

MÔNICA DEGRAF CAVALLIN

**Identificação de marcadores moleculares de precocidade reprodutiva e
produtiva em bovinos da raça Angus**

São Paulo

2022

MÔNICA DEGRAF CAVALLIN

Identificação de marcadores moleculares de precocidade reprodutiva e produtiva em bovinos da raça Angus

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcilio Nichi

Coorientadora:

Profa. Dra. Renata Marino Romano

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4184
FMVZ

Cavallin, Mônica Degraf
Identificação de marcadores moleculares de precocidade reprodutiva e produtiva em bovinos da raça Angus / Mônica Degraf Cavallin. – 2022.
116 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Marino Romano.

1. Puberdade. 2. Crescimento. 3. Biomarcadores. 4. Expressão gênica. 5. RNA-Seq.
I. Título.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação de marcadores moleculares de precocidade reprodutiva e produtiva em bovinos da raça Angus", protocolada sob o CEUA nº 8936230517 (ID 004174), sob a responsabilidade de **Marcilio Nichi e equipe; Mônica Degraf Cavallin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 19/10/2017.

We certify that the proposal "Identification of molecular markers for reproductive and productive precocities in Angus cattle", utilizing 315 Bovines (males and females), protocol number CEUA 8936230517 (ID 004174), under the responsibility of **Marcilio Nichi and team; Mônica Degraf Cavallin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/19/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **07/2021** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Bovinos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **12 a 24 meses** N: **315**

Linhagem: **Angus** Peso: **450 a 550 kg**

Local do experimento: Fazendas cooperadas Cooperaliança, Guarapuava, PR

São Paulo, 24 de setembro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CAVALLIN, Mônica Degraf

Título: **Identificação de marcadores moleculares de precocidade reprodutiva e produtiva em bovinos da raça Angus**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: 31/03/2022

Banca Examinadora

Prof. Dra.: Renata Marino Romano

Instituição: UNICENTRO

Julgamento: APROVADA

Prof. Dr.: Claudio Alvarenga de Oliveira

Instituição: FMVZ – USP

Julgamento: APROVADA

Prof. Dra.: Paula Bargi de Souza

Instituição: UFMG

Julgamento: APROVADA

Prof. Dra.: Juliana Afonso

Instituição: EMBRAPA

Julgamento: APROVADA

Prof. Dra.: Carla Fredrichsen Moya Araujo

Instituição: UNICENTRO

Julgamento: APROVADA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gesse e Amauri, com todo meu amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Sozinha, jamais conseguiria realizar este trabalho. Portanto, por mais que me esforce, qualquer palavra aqui redigida não será capaz de expressar o verdadeiro sentimento de gratidão a todos que fizeram parte desse processo.

Agradeço aos responsáveis por me apresentar ao mundo da pesquisa e me conduzirem nos caminhos que eu acreditava não ter capacidade ou coragem de trilhar, meus professores e coorientadores Dra. Renata Marino Romano e Dr. Marco Aurelio Romano. Obrigada por se fazerem ponte e orientação durante todo o percurso, por – literalmente, segurarem a minha mão e me conduzirem até a Universidade de São Paulo, lugar até então distante e utópico nos meus pensamentos. Sou eternamente grata pela paciência, dedicação, ensinamentos, amparo do primeiro ao último momento e por todas as batalhas que travaram para que esse projeto pudesse ser concluído.

Ao professor Dr. Cláudio Alvarenga, o primeiro a me receber e a abrir as portas do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ. Obrigada pela receptividade, suporte, confiança e pelo entendimento e apoio nas minhas decisões.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcilio Nichi, quanta admiração pela sua generosidade, humildade, leveza e bondade. Agradeço a confiança que sempre depositou em mim, agradeço a amizade, aos ensinamentos, a todo suporte e por sempre estar disponível em qualquer situação.

As grandes amizades vividas e construídas nesse período: Raphaela, Gabriel, João Victor, Júlia, Damiana, Marcel e Diego, muito obrigada pela parceria e convívio, pela ajuda irrestrita e amizade. Mesmo que os caminhos não mais se cruzem e que o contato não seja mais diário, a amizade baseada em lealdade e o carinho de vocês preencheu meu coração e estarão para sempre nele guardados.

