos microRNAs diferencialmente expressos nas amostras de animais com diferentes valores genéticos estimados para força de cisalhamento.

O QuasiSeq utiliza um método de quase-verossimilhança por meio do qual é incorporado um grau de incerteza nas variâncias estimadas durante o teste de expressão diferencial (LUND et al., 2012). O pacote inclui uma taxa de falsa descoberta (FDR) a qual é estimada utilizando o método de q valor, permitindo a adição de efeitos para o modelo linear generalizado inicial (STOREY; TIBSHIRANI, 2003). Isso inclui o efeito QLSpline que pode ajustar distribuições binomiais quase-negativas para explicar o excesso de dispersão comum para a quantidade de dados. Essa distribuição foi escolhida por causa da flexibilidade na modelagem de variâncias (LUND et al., 2012).

O arquivo .csv de saída do módulo quantifier.pl do mirDeep2 foi processado por meio de dois filtros antes da análise do QuasiSeq. Inicialmente, os microRNAs que apresentavam contagens de zero para todas as amostras foram removidos e os microRNAs que apresentavam uma contagem diferente de zero em pelo menos 1/5 das amostras foram mantidos. O procedimento PROC MIXED do SAS (Statistical Analysis System) foi executado para determinar os efeitos fixos significativos ($P < 0,05$) e covariáveis que foram usados na análise feita pelo pacote (CESAR et al., 2014). Assim, no modelo do QuasiSeq, a idade final dos animais (Idf) e o grupo de contemporâneos (GC, animais do mesmo ano de

experimento, fazenda e grupo de abate) foram utilizados como covariável e efeito fixo respectivamente, e o valor da força de cisalhamento aos 14 dias (FC14), como a variável de interesse.

A normalização dos dados para atender às diferenças na quantidade de partida de RNA e outros efeitos na preparação da biblioteca foi realizada usando o método *Upper Quartile* (BULLARD et al., 2010).

4.10. Predição de genes alvos e Análises Funcional

A predição de genes alvo dos microRNAs diferencialmente expressos foi feita utilizando a ferramenta *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>), onde a espécie escolhida foi *Bos taurus* e os nomes dos microRNAs diferencialmente expressos foram usados como dados de entrada para a análise.

A partir do resultado obtido, apenas os genes expressos no tecido muscular foram mantidos. A lista de genes expressos no músculo faz parte dos resultados de uma pesquisa anterior feita pelo nosso grupo de trabalho do Laboratório de Biotecnologia Animal, onde foram estudados os mesmo animais (GONÇALVES; 2015).

Assim a lista de genes obtida foi submetida ao IPA Core Analysis do software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA® QIAGEN Redwood City, CA - www.qiagen.com/ingenuity) para o enriquecimento dos dados com o IPA Knowledge Base de maneira a permitir a descoberta de redes moleculares e vias metabólicas nas quais estão envolvidos os microRNAs identificados como diferencialmente expressos para o fenótipo de maciez.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos Animais

A estimativa dos valores do EBVSF aos 14 dias de maturação resultou na seleção de 34 animais extremos. Os resultados mostraram que os valores médios de SF e EBVSF14 foram respectivamente de $6,52 \pm \text{kgf/cm}^2$ e $0,63 \pm \text{kgf/cm}^2$ para os animais do grupo H e $2,73 \pm \text{kgf/cm}^2$ e $-0,62 \pm \text{kgf/cm}^2$ para os animais do grupo L. Obtendo-se, dessa maneira, 19 animais no grupo L e 15 animais no grupo H.

5.2. Extração e quantificação de RNA

Após a seleção dos animais de acordo com os valores extremos de EBV para FC aos 14 dias, o RNA total das amostras do músculo *Logissimus dorsi* de cada animal foi extraído e quantificado por meio do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000. Os valores da quantificação estão presentes na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, onde também podem ser visualizados os valores de absorbância a 260 e 280 nm.

Estes valores correspondem aos comprimentos de onda em que a luz é absorvida pelos ácidos nucleicos e pelas proteínas respectivamente. A razão entre estes valores de absorbância (260/280) foi utilizada para avaliar a qualidade do RNA total extraído, considerando-se como desejáveis os valores próximos a 2.

Tabela 1 - Concentração em ng/μl, valores da absorbância a 260 e 280 nm e razão 260/280 do RNA total dos animais extremos de maciez realizada no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000

Amostra	Concentração de RNA ng/ul	A260	A280	260/280
31	466,3	11,66	6,16	1,89
35	664,4	16,61	8,05	2,06
44	716,7	17,92	8,45	2,12
68	531,7	13,29	6,78	1,96
69	731,7	18,29	9,40	1,95
71	625	15,63	7,73	2,02
76	1006,9	25,17	12,64	1,99
83	1124,3	28,11	14,34	1,96
88	796,8	19,92	9,87	2,02
89	1198,1	29,95	14,95	2,00
92	674,8	16,87	8,48	1,99
93	565,4	14,13	6,99	2,02
95	795,1	19,88	9,80	2,03
104	1039,8	25,99	11,63	2,24
130	959,7	23,99	11,65	2,06
141	695,6	17,39	9,22	1,89
145	461	11,53	5,63	2,05
151	836,1	20,90	10,80	1,94
152	1173,1	29,33	13,23	2,22
156	1230	30,75	15,23	2,02
181	439,1	10,98	5,38	2,04
186	1203,3	30,08	13,44	2,24
208	1188	29,70	13,82	2,15
212	1533,8	38,34	16,85	2,28
220	1437,5	35,94	15,97	2,25
223	579,2	14,48	6,99	2,07
248	722,5	18,06	8,21	2,2
249	663,4	16,58	7,34	2,26
255	1150	28,75	14,05	2,05
268	1203,4	30,09	14,32	2,1
286	760,3	19,01	8,72	2,18
288	1033,7	25,84	12,37	2,09
293	788,3	19,71	9,19	2,15
300	775	19,38	8,63	2,25

5.3. Determinação da qualidade do RNA total

A determinação da qualidade do RNA total extraído, mediante a utilização de gel de agarose 1% pode ser visualizado na Figura 4.

Figura 4 - Gel de agarose 1% mostrando o RNA total extraído das amostras do músculo *Longissimus dorsi* bovino

A recomendação do valor de integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA Integrity Number*) para a posterior construção das bibliotecas de microRNAs é de no mínimo 8. O RIN é uma ferramenta do software do equipamento Bioanalyzer, projetado para estimar a integridade das amostras de RNA total, não simplesmente determinada pela razão das bandas ribossômicas, mas sim, pelo traço electroforético completo do ARN da amostra o qual inclui a presença ou ausência de produtos de degradação.

Na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** está apresentado o resultado obtido pelo Bioanalyzer de uma das amostras, onde se verifica um RIN superior a 8, sendo que as amostras restantes apresentaram resultados similares.

Figura 5 - Representação da análise de uma amostra de RNA total extraído do músculo *Longissimus dorsi* bovino obtido pelo Bioanalyzer

5.4. Obtenção das bibliotecas de microRNAs

Após a ligação dos adaptadores, síntese de cDNA e amplificação por PCR, faz-se necessário separar os microRNAs de outras moléculas de pequenos RNAs regulatórios. Assim, foi realizado uma eletroforese em gel de poliacrilamida que permite visualizar todas as moléculas presentes na amostra (Figura 6). O gel foi cortado entre as bandas do padrão de peso molecular de 160 e 145 nt (fração D). A banda contendo os fragmentos de RNA de 22 nucleotídeos ligada com os dois adaptadores possui 147 nucleotídeos de comprimento, e a banda de 157 nucleotídeos contendo outros pequenos RNAs e também alguns microRNAs foi gerada a partir de fragmentos de aproximadamente 33 nucleotídeos.

Figura 6 - Biblioteca de pequenos RNAs a partir de RNA total, onde A indica: High Resolution Ladder, B: Custom RNA Ladder, C: Pool de Amostras, D: microRNAs, E: Outros pequenos RNAs no codificantes

5.5. Sequenciamento

A partir dos sequenciamentos das 34 amostras, foi gerado um total de 40.513.215 sequências (~1 milhão de sequências por amostra). Utilizando a ferramenta FastQC foi avaliada a qualidade dessas sequências, observando-se que as mesmas apresentavam um *phred score* > 30, entretanto algumas de baixa qualidade que poderiam ser produtos de contaminantes como ser *primers*,

vetores, etc. ainda precisavam ser removidas e para isto utilizou-se a ferramenta de limpeza Cutadapt. Este programa remove sequências de adaptadores de dados de sequenciamento de nova geração e é geralmente necessário quando o comprimento de leitura feito pelo sequenciador é maior que o comprimento da molécula a ser sequenciada, o qual se aplica especificamente ao caso desse estudo, onde as moléculas de microRNAs possuem aproximadamente 22 nucleotídeos e o sequenciamento é feito lendo até 36 bases.