A todos os meus colegas de Laboratório de Andrologia e do Departamento de Reprodução Animal de São Paulo e de Pirassununga que se colocaram sempre à disposição em colaborar ou que apenas fizeram parte do convívio contribuindo de alguma forma para que os dias fossem mais agradáveis e alegres: Roberta, Ken, Laísa, Henrique, Álvaro, Daniel, Walter, Maíra,

Natally, Leonardo e Giulia. Aos colegas de disciplinas Túlio, Clésio, Izally e Juliana Afonso que sem pretensão alguma se colocaram prontos a me ajudar.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Biologia Molecular da Unicentro, Jeane, Ariane, Gonzalo, Dani e Deborah, abrigada por estarem dispostos a colaborar e apoiar. De forma muito especial, agradeço a minha grande amiga Dra. Isabela Medeiros de Oliveira, de quem este trabalho possui muito, tanto tecnicamente como na forma de apoio e suporte pessoal. Obrigada pela amizade sincera, convivência, ajuda incondicional e troca de ensinamentos no decorrer de tantos anos.

Agradeço às estruturas que possibilitaram tudo isso, a Universidade de São Paulo (USP), a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) e seus ilustres professores.

Agradeço a todos os colaboradores dessas instituições e de forma muito especial, agradeço à secretária da pós graduação do VRA Harumi Doi Shiraishi que me conduziu com muito profissionalismo do início ao fim por toda a burocracia da pós graduação, não só me orientando, mas também com muita humanidade me aconselhando e conduzindo nas diversas etapas de todo processo. A mesma gratidão estendo à Camila Molgara Gamba, bibliotecária da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice - FMVZ que muito prontamente atendeu as minhas solicitações e necessidades e cujas orientações contribuíram muito para a normalização deste trabalho.

Agradeço as instituições parceiras que contribuíram e possibilitaram que esse trabalho fosse executado: ao Laboratório de Toxicologia Reprodutiva e Biologia Molecular do Departamento de Farmácia da Unicentro. A Cooperalliança Carnes Nobres - em especial aos produtores que permitiram que seus animais fizessem parte deste estudo, ao coordenador de projetos da divisão fomento Robson Ueno, aos zootecnistas Rodrigo Cesar Alves e Diogo Sendi pela imensa disponibilidade, organização e colaboração na colheita das amostras. Ao frigorífico FrigoKeller, seu proprietário Alisson Keller e colaboradores bem como a colega médica veterinária fiscal responsável Alessandra Sterza que gentilmente articulou e se responsabilizou pela minha entrada na linha de abate. Agradeço a equipe do Instituto para Pesquisa do Câncer de Guarapuava (IPEC), ao Presidente Dr. David Livingstone Alves Figueiredo, as pesquisadoras Dra. Kamila Chagas Peronni Zueli e Dra. Isabela Medeiros de Oliveira pelo

trabalho de sequenciamento das amostras e aos bioinformatas Dr. Carlos Eduardo Buss, Dra. Emanuele Buss e Dr. Carlos Biagi Junior pela análise de dados realizada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço.

Agradeço à FAPESP pelo suporte financeiro por meio da concessão da bolsa de doutorado processo nº 2017/22240-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Por fim, agradeço aos que tenho como maior riqueza na vida, os que foram e são combustíveis e luz dessa e de todas as minhas jornadas.

A Deus, que cria todas as oportunidades e que esteve ao meu lado em todos os momentos, com Seu amor me protegendo e me colocando sempre nos lugares e situações necessárias à minha evolução.