Um total de 33.222.144 sequências foram mantidas (~82%) as quais foram alinhadas contra o genoma de referência *Bos taurus*-UMD3.1 e ~87% delas foram mapeadas (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Tabela 2 - Resultado da filtragem e alinhamento das amostras

Amostra	Grupo	(continuação)			
		Número de sequências totais	Número de sequências filtradas	Número de sequências alinhadas	% de sequências alinhadas
31	H	953.026	778.341	734.269	94,3%
35	L	1.276.092	1.099.799	912.271	82,9%
44	L	1.358.702	1.181.691	976.534	82,6%
68	L	1.594.597	1.440.653	1.234.234	85,7%
69	H	2.017.539	1.895.184	1.696.375	89,5%
71	L	1.520.288	1.366.208	1.215.800	89,0%
76	L	1.807.354	1.642.621	1.369.962	83,4%
83	H	853.194	612.761	573.292	93,6%
88	H	1.827.035	1.629.869	1.330.515	81,6%
89	L	1.017.064	632.713	587.320	92,8%
92	L	1.412.750	1.277.128	1.119.217	87,6%
93	L	1.607.153	1.443.571	1.216.446	84,3%
95	L	1.289.060	1.126.735	943.392	83,7%
104	H	1.070.514	892.678	778.134	87,2%
130	H	732.192	509.179	476.628	93,6%
141	L	752.934	471.481	432.670	91,8%
145	L	1.078.176	958.835	780.360	81,4%
151	L	1.834.375	1.251.970	1.177.333	94,0%
152	L	829.497	498.047	462.769	92,9%
156	H	1.342.653	1.205.165	980.711	81,4%
181	L	1.140.784	956.047	705.615	73,8%
186	L	794.788	668.662	588.889	88,1%
208	L	1.289.318	1.129.918	1.014.378	89,8%

Tabela 2 - Resultado da filtragem e alinhamento das amostras

(conclusão)

Amostra	Grupo	Número de sequências totais	Número de sequências filtradas	Número de sequências alinhadas	% de sequências alinhadas
212	H	744.149	623.300	557.099	89,4%
220	H	722.385	598.129	541.383	90,5%
223	L	949.439	771.087	574.154	74,5%
248	L	780.269	555.033	516.077	93,0%
249	H	944.644	633.264	591.842	93,5%
255	H	1.467.484	1.309.323	1.119.708	85,5%
268	L	1.386.462	849.640	794.854	93,6%
286	H	1.121.000	974.891	865.371	88,8%
288	H	819.280	589.266	557.088	94,5%
293	H	1.387.823	987.356	926.928	93,9%
300	H	791.195	661.599	586.801	88,7%

5.6. Identificação e quantificação de microRNAs conservados e novos

Com a finalidade de identificar os microRNAs conservados presentes nas amostras, as sequências foram comparadas com os microRNAs precursores e maduros do miRBase (Versão 21). No total foram identificados 447 microRNAs maduros que apresentavam uma contagem diferente de zero e destes, 308 microRNAs maduros apresentavam contagem diferente de zero em pelo menos 1/5 das amostras.

Entre os microRNAs detectados destacam-se um conjunto de microRNAs já descritos na literatura como específicos do músculo, os myomiRs (myo = muscle + miR = miRNA) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Tabela 3 - microRNAs específicos do músculo identificados nos animais do grupo com maiores e menores valores de EBVFC14 (Grupo H e L)

microRNA	Níveis de expressão normalizadas		Sequência madura
	Grupo H	Grupo L	
bta-miR-486	1.754.084,71	1.306.241,09	uccuguacugagcugcccgagg
bta-miR-133a	575.024,68	400.433,38	uuuggucccucaaccagcugu
bta-miR-1	417.275,36	306.385,93	uggaauguaaagaaguauguauu
bta-miR-206	15.403,29	10.915,25	uggaaugaaggaagugugugg
bta-miR-133b	14.232,50	9.769,81	uuuggucccucaaccagcu
bta-miR-208b	6.463,46	5.059,15	auaagacgaacaaaagguuuu
bta-miR-499	3.375,83	2.323,09	uuaagacuugcagugauguuu

Um microRNA é designado como específico de um tecido em particular, quando este é expresso em um nível 20 vezes maior nesse tecido, comparado com a média de expressão nos outros tecidos (LEE et al., 2008). Este conjunto inclui miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b, miR-486 e miR-499 (MCCARTHY, 2008; KIM et al., 2006; VAN ROOIJ; LIU. OLSON, 2008; CHEN, et al., 2006). miR-208b e miR-499 estão situados dentro de íntrons de genes de miosina (VAN ROOIJ; LIU; OLSON, 2008). Os pares (miR-1/ 133a-2, miR-1-2/133a-1 e miR-206/133b) são codificados por transcritos bicistrônicos em diferentes cromossomos e tem demonstrado que desempenham funções no controle da diferenciação e crescimento muscular (VAN ROOIJ; LIU; OLSON, 2008). O fator de resposta ao soro sanguíneo (SRF, na sigla em inglês) e o fator potenciador de miócitos 2 (MEF2) controlam a expressão dos dois primeiros pares de microRNAs. Estes exercem efeitos opostos nos processos mencionados acima, com o miR-1 jogando um papel pro-apoptótico e miR-133 desempenhando um papel anti-apoptótico na apoptose de cardiomiócitos (VAN ROOIJ; LIU; OLSON, 2008; LIU et al., 2007). Os miR-1 e miR-133 são evolutivamente conservados, e foram encontrados na maioria das espécies de animais, desde *Drosophila* até humanos (CHEN et al., 2006).

O miR-486 foi descrito como indutor da diferenciação de mioblastos por meio da regulação negativa de PAX7, um fator de transcrição necessário para a biogênese das células satélites do músculo e a especificação da linhagem miogênica (DEY; GAGAN; DUTTA, 2011). O miR-206, também é promotor da

diferenciação muscular, sendo que, um estudo prévio reportou que a inibição deste microRNA por oligonucleotídeos antissentido, impede a retirada dos mioblastos do ciclo celular e a diferenciação (KIM et al., 2006).

Outros microRNAs com altos níveis de expressão identificados neste estudo foram o miR-26a, o qual é induzido durante a regeneração do músculo esquelético (DEY et al., 2012) e o miR-378, o qual participa do desenvolvimento do músculo esquelético através da regulação da proteína morfogenética óssea 2 (BMP2, na sigla em inglês) e da proteína cinase 1 ativada por mitogénio (MAPK1) (HOU et al. 2012).

Para a identificação dos novos microRNAs presentes nas amostras, o *score* fornecido pela ferramenta utilizada para a descoberta (miRDeep2) foi adotado como um fator determinante, uma vez que ainda não existe um procedimento universalmente aceito para a identificação de novos miRNAs em dados de sequenciamento. Um total de 42 novos microRNAs estavam presentes nas amostras.

O ponto de corte utilizado pode variar, sendo que um ponto de corte baixo representa um compromisso entre a sensibilidade (menor número de falsos negativos) e a especificidade (mais falsos positivos) (COWLED et al., 2014; FRIEDLÄNDER et al., 2008).

Alguns pesquisadores sugerem que um ponto de corte ≥ 1 é um ponto de partida típico para a identificação de microRNAs (FRIEDLÄNDER et al., 2008). Por outro lado, outros pesquisadores propõem um ponto de corte correspondente a uma relação de predição de sinal-ruído > 10 (DHAHBI et al., 2011). Nós concluímos que para nossos dados, um ponto de corte de 4, o qual fornece uma relação de sinal-ruído de 19,1 e uma estimativa de acerto de $87 \pm 5\%$ foi a escolha mais adequada.