Aos meus pais, Gesse e Amauri. Agradeço pelo apoio constante, por todo suporte, por tudo que sempre abriram mão por mim, por sempre ficarem para que eu pudesse seguir, por confiarem e tanto me apoiarem muitas vezes sem ao menos entender sobre o que tudo isso se tratava. Tudo que sou, devo a vocês. Minha mãe, meu maior exemplo de força, amor, doação e cuidado. Quanta gratidão por cada detalhe seu, sempre servindo e me alimentando de fé e de amor, diariamente buscando interceder em oração e abrindo mão de si por nós. Meu pai, exemplo de coragem e resiliência. Hoje consigo entender que a vida nunca foi fácil, apenas hoje, pois na infância e adolescência nada nunca deixou transparecer, nada nunca nos deixou faltar. Dedicou a vida toda em função de nos prover e mesmo diante de tantos desafios e quedas esteve sempre tentando e lutando mais e mais uma vez. Nada foi capaz de tirar a esperança, a vontade de sonhar e concretizar, o desejo de fazer aquilo que gosta e acreditar que é possível. Quanto orgulho eu sinto dessa história. Obrigada pai, por sentir tanto orgulho das minhas mínimas conquistas, por me apoiar de todas as formas, por diversas vezes me amparar financeiramente com muito mais do que talvez fosse possível no momento, por acreditar em mim e me ensinar tanto. Aos meus pais, todo o meu amor e minha eterna e mais sincera gratidão.

Aos meus irmãos, Eduardo e Jessica, e cunhados Melissa e Leonardo, todos exemplos de persistência e dedicação profissional. Obrigada por toda parceria e leveza que inspiram. Pelo

convívio puro, sempre alegre e descontraído. Obrigada por se fazerem sempre presentes e por estarem sempre na torcida.

As minhas amigas/irmãs, mulheres que me inspiram: Mayara Ferraz, Ana Luiza de Onofre, Paula Blanc, Mariana Marcondes, Paula Molina, Verônica Volski, Ana Paula Glein, Denise Ferreira, Jessica Bartko, Isabela Medeiros de Oliveira e Raphaela Sousa. Obrigada por tanto amor em forma de parceria, conversa, troca, apoio, conselhos, risadas, jantares e viagens. Obrigada por tudo que nossa amizade trouxe, pela alegria dos seus filhos, parceira dos seus maridos, amor e torcida das suas famílias.

Marcelo Kuczer, meu companheiro de vida. Como agradecer tudo e tanto que fez por essa tese, por mim, pelos meus e por nós. Obrigada pelo apoio desde o início dessa trajetória. Por me acalmar e me dar segurança nos momentos mais desafiadores. Por ter sido consolo, incentivo, força e suporte. Por estar sempre disposto a resolver ou minimizar as minhas dificuldades e me ensinar que não importa o cenário, se estamos aqui, junto dos que amamos: “está tudo bem, está tuuudo certo, tudo, está tudo bem”.

A todos, minha mais sincera gratidão.

“If I set out to prove something, I am no real scientist - I have to learn to follow where the facts lead me - I have to learn to whip my prejudices”

Lazzaro Spallanzani

RESUMO

CAVALLIN, M. D. **Identificação de marcadores moleculares de precocidade reprodutiva e produtiva em bovinos da raça Angus**. 2022. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O crescimento e desenvolvimento de bovinos de corte está relacionado a uma sequência de fases dependentes da idade composta pelas fases pré e pós-puberal. No entanto, animais da raça Angus desenvolvem características de terminação para o abate com idades entre 11 e 24 meses. Essa variação tem grande impacto no sistema produtivo e ainda não há biomarcadores disponíveis que incluam genes relacionados a essas características. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar características relacionadas a precocidade produtiva e reprodutiva de bovinos da raça Angus abatidos em diferentes idades. Para isso, os animais foram divididos em grupo hiperprecoce (abatidos até os 13 meses) e grupo precoce (abatidos acima de 17 meses). Avaliamos as características produtivas de peso vivo, peso de carcaça e cobertura de gordura, as características reprodutivas de volume testicular, avaliação seminal por técnicas convencionais e de funcionalidade e as dosagens séricas hormonais de testosterona, di-hidrotestosterona, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). Por meio do ensaio RTqPCR, no tecido testicular analisamos genes relacionados com a espermatogênese (*NDRG2*, *ADAM11*, *TRIP13*, *SPA17*, *CSNK2A1* e *CSNK2A2*), a esteroidogênese (*STAR* e *HSD3B1*) e a puberdade (*AMH*). No tecido muscular analisamos genes relacionados com a proliferação e a diferenciação celular (*MYOD*, *MYF5*, *RBI* e *MSTN*) e o crescimento (*IGFRI* e *LEP*). Por fim, realizamos sequenciamento do transcriptoma testicular e muscular por RNA-seq. Não foram observadas diferenças nos parâmetros produtivos entre os grupos, no entanto, observamos maior volume testicular e concentração espermática nos animais do grupo precoce. Não foram observadas diferenças em relação a funcionalidade espermática, já a análise de morfologia das mesmas células evidenciou maior número de defeitos maiores nos animais do grupo hiperprecoce. Em relação as dosagens hormonais, observamos menores níveis na concentração sérica de testosterona, dihidrotestosterona e T4 no grupo precoce. A expressão de genes *TRIP13*, *ADAM11*, *STAR* e *HSD3B1* foram maiores no grupo precoce. Em contrapartida, a expressão de genes *MYOD1* e *MYF5* foram maiores no grupo hiperprecoce. No RNA-Seq, identificamos no tecido testicular 12 genes diferencialmente expressos (DEGs), 7 genes *down-regulated* e 5 genes *up-regulated* no grupo hiperprecoce em relação ao precoce. No tecido muscular, identificamos 50 DEGs, dos quais 40 genes foram *down-regulated* e 10 genes *up-regulated* no grupo hiperprecoce em relação ao precoce. No tecido testicular, destacamos o aumento da