Os resultados observados na Tabela 4, para os novos microRNAs, foram obtidos após comparação com os microRNAs depositados no miRBase (Versão 21) para as espécies *Bos taurus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Sus scrofa* e *Equus caballus*. Estas espécies foram escolhidas de acordo com a relação filogenética relativamente próxima com *Bos taurus* verificado no banco de dados

de árvores filogenéticas de genes animais TreeFam
(<http://treefam.genomics.org.cn/>).

Tabela 4 - Novos microRNAs identificados nas amostras do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore com valores extremos de EBVFC14

(continuação)

Nome provisório	miRDeep2 score	Prob. de verdadeiro positivo	Contagem total de sequências	microRNA com a mesma sequência seed	Sequência madura
10_364	282,9	93 +/- 6%	553	-	aaaacccgaaugaacuuuuugg
29_8151	178,6	93 +/- 6%	348	mmu-miR-7222-3p	cccaggacccggagcaggcugcgc
28_7720	150	93 +/- 6%	285	hsa-miR-6732-3p	aaaccugaacgaacuuuuugg
8_13333	79,3	93 +/- 6%	148	ssc-miR-7140-5p	aaacucaaaacaaacuuuuuggu
1_4945	68,2	93 +/- 6%	132	-	aaaaaaguuuuguuuggauuuuu
13_1835	39,2	93 +/- 6%	68	hsa-miR-548s	uuggccaaaaaguucggguuuu
17_3061	27,5	93 +/- 6%	44	hsa-miR-6815-3p	uggcuucuuuggaacauggcgg
4_11177	21,1	93 +/- 6%	39	-	acacgcguccuuggaaccugacu
21_5320	19,5	93 +/- 6%	29	hsa-miR-676-3p	uuguccuacuucucagcugucu
13_1712	19,5	93 +/- 6%	29	hsa-miR-363-5p	uggguggauggagcagcacugccu
8_13133	18,6	93 +/- 6%	34	-	caaaaaguuuugcuuggguuuuu
3_10543	17,2	93 +/- 6%	24	hsa-miR-637	acuggggguugagaaugucgcu
26_7237	14,3	93 +/- 6%	18	hsa-miR-203b-5p	caguggucucugcugagagccu
26_7098	13,2	93 +/- 6%	18	hsa-miR-4269	acaggcacggccaguugagc
1_5026	11,9	93 +/- 6%	20	-	caccuagugcauggucuuugggc
10_736	9,3	93 +/- 6%	16	-	aaacuugaaugaaccuuuuuggc
12_1319	8,7	94 +/- 5%	16	-	acaaccugaaugaacaauuuugg
13_1627	8,2	94 +/- 5%	14	-	ggccacaaaguucguuuuggguuu
19_4077	8,1	94 +/- 5%	19	-	uuggcuaggagggaugcugaac
16_2804	7,9	94 +/- 5%	15	-	acucgaacgaauuuuuggcca
15_2516	7,7	94 +/- 5%	5	eca-miR-9161	ccgggccugggccgagcccca
7_12438	6,8	94 +/- 5%	5	mmu-miR-7240-5p	cuggagagcggaggauguaga
12_1294	6,3	94 +/- 5%	11	mmu-miR-7656-3p	ccaggcuguuggaauugugacc
6_12227	5,6	93 +/- 4%	9	hsa-miR-6746-5p	ucgggagacggcugacggcc
10_691	5,5	93 +/- 4%	45	eca-miR-542-5p	uucggggaaggcugucagagc
5_11691	5,4	93 +/- 4%	46	hsa-miR-4733-3p	ccaccaggccuguggcuccgcca
3_10734	5,4	93 +/- 4%	12	eca-miR-9153	ccuccaggguaggagguggu
22_5973	5,4	93 +/- 4%	51	eca-miR-191b	gaacgaaauccaagcgcagcug
11_963	5,3	93 +/- 4%	16	eca-miR-873	ccaggaacugucugauugccu
10_100	5,3	93 +/- 4%	36	hsa-miR-7113-5p	cccggggauguaguccuagugc
7_12466	5,3	93 +/- 4%	66	mmu-miR-1950	ucugcauccgaggacucaaccc
20_5218	5,2	93 +/- 4%	1301	eca-miR-9075	uuaggaccagaaagauuggugaac
7_13029	5,1	93 +/- 4%	8	-	Ugagaggucuguaauaaciaac

Tabela 4 - Novos microRNAs identificados nas amostras do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore com valores extremos de EBVFC14

(conclusão)

Nome provisório	miRDeep2 score	Prob. de verdadeiro positivo	Contagem total de sequências	microRNA com a mesma sequência seed	Sequência madura
10_506	5	93 +/- 4%	44	eca-miR-423-5p	ugaggggcagagagugagaa
25_6958	5	93 +/- 4%	11	hsa-miR-30c-2-3p	uugggagaccaggggaagacu
12_1545	4,9	87 +/- 5%	14	hsa-miR-185-3p	Aggggcugugaguccggaugauuc
18_3758	4,9	87 +/- 5%	30	mmu-miR-5615-3p	Ugucucaguucagcaggaag
7_12693	4,8	87 +/- 5%	17	hsa-miR-6808-3p	Cugugaccaagauacugagccu
22_5785	4,2	87 +/- 5%	37	hsa-miR-345-3p	Acccugaacgaacuuuuuggc
16_2758	4,1	87 +/- 5%	9	hsa-miR-548d-3p	Aaaaaaccgaguggacuuiuug
17_3091	4	87 +/- 5%	8	hsa-miR-6787-3p	Ccucagcuaaaggucgaccggc
1_5058	4	87 +/- 5%	5	-	Ucuccaugcuguuggcucugccu

Nota-se nos resultados obtidos que vários dos microRNAs descobertos apresentam a mesma sequência *seed* (região de 2-8nt do final 5' do miRNA, importante para reconhecimento e silenciamento do RNAm alvo) que alguns microRNAs já anotados no miRBase para as espécies utilizadas na comparação.

As sequências precursoras e a estrutura secundária dos novos microRNAs identificados foram preditas. Os 5 microRNAs novos mais abundantemente expressos são mostrados na Figura 7.

Figura 7 - Predição da estrutura secundária dos cinco novos microRNAs com maior expressão. A cor azul e púrpura indicam as sequências star, a cor laranja indica a sequência de loop e a cor vermelha indica a sequência madura do microRNA

5.7. Identificação de microRNAs diferencialmente expressos, predição de genes alvos e redes funcionais

O pacote estatístico QuasiSeq identificou 3 microRNAs diferencialmente expressos entre os animais do grupo H e L, utilizando o critério de FDR (false discovery rate) menor que 0.1 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Tendo em consideração os valores de contagens normalizados para os animais presentes em cada grupo, observou-se que os 3 microRNAs apresentavam uma maior expressão (*up regulated*) no grupo de animais com menores valores de EBV para força de cisalhamento ao 14 dias (Grupo L). Nesta

análise não foi possível a estimação do valor de *Fold Change* destes microRNAs, dado que o pacote QuasiSeq não permite esta estimativa, devido à utilização de co-variáveis no modelo.

Tabela 5 - MicroRNAs diferencialmente expressos entre animais do grupo com maiores e menores valores de EBVFC14 (Grupo L e H). Os valores de q valor foram ajustados de acordo com o procedimento do Storey e Tibshirani

microRNA	Media de contagens normalizadas		q valor
	Grupo H	Grupo L	
bta-miR-182	3,6258358	9,9091687	1,67E-06
bta-miR-183	2,7302276	6,9753879	0,000116092
bta-miR-338	45,5285192	72,413476	0,000291747

Para compreender as potenciais funções dos microRNAs diferencialmente expressos, os genes alvos de cada um deles foram preditos no website TargetScan. Cada uma das listas de genes dos 3 microRNAs foram posteriormente filtradas, de maneira a conduzir as análises apenas com a lista de genes alvos expressos no músculo. (Figura 8).

Figure 8 - Genes alvos preditos para bta-mir-182, bta-mir-183 e bta-mir-338 em todos os tecidos e no tecido muscular esquelético (Músculo *Longissimus dorsi*) especificamente

Como resultado, para bta-mir-182, bta-mir-183 e bta-mir-338 foram previstos, respectivamente, 811, 281 e 222 genes alvos, correspondendo a 1204 genes após a remoção dos repetidos entre eles. Finalmente, um total de 4 genes (MEF2C, MAP3K2, MTDH e TNRC6B) foram encontrados como alvos comuns dos 3 microRNAs diferencialmente expressos (Figura 9).

Figura 9 - Diagrama de Venn dos genes alvos comuns e específicos preditos para os microRNAs diferencialmente expressos

Em seguida, o estudo de enriquecimento funcional a partir da lista de genes alvos preditos anteriormente foi realizado no programa Ingenuity® Pathway Analysis. Todos os genes foram mapeados com o IPA Knowledge Base, o que nos permitiu revelar quais moléculas estavam sendo codificadas por estes genes (Tabela 6).

Tabela 6 - Moléculas codificadas pelos genes alvos dos microRNAs diferencialmente expressos

Tipo de Molécula	Número de genes alvos por microRNA		
	bta-mir-182	bta-mir-183	bta-mir-338
Quinasse	54	26	17
Transportador	53	19	14
Peptidase	15	5	9
Enzima	121	36	28
Receptor acoplado à proteína-G	11	4	0
Regulador da transcrição	100	33	31
Regulador da tradução	14	4	4
Receptor nuclear	5	3	1
Receptor trans-membrana	8	4	7
Fator de crescimento	6	1	1
Canal iônico	24	6	3
Fosfatase	19	9	9
Citosina	3	0	0
Outros	378	131	98

Estes genes foram posteriormente submetidos ao Core Analysis do IPA (análise funcional), e os resultados mostraram que expressão gênica, desenvolvimento celular, morfologia celular, montagem celular e organização celular e função e manutenção celular foram ranqueadas como as funções moleculares e celulares mais significativas ($p < 0,05$) (Figura 10).

Figura 10 - Funções celulares e moleculares do total de genes alvos preditos para os microRNAs diferencialmente expressos. A associação entre os genes e as funções biológicas é representada como $-\log(p\text{-valor})$. As barras de maior extensão são mais significativas que as barras de menor extensão considerando um $p\text{-valor} < 0,05$ como ponto de corte (representado na linha laranja de "threshold")

As redes moleculares mais significativas foram relacionadas com câncer, modificação pós-traducional, morfologia celular, bioquímica de pequenas moléculas, metabolismo de ácidos nucleicos e metabolismo de vitaminas e minerais. Um resumo detalhado destas redes identificadas para os 1204 genes em conjunto pode ser visualizado na Tabela 7, enquanto que a discriminação das vias de genes alvos preditos para cada microRNA individualmente, pode ser visualizada nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 7 - Redes e funções relacionadas dos 1204 genes alvos preditos para os 3 microRNAs diferencialmente expressos. ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede

(continuação)

ID	Score	Moléculas	Principais Funções
1	50	35	Câncer, Anormalidades e Danos do Organismo, Doenças do Sistema Reprodutivo
2	42	32	Modificação Pós-Traducional, Morfologia Celular, Movimento Celular
3	37	30	Metabolismo dos Carboidratos, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Hereditariedade, Doenças
4	37	30	Modificação Pós-Traducional, Doenças e Condições Dermatológicas, Doenças Inflamatórias
5	37	31	Metabolismo do Ácido Nucleico, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Metabolismo de Vitaminas e Minerais
6	37	30	Sinalização e Interação Célula-Célula, Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso, Ciclo Celular
7	35	29	Doenças de Desenvolvimento, Doenças Hereditárias, Doenças Neurológicas
8	35	29	Manutenção e Funções Celulares, Metabolismo Lipídico, Bioquímica de Pequenas Moléculas
9	35	29	Sinalização e Interação Célula-Célula, Metabolismo de Carboidratos, Metabolismo Lipídico
10	33	28	Metabolismo Lipídico, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Transporte Molecular
11	31	27	Desenvolvimento Celular, Crescimento e Proliferação Celular, Desenvolvimento de Doenças
12	31	27	Modificação Pós-Traducional, Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso, Morfologia dos Tecidos
13	29	26	Desenvolvimento do Organismo, Sinalização Celular, Modificação Pós-Traducional
14	29	26	Doenças de Tecidos Conectivos, Doenças Imunológicas, Doenças Inflamatórias
15	29	26	Sobrevivência e Morte Celular, Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso
16	27	25	Montagem e Organização Celular, Manutenção e Funções Celulares, Síntese de Proteínas
17	27	25	Movimento Celular, Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso, Doenças Hereditárias
18	26	24	Sinalização Celular, Morfologia de Tecidos, Desenvolvimento Embrionário

Tabela 7 - Redes e funções relacionadas dos 1204 genes alvos preditos para os 3 microRNAs diferencialmente expressos. ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede (conclusão)

ID	Score	Moléculas	Principais Funções
19	26	24	Expressão Génica, Metabolismo de Aminoácidos, Bioquímica de Pequena Moléculas
20	26	24	Expressão Génica, Sinalização Celular, Desenvolvimento e Funções do Sistema Cardiovascular
21	26	24	Doenças Cardiovasculares, Anormalidades e Danos do Organismo, Doenças de Desenvolvimento
22	26	24	Diminuição de Glutathione no Fígado, Fibrose do Fígado, Metabolismo de Aminoácidos
23	25	24	Sinalização e Interação Célula-Célula, Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso, Transporte Molecular
24	25	26	Morfologia Celular, Modificação Pós-Traducional, Montagem e Organização Celular
25	24	23	Comportamento, Morfologia dos Órgãos, Desenvolvimento e Funções do Sistema Reprodutivo

Tabela 8 - Redes e funções relacionadas dos genes alvos preditos para bta-mir-182. ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede (continuação)

ID	Score	Moléculas	Principais Funções
1	45	31	Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento do Organismo, Desenvolvimento dos Tecidos
2	43	30	Metabolismo de Carboidratos, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Modificação Pós-Traducional
3	40	29	Modificação Pós-Traducional, Manutenção e Função Celular, Interação e Sinalização Célula-Célula
4	40	29	Montagem e Organização Celular, Desenvolvimento e Funções da Pele e Pêlos, Câncer
5	36	27	Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento do Organismo, Desenvolvimento dos Tecidos
6	34	26	Sinalização Celular, Desenvolvimento e Função do Esqueleto e Muscular, Desenvolvimento Embrionário
7	34	26	Metabolismo de Aminoácidos, Organização e Montagem Celular, Manutenção e Funções Celulares
8	33	26	Organização e Montagem Celular, Manutenção e Funções Celulares, Desenvolvimento de Tecido
9	33	26	Interação e Sinalização Célula-Célula, Morfologia Celular, Organização e Montagem Celular

Tabela 8 - Redes e funções relacionadas dos genes alvos preditos para bta-mir-182. ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede

(conclusão)

ID	Score	Moléculas	Principais Funções
10	33	26	Morfologia Celular, Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso, Morfologia dos Tecidos
11	32	25	Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento e Estrutura do Tecido Linfoide, Desenvolvimento de Órgãos
12	32	25	Sobrevivência e Morte Celular, Desenvolvimento Celular, Manutenção e Funções Celulares
13	30	24	Expressão Génica, Síntese Proteica, Câncer
14	28	23	Câncer, Anormalidade e Danos do Organismo, Desenvolvimento Celular
15	26	22	Interação e Sinalização Célula-Célula, Desenvolvimento e Funções Renais e Urológicas, Organização e Montagem Celular
16	25	22	Expressão Génica, Morfologia Celular, Função e Desenvolvimento do Sistema Nervoso
17	24	21	Desenvolvimento Embrionário, Morfologia dos Tecidos, Doenças de Desenvolvimento
18	24	21	Movimento Celular, Desenvolvimento Embrionário, Doenças de Desenvolvimento
19	23	21	Morfologia dos Tecidos, Desenvolvimento Embrionário, Funções e Desenvolvimento do Sistema Nervoso
20	23	20	Expressão Génica, Doenças Infecciosas, Anormalidade e Danos do Organismo
21	26	24	Doenças Cardiovasculares, Anormalidades e Danos do Organismo, Doenças de Desenvolvimento
22	26	24	Diminuição de Glutathione no Fígado, Fibrose do Fígado, Metabolismo de Aminoácidos
23	25	24	Sinalização e Interação Célula-Célula, Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso, Transporte Molecular
24	25	26	Morfologia Celular, Modificação Pós-Traducional, Montagem e Organização Celular
25	24	23	Comportamento, Morfologia dos Órgãos, Desenvolvimento e Funções do Sistema Reprodutivo

Tabela 9 - Redes e funções relacionadas dos genes alvos preditos para bta-mir-183. ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede

(continuação)

ID	Score	Moléculas	Principais Funções
1	41	24	Câncer, Anormalidades e Danos do Organismo, Organização e Montagem Celular
2	35	22	Doenças Infecciosas, Expressão Génica, Interação e Sinalização Célula-Célula
3	34	21	Metabolismo de Aminoácidos, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Desenvolvimento e Funções do Sistema Cardiovascular
4	34	21	Desenvolvimento e Funções do Sistema Digestivo, Doenças do Tecido Conectivo, Doenças de Desenvolvimento
5	32	20	Desenvolvimento Celular, Doenças do Tecido Conectivo, Desenvolvimento de Tecido
6	29	19	Organização e Montagem Celular, Compromisso Celular, Movimento Celular
7	25	17	Morfologia Celular, Organização e Montagem Celular, Ciclo Celular
8	24	16	Metabolismo do Ácido Nucleico, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Metabolismo de Vitaminas e Minerais
9	22	15	Interação e Sinalização Célula-Célula, Desenvolvimento Celular, Crescimento e Proliferação Celular
10	20	14	Doenças de Desenvolvimento, Doenças Hereditárias
11	18	14	Câncer, Anormalidades e Danos do Organismo, Doenças do Sistema Reprodutor
12	17	13	Desenvolvimento e Funções do Sistema Nervoso, Desenvolvimento Celular, Desenvolvimento Embrionário
13	16	12	Metabolismo de Medicamentos, Metabolismo Lipídico, Transporte Molecular
14	16	12	Doenças de Desenvolvimento, Doenças Hereditárias, Doenças Imunológicas
15	15	12	Metabolismo Lipídico, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Metabolismo de Vitaminas e Minerais
16	13	12	Sinalização Celular, Replicação do DNA, Recombinação e Reparo, Metabolismo do Ácido Nucleico
17	12	10	Funções e Desenvolvimento do Sistema Endócrino, Metabolismo Lipídico, Bioquímica de Pequenas Moléculas

Tabela 9 - Redes e funções relacionadas dos genes alvos preditos para bta-mir-183. ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede

(conclusão)

ID	Score	Moléculas	Principais Funções
18	2	1	Modificação Pós-Traducional, Doenças Hereditárias, Doenças Neurológicas
19	2	1	Metabolismo Lipídico, Bioquímica de Pequenas Molécula, Transporte Molecular

Tabela 10 - Redes e funções relacionadas dos genes alvos preditos para bta-mir-338 ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede

(continuação)

ID	Score	Moléculas	Principais Funções
1	52	27	Desenvolvimento Embrionário, Desenvolvimento do Organismo, Desenvolvimento dos Tecidos
2	39	22	Desenvolvimento e Funções do Sistema Cardiovascular, Morfologia dos Órgãos, Desenvolvimento do Organismo
3	36	21	Desenvolvimento dos Tecidos, Crescimento e Proliferação Celular, Desenvolvimento Embrionário
4	34	22	Morfologia Celular, Montagem e Organização Celular, Desenvolvimento Celular
5	25	16	Doenças de Desenvolvimento, Doenças do Sistema Endócrino, Doenças Hereditárias
6	24	16	Sinalização e Interação Célula-Célula, Desenvolvimento e Funções do Tecido Conectivo, Desenvolvimento e Funções do Esqueleto e Sistema Muscular
7	21	14	Replicação do DNA, Recombinação e Reparo, Doenças de Desenvolvimento, Doenças Hereditárias
8	21	14	Metabolismo do Ácido Nucleico, Bioquímica de Pequenas Moléculas, Metabolismo de Vitaminas e Minerais
9	19	13	Desenvolvimento e Funções do Sistema Cardiovascular, Desenvolvimento Celular, Crescimento e Proliferação Celular
10	15	11	Resposta Inflamatória, Doenças do Tecido Conectivo, Doenças Dentais
11	15	11	Morfologia Celular, Desenvolvimento e Funções do Tecido Conectivo, Desenvolvimento e Funções do Esqueleto e Sistema Muscular
12	15	11	Expressão Génica, Morfologia Celular, Manutenção e Funções Celulares
13	12	10	Morfologia Celular, Resposta Inflamatória, Sobrevivência e Morte Celular
14	10	8	Modificação Pós-Traducional, Degradação de Proteína, Síntese de Proteína

Tabela 10 - Redes e funções relacionadas dos genes alvos preditos para bta-mir-338. ID representa o N° da rede, Score significa o número de genes presentes na rede e Moléculas indica o número de genes alvos presentes na rede

(conclusão)			
ID	Score	Moléculas	Principais Funções
15	2	1	Câncer, Doenças do Tecido Conectivo, Doenças de Desenvolvimento
16	2	1	Comportamento, Câncer, Doenças Cardiovasculares
17	2	1	Ciclo Celular, Desenvolvimento e Funções do Sistema Respiratório, Desenvolvimento Celular

Entre estas funções, várias foram relacionadas com as vias canônicas significativas identificadas neste estudo, como a via de sinalização da apoptose, sinalização de cálcio, a biossíntese da glutatona, a regulação dos mecanismos celulares por meio da protease calpaína e o transporte de cálcio, as quais corroboram com o descrito na literatura relacionado com o fenótipo estudado aqui.

A apoptose é um processo de grande importância para o desenvolvimento e a homeostase do tecido. O sistema de cascatas de caspases desempenha um papel vital na indução, amplificação e transdução dos sinais apoptóticos intracelulares (FAN et al., 2005). As caspases são proteínas da família de proteases cisteína aspartato-específicas, subdivididas em função da sua localização na via da apoptose: em caspases iniciadoras da apoptose (caspases 8,9,10 e 12) e caspases efetoras (caspases 3,6 e 7) (EARNSHAW; MARTINS; KAUFMANN, 1999).

Foi relatado que a apoptose mediada por estas proteínas (as quais são ativadas post-mortem) contribui para o processo de maciez da carne (SENTANDREU; COULIS; OUALI, 2002; OUALI et al. 2006).

É bem sabido que a apoptose constitui um mecanismo complexo, o qual envolve a interação de vários sistemas, entre estes, o sistema redox, as cascatas de proteínas quinases ativadas por estresse e a via de sinalização de cálcio (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000). Baseado nisto, é importante destacar a relação observada dentro da via de sinalização da apoptose, entre a proteína caspase e a proteína anti-apoptótica Bcl-2, identificada neste estudo. (Figura 11).

Figura 11 - Moléculas alvos de bta-mir-182 envolvidas na via de sinalização da apoptose. Linhas sólidas indicam uma conexão direta, enquanto que linhas quebradas indicam uma relação indireta.

Evidências anteriores reportam que, quando ocorre um aumento da concentração intracelular do cálcio na apoptose, acontece a ativação de calpaínas, que por sua vez bloqueiam a família de proteínas Bcl-2 (GIL-PARRADO et al., 2002). Também é verificado que a perturbação na homeostase do cálcio no retículo endoplasmático pode levar a ativação da caspase 12 pela calpaína, onde a proteína anti-apoptótica Bcl-XL é clivada pela calpaína transformando-a em uma proteína pro-apoptótica (NAKAGAWA; YUAN, 2000).

Considerando esses fatos, nós sugerimos que a maior expressão do bta-mir-182 nos animais com menores valores de EBVFC14 pode estar diminuindo os níveis da proteína anti-apoptótica BCL2, de maneira a promover o processo de

apoptose que estaria por sua vez contribuindo com a proteólise muscular e a maciez da carne (Figura 12).

Figura 12 - Quadro comparativo apresentando a via de sinalização que acontece na célula e a regulação que o bta-mir-182 pode estar exercendo na via de sinalização da apoptose nos animais analisados neste estudo

Na via de sinalização da apoptose, é também possível observar, a presença da proteína ROCK-1, uma serina/treonina quinase, descrita como um substrato direto da caspase-3 na condução da apoptose dos miócitos (CHANG et al., 2006).

Outra via importante identificada neste estudo foi a via de biossíntese da glutatona. A glutatona é um tripéptido contendo cisteína, glutamina e glicina, envolvida no sistema antioxidante e estado redox intracelular, podendo estar presente na célula em duas formas: a glutatona reduzida (GSH) e a glutatona oxidada (GSSG), sendo que, a razão entre as duas formas permite a caracterização do estresse oxidativo nas células (NOLLET; TOLDRÁ, 2009).