expressão dos genes *PODNL1*, *UPK1A* e *TRIM40* e a redução da expressão dos genes *WAP*, *GSK3B*, *ZNF*, *G3N2E2* e *F1MUF2* no grupo hiperprecoce. No tecido muscular destacamos o aumento da expressão dos genes *EDN1*, *MRC1*, *CDC6* e *CCBE1* e a redução da expressão dos genes *SPATA3*, *TNP2*, *FSCB*, *PRM2*, *IQCF1* e *CDKN1A* no grupo hiperprecoce. Os resultados sugerem que as variações na idade de abate podem estar relacionadas as diferentes fases de crescimento em que os animais se encontram, estando o grupo hiperprecoce na fase peripuberal e ainda em crescimento, enquanto o grupo precoce parece já ter atingido a maturidade sexual e a fase adulta. Os genes identificados a partir da metodologia de RNA-Seq são potenciais candidatos a biomarcadores simultâneos relacionados a características de precocidade reprodutiva e desenvolvimento muscular precoce.

Palavras chave: Puberdade. Crescimento. Biomarcadores. Expressão gênica. RNA-Seq.

ABSTRACT

CAVALLIN, M. D. **Identification of molecular markers of reproductive and productive precocity in Angus breed cattle.** 2022. 116f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The growth and development in beef cattle is related to a sequence of age-dependent phases composed of pre - and postpubertal phases. However, Angus breed animals develop finishing characteristics for slaughter at ages between 11 and 24 months. This variation has a great impact on the production system, and there are still no biomarkers available that include genes related to these traits. Thus, the present study aimed to evaluate characteristics related to the productive and reproductive precocity of Angus cattle slaughtered at different ages. For this, the animals were divided into a hyperprecocious group (slaughtered up to 13 months) and a precocious group (slaughtered over 17 months). We evaluated the productive characteristics of live weight, carcass weight and fat cover, the reproductive characteristics of testis volume, seminal evaluation by conventional and functionality techniques and the hormonal serum levels of testosterone, dihydrotestosterone, thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3). Using the RT-qPCR assay, we analyzed genes related to spermatogenesis (*NDRG2*, *ADAM11*, *TRIP13*, *SPA17*, *CSNK2A1* and *CSNK2A2*), steroidogenesis (*STAR*, *HSD3B1*) and puberty (*AMH*) in testis tissue. In muscle tissue, we analyzed genes related to cell proliferation and differentiation (*MYOD*, *MYF5*, *RBI* and *MSTN*) and growth (*IGFR1* and *LEP*). Finally, we performed testis and muscle transcriptome sequencing by RNA-seq. No differences were observed in the productive parameters between the groups; however, we observed greater testicular volume and sperm concentration in the animals of the precocious group. No differences were observed in relation to sperm functionality; morphology analysis of the same cells showed a greater number of major defects in the animals of the hyperprecocious group. Regarding hormone dosages, we observed lower levels in the serum concentration of testosterone, dihydrotestosterone and T4 in the precocious group. The expression of *TRIP13*, *ADAM11*, *STAR* and *HSD3B1* genes was higher in the precocious group. In contrast, the expression of the *MYOD1* and *MYF5* genes was higher in the hyperprecocious group. In RNA-Seq, we identified 12 differentially expressed genes (DEGs), 7 downregulated genes and 5 upregulated genes in testis tissue in the hyperprecocious group. In muscle tissue, we identified 50 DEGs, of which 40 genes were downregulated and 10 genes were upregulated in the hyperprecocious group. In the testis tissue, we highlight the increase in the expression of the genes *PODNL1*, *UPK1A* and *TRIM40* and the reduction in the expression of the genes *WAP*, *GSK3B*, *ZNF*, *G3N2E2* and *F1MUF2* in the

hyperprecocious group. In muscle tissue, we highlight the increased expression of the *EDNI*, *MRC1*, *CDC6* and *CCBE1* genes and the reduced expression of the *SPATA3*, *TNP2*, *FSCB*, *PRM2*, *IQCF1* and *CDKN1A* genes in the hyperprecocious group. The results suggest that variations in slaughter age may be related to the different stages of growth in which the animals are, with the hyperprecocious group in the peripubertal phase and still growing, while the precocious group seems to have reached sexual maturity and adulthood. The genes identified from the RNA-Seq methodology are potential candidates for simultaneous biomarkers related to characteristics of reproductive precocity and early muscle development.

Keywords: Puberty. Growth. Biomarkers. Gene expression. RNA-Seq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Média e erro padrão da média do peso (A) e volume testicular (B) de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate	55
Figura 2 - Média e erro padrão da média da motilidade (A) e concentração total de células móveis (B) de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate	56
Figura 3 - Média e erro padrão da média dos defeitos maiores, menores e totais de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate.....	57
Figura 4 - Média e erro padrão da média da concentração sérica de testosterona (A), dihidrotestosterona (B), triiodotironina (C) e de tiroxina (D) no momento do abate de animais da raça Angus classificados como hiperprecoces e precoces.....	59
Figura 5 - <i>Melt curve</i> e <i>standard curve</i> demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes <i>TRIP13</i> (A), <i>ADAM11</i> (B) e <i>AMH</i> (C) no tecido testicular	61
Figura 6 - <i>Melt curve</i> e <i>standard curve</i> demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes <i>CNK2A1</i> (A), <i>CNK2A2</i> (B) e <i>HSD3B1</i> (C) no tecido testicular	62
Figura 7 - <i>Melt curve</i> e <i>standard curve</i> demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes <i>NDRG2</i> (A), <i>SPA17</i> (B) e <i>STAR</i> (C) no tecido testicular	63
Figura 8 - <i>Melt curve</i> e <i>standard curve</i> demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios do gene <i>ACTB</i>	64
Figura 9 - <i>Melt curve</i> e <i>standard curve</i> demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes <i>IGFRI</i> (A), <i>LEP</i> (B) e <i>MSTN</i> (C) no tecido muscular.....	66
Figura 10 - <i>Melt curve</i> e <i>standard curve</i> demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes <i>MYOD1</i> (A), <i>MYOF5</i> (B) e <i>RBI</i> (C) no tecido muscular	67
Figura 11 - <i>Melt curve</i> e <i>standard curve</i> demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes <i>ACTB</i> no tecido muscular.....	68