D'Alessandro e colaboradores (2012) num estudo com o gado Chianina descreveram um acúmulo de estresse oxidativo nas amostras de carne macia, quando as razões de GSSG/GSH foram maiores do que nas carnes mais duras. O estresse oxidativo poderia estar relacionado à maciez da carne devido à promoção

de espécies reativas de oxigênio (ROS) ao induzir a fragmentação das proteínas (D'ALESSANDRO et al., 2012).

A maior expressão do bta-mir-183, encontrada neste estudo, pode estar regulando negativamente seu gene alvo, a Glutamato-cisteína-ligase (GCLM) uma enzima limitante da síntese de glutathiona, reduzindo dessa maneira a biossíntese de GSH, o que pode aumentar as ROS, estimulando a apoptose e, consequentemente contribuindo para a maciez da carne (Figura 13).

Figura 13 - Quadro comparativo apresentando a via de sinalização que acontece na célula e a regulação que o bta-mir-182 pode estar exercendo na via de Biossíntese da Glutathiona nos animais analisados neste estudo

Neste contexto, é importante desatacar também que, em outra pesquisa previa utilizando os mesmos animais e fenótipos, um QTL para força de cisalhamento às 24 horas foi identificado localizado no cromossomo bovino 23 (BTA23) aos 24 Mb, uma região contendo a Glutathiona S-transferase. (TIZIOTO et al., 2013).

Outra molécula de grande interesse também encontrada neste estudo foi a proteína calpastatina (CAST), inibidor da enzima proteolítica calpaína. A calpastatina foi predita como gene alvo do bta-mir-182, sugerindo que o alto nível de expressão deste microRNA pode reduzir a tradução do gene CAST, resultando num menor efeito inibitório da calpaína, maior atividade proteolítica post-mortem e consequentemente maior maciez. A Figura 14 apresenta as interações entre estas moléculas em uma das redes identificadas como associadas à morfologia de tecido.

© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 14 - Rede identificada para os genes alvos do bta-mir-182 associadas à função de morfologia de tecido. Observa-se o sistema calpaína-calpastatina. Linhas sólidas indicam uma conexão direta, enquanto que linhas quebradas indicam uma relação indireta

Os pesquisadores sugerem que a calpaína, constitui provavelmente a família de proteases mais pesquisadas no que diz a ciência da carne, sendo amplamente aceito que a atividade proteolítica desta proteína contribui à maciez (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006; SENTANDREU; COULIS; OUALI, 2002).

Um estudo prévio mostrou que as correlações entre as diferentes taxas de amaciamento das carnes de bovino, de cordeiro e porco tem uma relação inversamente proporcional à razão de calpastatina:calpaína nessas carnes (KOOHMARAIE et al., 1991). Assim, um modelo de maciez da carne considera que, além da ativação da calpaína pelo incremento da concentração de cálcio livre, são também de grande importância para o processo de amaciamento post-mortem: a inibição da calpaína pela calpastatina e a inativação por autólitese das calpaínas e calpastatinas (DRANSFIELD, 1993).

Outras moléculas importantes já descritas na literatura como associadas à maciez e identificadas nas vias metabólicas deste estudo foram: o colágeno, proteína a qual atribui-se 15% da variabilidade na maciez da carne bovina junto com o marmoreio (KOOHMARAIE, 1992) e as proteínas HSP27 e HSP70 do grupo das proteínas de choque térmico (do inglês heat shock proteins, HSP) (BOULEY et al., 2004).

Nossos resultados corroboram com pesquisas anteriores, onde níveis baixos de HSP27 foram associados a animais de carne mais macia nas raças Charolais e Sallers (BOULEY et al., 2004) e onde ambas proteínas (HSP70 e HSP27) apareceram com menor abundância em animais com menores valores para força de cisalhamento em um estudo de proteômica com os mesmos animais utilizados neste trabalho (CARVALHO et al., 2014).

O fundamento desta relação negativa evidenciada entre os níveis de HSP e maciez da carne poderia estar vinculada com a atividade anti-apoptótica destas proteínas (Figura 15).

Figura 15 - Redes identificada para os genes alvos do bta-mir-338 mostrando a interação entre as proteínas de choque térmico. Linhas sólidas indicam uma conexão direta, enquanto que linhas quebradas indicam uma relação indireta

Com relação aos alvos comuns identificados para os 3 microRNAs diferencialmente expressos, destacam-se o fator potenciador específico de miócito 2C (MEF2C) e a proteína quinase 2 ativada por mitógeno (MAP3K2).

Entre os fatores de transcrição MEF2, os transcritos MEF2C são restritos para o músculo esquelético, cérebro e baço, desempenhando um papel crucial na morfogênese e miogênese das células. Um estudo anterior identificou variações genéticas deste gene em sete diferentes raças de gado, tais como, Aberdeen Angus, Charolais, Hereford, Limousin, Simental, Polish Friesian e Polish Red, as quais segundo Juszczuk-Kubiak et al. (2011) poderiam constituir-se como

potenciais marcadores genéticos para as características de carcaça e qualidade de carne em bovinos.

O gene MAP3K2, por sua vez, relacionou-se em várias redes deste estudo com membros da família de fator de regulação miogênica (MRF), como o fator Miogênico 5 (Myf5) e o fator de diferenciação miogênica 1 (MYOD1).

Segundo descrito na literatura, destacam-se entre as funções destes fatores, a regulação da miogênese e a diferenciação do músculo esquelético (MUROYA; NAKAJIMA; CHIKUNI, 2002) considerando-os assim, segundo DU et al. (2013) e ROBAKOWSKA-HYZOREK et al. (2010), candidatos adequados para marcadores moleculares de características de crescimento e produção de carne em animais domésticos, incluindo bovinos.

6. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu a identificação de 447 microRNAs conhecidos e 42 microRNAs novos no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos da raça Nelore, conseguindo, dessa maneira, ampliar o repertório de microRNAs já identificados para *Bos taurus*.

A análise de expressão dos microRNAs entre os animais com valores extremos de EBV para força de cisalhamento aos 14 dias, identificou 3 microRNAs (bta-mir-182, bta-mir-183 e bta-mir-338) como diferencialmente expressos nos animais com menores valores de EBVFC14, sugerindo assim, que estes microRNAs desempenham um papel importante na regulação do complexo processo da maciez da carne. Foram preditos, além disso, vários genes alvos que demonstraram interagir nas vias e redes metabólicas relacionadas à maciez, como a via da apoptose, a via da glutathione e o sistema calpaína-calpastatina.

Os resultados obtidos neste estudo ajudarão a compreender os mecanismos de regulação que influenciam a característica de maciez da carne num nível pós-transcricional.

7. REFERÊNCIAS

- ALVES, D.D.; MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina: uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiana**, v.14, n.1, p.193-216, 2007.
- ALLAIS, S.; LEVÉZIEL, H.; HOCQUETTE, J.F.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C.; JOURNAUX, L.; RENAND, G. Fine mapping of quantitative trait loci underlying sensory meat quality traits in three French beef cattle breeds. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 92, n. 10, p. 4329–4341. 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp#>. Acesso em: 25 Ago. 2015.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 1, n.1, p. 11-21, 2000.
- BOULEY, J.; MEUNIER, B.; CULIOLI, J.; PICARD, B. Proteomic analysis applied to the research of tenderness markers. **Rencontre Recherches Ruminants**, Paris v. 11, p. 87-89, 2004
- BULLARD, J.H.; PURDOM, E.; HANSEN, K.D.; DUDOIT, S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. **BMC Bioinformatics**, London, v. 11, n. 94, doi:10.1186/1471-2105-11-94, 2010.
- CARVALHO, M.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n.3, p. 735–744, 2010.
- CARVALHO, M.E.; GASPARIN, G.; POLETI, M.D.; ROSA, A.F.; BALIEIRO, J.C.C.; LABATE, C.A.; NASSU, R.T.; TULLIO, R.R.; REGITANO, L.C.; MOURÃO, G.B.; COUTINHO, L.L. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a Bos indicus breed. **Meat Science**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 1318-1324, 2014.
- CESAR, A.S.; REGITANO, L.C.; MOURÃO, G.B.; TULLIO, R.R.; LANNA, D.P.; NASSU, R.T.; MUDADO, M.A.; OLIVEIRA, P.S.; DO NASCIMENTO, M.L.; CHAVES, A.S.; ALENCAR, M.M.; SONSTEGARD, T.S.; GARRICK, D.J.; REECY, J.M.; COUTINHO, L.L. Genome-Wide Association Study for Intramuscular Fat Deposition and Composition in Nellore Cattle. **BMC genetics**, London, v.15, p. 39, 2014.