Figura 12 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes <i>NDRG2</i> (A), <i>TRIP13</i> (B), <i>ADAMI</i> (C) e <i>SPA17</i> (D) no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces	69
Figura 13 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes <i>CSNK2A1</i> (A), <i>CSNK2A2</i> (B), no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces	69
Figura 14 – Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes <i>STAR</i> (A) e <i>HSD3B1</i> (B) no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces	70
Figura 15 – Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos do gene <i>AMH</i> no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces	70
Figura 16 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes <i>MYOD1</i> (A), <i>MYF5</i> (B), <i>LEP</i> (C) <i>MSTN</i> (D), <i>RBI</i> (E) e <i>IGFRI</i> (F) no tecido muscular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces	71
Figura 17 - Eletroforese capilar do RNA extraído do tecido muscular	72
Figura 18 - Eletroforese capilar do RNA extraído do tecido testicular	73
Figura 19 - Eletroferogramas da análise do RNA extraído do tecido muscular	74
Figura 20 - Eletroferogramas da análise do RNA extraído do tecido testicular	75
Figura 21 - Histograma de qualidade média das sequências em seu conjunto de dados	76
Figura 22 - Conteúdo GC por sequência das amostras sequenciadas	77
Figura 23 - Análise de componentes principais das contagens de transcritos identificados no tecido muscular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces. Sem efeito fixo e com efeito fixo (fazenda)	77
Figura 24 - Volcano plot da distribuição de genes que diferem significativamente entre animais hiperprecoces e precoces no tecido muscular	78
Figura 25 - Heatmap: Comportamento global dos genes diferencialmente expressos das amostras dos grupos precoce e hiperprecoce no tecido muscular	79
Figura 26 - Análise de componentes principais das contagens de transcritos identificados no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces. Sem efeito fixo e com efeito fixo (fazenda)	83
Figura 27 - Volcano plot da distribuição de genes que diferem significativamente entre animais hiperprecoces e precoces no tecido testicular	84

Figura 28 - Heatmap: Comportamento global dos genes diferencialmente expressos das amostras dos grupos precoce e hiperprecoce no tecido testicular	85
Figura 29 - Rede de interação entre proteínas dos DEGs identificados no tecido muscular....	88
Figura 30 - Mediana e intervalo interquartil da expressão relativa dos transcritos do gene <i>SPEM1</i> no tecido muscular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces	89
Figura 31 - Perfil de expressão por subtipo celular dos genes <i>down-regulated</i> no tecido testicular	90
Figura 32 - Perfil de expressão por subtipo celular dos genes <i>up-regulated</i> no tecido testicular	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos senso (S) e antisenso (A) dos genes utilizados para o ensaio de RTqPCR e as suas respectivas sequências de referência.....	46
Tabela 2 - Média e erro padrão da média dos parâmetros produtivos de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate	55
Tabela 3 - Média e erro padrão da média dos parâmetros funcionais de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate.....	58
Tabela 4 - Padronização da concentração de oligonucleotídeo (μM), concentração de cDNA (ng) e eficiência da reação (%) dos genes de interesse e constitutivos do tecido testicular	60
Tabela 5 - Padronização da concentração de oligonucleotídeos (μM), concentração de cDNA (ng) e eficiência da reação (%) dos genes de interesse e constitutivos do tecido muscular	65
Tabela 6 - Genes <i>up-regulated</i> no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido muscular.....	80
Tabela 7 - Genes <i>down-regulated</i> no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido muscular.....	80
Tabela 8 - Genes <i>up-regulated</i> no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido testicular.....	86
Tabela 9 - Genes <i>down-regulated</i> no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido testicular.....	86

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1.	CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO MUSCULAR EM BOVINOS.....	24
2.2.	CONTROLE HORMONAL DO CRESCIMENTO	27
2.3.	CONTROLE GÊNICO DO CRESCIMENTO	30
2.4.	O CRESCIMENTO E SUA CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS.....	32
2.5.	ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA.....	34
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	377
3.1.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	377
3.2.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRODUTIVOS.....	38
3.3.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS	399
3.3.1.	Testículos, epidídimos e colheita de espermatozoides.....	39
3.3.2.	Avaliações espermáticas morfofuncionais: convencionais e funcionais.....	39
3.4.	DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS	42
3.5.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ALVO.....	42
3.5.1.	Extração de RNA total do tecido testicular pela metodologia de coluna de sílica.....	43
3.5.2.	Extração de RNA total do tecido muscular pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio.....	44
3.5.3.	Análise de concentração e integridade do RNA total.....	44
3.5.4.	Reação de Transcrição Reversa (RT).....	45
3.5.5.	Confecção dos oligonucleotídeos.....	46
3.5.6.	Padronização dos oligonucleotídeos	48
3.5.7.	Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real (RT-qPCR).....	48
3.6.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL.....	49
3.6.1.	Extração do RNA total do tecido testicular e muscular pela metodologia de coluna de sílica.....	49
3.6.2.	Análise da concentração do RNA total	51
3.6.3.	Controle de qualidade do RNA total	51
3.6.4.	Preparo da biblioteca de mRNA.....	51
3.6.5.	Avaliação do tamanho dos fragmentos da biblioteca.....	52
3.6.6.	Sequenciamento de nova geração (NGS) e controle de qualidade.....	53