CHANG, J.; XIE, M.; SHAH, V.R.; SCHNEIDER, M.D.; ENTMAN, M.L.; WEI, L.; SCHWARTZ, R.J. Activation of Rho-Associated Coiled-Coil Protein Kinase 1 (ROCK-1) by Caspase-3 Cleavage Plays an Essential Role in Cardiac Myocyte Apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 39, p. 14495-14500, 2006.

CHEN, J.F.; MANDEL, E.M.; THOMSON, J.M.; WU, Q.; CALLIS, T.E.; HAMMOND, S.M.; CONLON, F.L.; WANG, D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, New York, v. 38, n. 2, p. 228-233, 2006.

COUTINHO, L.L.; MATUKUMALLI, L.K.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P.; GASBARRE, L.C.; CAPUCO, A.V.; SMITH, T.P. Discovery and Profiling of Bovine microRNAs from Immune-Related and Embryonic Tissues. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 29, n.1, p. 35-43, 2007.

COWLED, C.; STEWART ,C.R.; LIKIC, V.A.; FRIEDLÄNDER, M.R.; TACHEDJIAN, M.; JENKINS, K.A.; TIZARD, M.L.; COTTEE, P.; MARSH, G.A.; ZHOU, P.; BAKER, M.L.; BEAN, A.G.; WANG, L.F. Characterisation of Novel microRNAs in the Black Flying Fox (Pteropus Alecto) by Deep Sequencing. **BMC genomics**, London, v.15, p. 682, 2014.

CUPP, A.S.; MATTHEWS, J.; HUFF-LONERGAN, E.; SPURLOCK, D.M.; MCLEAN, D. Cell Biology Symposium: The role of microRNA in cell function. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.87, n.14, p.e19-e20, 2009.

D'ALESSANDRO, A.; MARROCCO, C.; RINALDUCCI, S.; MIRASOLE, C.; FAILLA, S.; ZOLLA, L. Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. **Journal of Proteomics**, Martinsried, v. 75, n. 14, p. 4381-4398, 2012.

DEY, B.K.; GAGAN, J.; DUTTA, A. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 31, p. 203-214, 2011.

DEY, B.K.; GAGAN, J.; YAN, Z.; DUTTA, A. miR-26a Is Required for Skeletal Muscle Differentiation and Regeneration in Mice. **Genes & Development**, New York, v.26, n. 19, p. 2180–2191, 2012.

DHAHBI, J.M.; ATAMN, H.; BOFFELLI, D.; MAGIS, W.; SPINDLER, S.R.; MARTIN, D.L.K. Deep Sequencing Reveals Novel microRNAs and Regulation of microRNA Expression during Cell Senescence. **PloS one**, London, v. 6, n. 5, p. e20509. 2011.

DRANSFIELD, E. Modelling Post-Mortem Tenderisation IV : Role of Calpains and Calpastatin in Conditioning. **Meat Science**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 217–234, 1993.

DU, X.H.; GAN, Q.F.; YUAN, Z.R.; GAO, X.; ZHANG, L.P.; GAO, H.J.; LI, J.K.; XU, S.Z. Polymorphism of MyoD1 and Myf6 genes and associations with carcass and meat quality traits in beef cattle. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 6708–6717, 2013.

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: structure, substrates, and functions during apoptosis. **Biochemistry - Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.68, p. 383–424, 1999.

FAN, T.J.; HAN, L.H.; CONG, R.S.; LIANG, J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. **Acta Biochim Biophys Sin**, Shanghai, v. 37, n.11, p. 719–727, 2005.

FATIMA, A. MORRIS, D.G. MicroRNAs in domestic livestock. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 25, n. 16, p. 685–696, 2013.

FRIEDLÄNDER, M.R.; CHEN, W.; ADAMIDI, C.; MAASKOLA, J.; EINSPANIER, R.; KNESPEL, S.; RAJEWSKY, N. Discovering microRNAs from Deep Sequencing Data Using miRDeep. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 4, p. 407–415, 2008.

FRIEDLÄNDER, M.R.; MACKOWIAK, S.D.; LI, N.; CHEN, W.; RAJEWSKY, N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 37–52, 2012.

GEBAUER, F.; HENTZE, M.W. Molecular mechanisms of translational control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 10, p. 827–835, 2004.

GIBBS, R.; WEINSTOCK, G.; KAPPES, S.; SCHOOK, L.; WOMACK, J. Bovine genomic sequencing initiative. **National Human Genome Research Institute**, Disponível em: <<http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/BovineSEQ.pdf>> (2002). Acesso em: 16 Set. 2015.

GIL-PARRADO, S.; FERNÁNDEZ-MONTALVÁN, A.; ASSFALG-MACHLEIDT, I.; POPP, O.; BESTVATER, F.; HOLLOSCHI, A.; KNOCH, T.A.; AUERSWALD, E.A.; WELSH, K.; REED, J.C.; FRITZ, H.; FUENTES-PRIOR, P.; SPIESS, E.; SALVESEN, G.S.; MACHLEIDT, W. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 277, n. 30, p. 27217–27226. 2002.

GLAZOV, E.A.; KONGSUWAN, K.; ASSAVALAPSAKUL, W.; HORWOOD, P.F.; MITTER, N.; MAHONY, T.J. Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. **PloS one**, London, v. 4, n. 7, p. e6349. 2009.

GONÇALVES, T.M. **Differential expression of genes related with meat tenderness in Nelore cattle**. 2015. 98p. Dissertação de Mestrado (Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

HENDERSON, C.R. Sire evaluation and genetics trends. In: ANIMAL BREEDING AND GENETIC SYMPOSIUM, 1972, Blacksburg, VA: American Society of Animal Science; Champaign: American Dairy Science Association, 1972, . p. 10.

HOU, X.; TANG, Z.; LIU, H.; WANG, N.; JU, H.; LI, K. Discovery of MicroRNAs Associated with Myogenesis by Deep Sequencing of Serial Developmental Skeletal Muscles in Pigs. **PloS one**, London, v. 7, n. 12, p. 1–10. 2012.

HUTVAGNER, G.; MCLACHLAN, J.; PASQUINELLI, A.E.; BALINT, E.; TUSCHL, T.; ZAMORE, P.D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. **Science**, New York, v.293, n. 5531, p. 834–838, 2001.

INDEX MUNDI. **Beef and Veal Meat Exports by Country in 1000 MT CWE**. Bolivia, Disponível em: <<http://www.indexmundi.com/agriculture/?commodity=beef-and-veal-meat&graph=exports>>. Acesso em: 14 set. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da produção pecuária**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201501_publ_completa.pdf>. Acesso em: 25 Ago. 2015.

JUSZCZUK-KUBIAK, E.; FLISIKOWSKI, K.; WICINSKA, K. Nucleotide Sequence and Variations of the Bovine Myocyte Enhancer Factor 2C (MEF2C) Gene Promoter in Bos Taurus Cattle. **Molecular Biology Reports**, New York, v.38, n. 2, p.1269–1276, 2011.

KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, Cambridge, v.115, n. 2, p. 209–216, 2003.

KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v.6, n. 5, p. 376–385. 2005.

KIM, H.K.; LEE, Y.S.; SIVAPRASAD, U.; MALHOTRA, A.; DUTTA, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.174, n.5, p.677-687, 2006.

KOOHMARAIE, M.; WHIPPLE, G.; KRETCHMAR, D.H.; CROUSE, J.D.; MERSMANN, H.J. Postmortem Proteolysis in Longissimus Muscle from Beef, Lamb and Pork Carcasses. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, n. 2, p. 617–624, 1991

KOOHMARAIE, M. Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 45., 1992, Knoxville. **Proceedings**... Knoxville: American Meat Science Association, p.63-71, 1992.

KOOHMARAIE, M. Case study: Understanding and Managing Variation in Meat Tenderness. In: VEISETH, E.; KENT, M.P.; SHACKELFORD, S.D. (Ed.). 2003. **Proceeding of Annual Meeting of the Brazilian Society of Animal Sciences**, Santa Maria, v.40. 2003. 1 CD-ROM.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G.H. Contribution of Postmortem Muscle Biochemistry to the Delivery of Consistent Meat Quality with Particular Focus on the Calpain System. **Meat Science**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 34–43, 2006.

- LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; FILHO, S.C.V.; SOUZA, E.J.O.; DUARTE, M.S.; BENEDETI, P.D.B.; SOUZA, N.K.P.; COX, R.B. Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. **Meat Science**, Amsterdam, v. 90, n. 3, p.770–774, 2012.
- LEE, R.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.
- LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RÅDMARK, O.; KIM, S.; KIM, VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, London, v.425, n. 6956, p. 415–419, 2003.
- LEE, E.J.; BAEK, M.; GUSEV, Y.; BRACKETT, D.J.; NUOVO, G.J.; SCHMITTGEN, T.D. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. **RNA**, Bethesda, v. 14, n.1, p. 35–42, 2008.
- LIU, N.; WILLIAMS, A.; KIM, Y.; MCANALLY, J.; BEZPROZVANNAYA, S.; SUTHERLAND, L.; RICHARDSON, J.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. An Intragenic MEF2-Dependent Enhancer Directs Muscle-Specific Expression of microRNAs 1 and 133. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 52, p. 20844-20849, 2007.
- LUCHIARI FILHO, A. Pecuária da carne bovina. Nova Odessa: A. Luchiari Filho, 2000. 134p.
- LUCHIARI FILHO, A.; MOURÃO, G.B. **Melhoramento, raças e seus cruzamentos na pecuária de corte brasileira**. Pirassununga: LinLife, 2006. 142p.
- LUND, S.P.; NETTLETON, D.; MCCARTHY, D.J.; SMYTH, G.K. Detecting differential expression in RNA-sequence data using quasi-likelihood with shrunken dispersion estimates. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, Berkeley, v. 11, n. 5, p. 1-42, 2012.
- LUO, W.; NIE, Q.; ZHANG, X. MicroRNAs involved in skeletal muscle differentiation. **Journal of Genetics and Genomics**, Beijing, v. 40, n. 3, p. 107-116, 2013.
- MCCARTHY, J.J. MicroRNA-206: The Skeletal Muscle-Specific myomiR. **Biochimica et Biophysica Acta**, Nijmegen. v. 1779, n.11, p.682–691, 2008.
- MCDANELD, T.G. MicroRNA: Mechanism of Gene Regulation and Application to Livestock. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. E21-E28, 2009.
- MILLER, M.F.; CARR, M.A.; RAMSEY, C.B.; CROCKETT, K.L.; HOOVER, L.C. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.79, n.12, p.3062-3068, 2001.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:
 <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>.
 Acesso em: 21 ago. 2015.

MORAIS, D.; RANGEL, A.; URBANO, S.; MACIEL, M.; AMARO, P. Alguns aspectos qualitativos da carne bovina : Uma Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.5, n.4, p.351-358, 2011.

MRODE R.A. In: _____. **Linear models for the prediction of animal breeding values**. 2nd ed. Wallingford, Oxon: CAB International, 344p, 2005.

MUROYA, S.; NAKAJIMA, I.; CHIKUNI, K. Related Expression of MyoD and Myf5 with Myosin Heavy Chain Isoform Types in Bovine Adult Skeletal Muscles. **Zoological Science**, Washington, v. 19, n. 7, p.755–761, 2002.

NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-Talk between Two Cysteine Protease Families : Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 150, n. 4, p.887–894, 2000.

NOLLET, L.; TOLDRÁ, F. Handbook of muscle foods analysis. Boca Raton (United States): CRC Press, p. 967. 2009.

OLIVEIRA, E.A.; SAMPAIO, A.A.M.; HENRIQUE, W.; PIVARO, T.M.; ROSA, B.L.A.; FERNANDES, R.M.; ANDRADE, A.T. Quality traits and lipid composition of meat from Nellore young bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. **Meat Science**, Amsterdam, v.90, n. 1, p.28-35, 2012.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M.A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, Amsterdam, v.74, n.1, p.44-58, 2006.

OUALI, A. Meat tenderization: possible causes and mechanisms. A Review. **Journal of Muscle Foods**, Malden, v. 1, n. 2, p. 129-165, 2007.

PAGE, B.T.; CASAS, E.; HEATON, M.P.; CULLEN, N.G.; HYNDMAN, D L.; MORRIS, C.A.; CRAWFORD, A.M.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J.W.; SMITH, T.P L. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, n. 12, p. 3077-3085, 2002.

PAZ, C.C.P.; LUCHIARI FILHO, A. Melhoramento genético e diferenças de raças com relação à qualidade da carne bovina. **Pecuária de Corte**, São Paulo, n.101, p. 58-63, 2000.

PFLANZER, S.B.; FELÍCIO, P.E. Effects of teeth maturity and fatness of Nellore (*Bos indicus*) steer carcasses on instrumental and sensory tenderness. **Meat Science**, Amsterdam, v.83, n.4, p.697-701, 2009.

ROBAKOWSKA-HYZOREK, D.; OPRZADEK, J.; ZELAZOWSKA, B.; OLBROMSKI, R.; ZWIERZCHOWSKI, L. Effect of the g.-723G-->T polymorphism in the bovine myogenic factor 5 (Myf5) gene promoter region on gene transcript level in the longissimus dorsi muscle and on meat traits of Polish Holstein-Friesian cattle. **Biochemical Genetics**, New York, v. 48, n. 5/6, p. 450–464, 2010.

SENTANDREU, M.A.; COULIS, G.; OUALI, A. Role of Muscle Endopeptidases and Their Inhibitors in Meat Tenderness. **Trends in Food Science & Technology**, Maryland Heights v, 13, n.12, p. 400–421, 2002.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M.F.; CROUSE, J.D.; REAGAN, J.O. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, n. 1, p. 171–177, 1991.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, New York, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

SOKOL, NS. The role of microRNAs in muscle development. **Current Topics in Developmental Biology**, San Diego, v. 59, p. 59-78, 2012.

STOREY, J.D.; TIBSHIRANI, R. Statistical significance for genome wide studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 16, p. 9440-9445, 2003.

SZCZESNIAK, A.S. Sensory texture profiling-Historical and scientific perspectives. **Food Technology**, Chicago, v. 52, n. 8, p. 54-55, 1998.

TIZIOTO, P.C.; DECKER, J.E.; TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; MUDADU, M.A.; SILVA, F.L.; MOURÃO, G.B.; COUTINHO, L.L.; THOLON, P.; SONSTEGARD, T. S.; ROSA, A.N.; ALENCAR, M.M.; TULLIO, R.R.; MEDEIROS, S.R.; NASSU, R. T.; FEIJÓ, G.L.D.; SILVA, L.O.C.; TORRES, R.A; SIQUEIRA, F.; HIGA, R.H.; REGITANO, L.C.A. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 45, n. 21, p. 1012–1020, 2013

VAN ROOIJ, E.; LIU, N.; OLSON, E.N.; MicroRNAs flex their muscles. **Trends in Genetics**. Cambridge, v. 24, n.4, p. 159–166, 2008.

WARKUP, C.; MARIE, S.; HARRINGTON, G. Consumer perceptions of texture; the most important quality attribute of meat? Em: **Expression of Tissue Proteinases and Regulation of Protein Degradation as Related to Meat Quality**. OUALI, A., DEMEYER, D.J. ; SMULDERS, F.J.M.(Ed.). ECCEAMST. 1995. p. 225-237.

WHEELER, T.L.; SAVELL, J.W.; CROOS, H.R. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 68, n. 12, p. 4206-4220, 1990.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D. **Standardized warner bratzler shear force procedures for meat tenderness measurement**. Clay Center: Romam L. Hruska U. S. MARC, USDA, p. 7, 1995. p. 7.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos Indicus cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 68, n. 9, p. 2716-2728, 1990.

WIENHOLDS, E.; PLASTERK, R.H. MicroRNA function in animal development. **FEBS Letter**, Inglaterra, v. 579, n. 26, p. 5911–5922, 2005.

YEKTA, S.; SHIH, I.H.; BARTEL, D.P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. **Science**, New York, v.304, n. 5670, p. 594–596. 2004.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I.G.; CULLEN, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, New York, v. 17, n. 24, p. 3011–3016. 2003.

ZENG, Y.; WAGNER, E.J.; CULLEN, B.R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 1327-1333. 2002.