3.6.7.	Identificação de genes diferencialmente expressos, formação de redes de interação e perfil de expressão gênica por subtipo celular testicular.....	53
3.6.8.	Avaliação do gene <i>SPEM1</i> no tecido muscular por RT-qPCR	54
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4.	RESULTADOS.....	54
4.1.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRODUTIVOS NO MOMENTO DO ABATE	54
4.2.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS NO MOMENTO DO ABATE.....	55
4.3.	DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIAS	58
4.4.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ALVO	59
4.4.1.	Padronização dos oligonucleotídeos dos genes de interesse <i>TRIP13</i> , <i>ADAM11</i> , <i>AMH</i> , <i>CNK2A1</i> , <i>CNK2A2</i> , <i>HSD3B1</i> , <i>NDRG2</i> , <i>SPA17</i> , <i>STAR</i> , e genes constitutivos <i>ACTB</i> e <i>MRPL19</i> no tecido testicular	59
4.4.2.	Padronização dos oligonucleotídeos dos genes de interesse <i>IGF1R</i> , <i>LEP</i> , <i>MSTN</i> , <i>MYOD1</i> , <i>MYOF5</i> , <i>RBI</i> e gene constitutivo <i>ACTB</i> no tecido muscular	64
4.4.3.	Expressão relativa de genes que participam da regulação da espermatogênese, esteroidogênese e pré-puberdade em bovinos	68
4.4.4.	Expressão relativa de genes que participam da regulação do desenvolvimento muscular	71
4.5.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL.....	72
4.5.1.	Controle de qualidade do RNA total	72
4.5.2.	Controle de qualidade dos dados brutos das amostras	75
4.5.3.	Identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs)	77
4.5.4.	Formação de redes de interação (PPI).....	87
4.5.5.	Avaliação do gene <i>SPEM1</i> no tecido muscular por RT-qPCR	88
4.5.6.	Perfil de expressão gênica por subtipo celular testicular	89
5.	DISCUSSÃO	92
6.	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	102

1. INTRODUÇÃO

Com indiscutível importância para a economia do país, a pecuária brasileira conta com um rebanho de 187,55 milhões de cabeças e se posiciona no ranking mundial como segundo maior produtor de carne. O Brasil registrou em 2020 um abate de 41,5 milhões de animais, o que corresponde a 11,8% de toda produção mundial (ABIEC, 2021). O constante aumento da produtividade alcançado pelo setor é associado as boas práticas de produção, obtido por meio do investimento em tecnologias de melhoramento genético e do controle de elementos altamente influenciadores no processo. Alguns exemplos desses elementos são o ganho de peso dos animais, diminuição da mortalidade, aumento nas taxas de natalidade e diminuição progressiva da idade de abate (BENTO; FERRAZ; DE FELÍCIO, 2010; GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017).

No entanto, segundo dados do IBGE, no mesmo ano de 2020 cerca de 25 milhões dos bovinos abatidos no país foram de animais com idade superior a dois anos, enquanto o abate de novilhos, com idade inferior a dois anos, foi de somente 4,6 milhões de cabeças (IBGE, 2020). Nota-se, portanto, que a pecuária brasileira ainda não expressou todo seu potencial em eficiência de produção, pois ainda é caracterizada pela terminação de bovinos com idade acima dos 2 anos, apresentando uma seleção não efetiva dos programas de melhoramento em relação à precocidade de bovinos de corte.

Uma vez que a transformação dos alimentos consumidos em ganho de peso decresce com o aumento da idade do animal, a eficiência do sistema de produção pecuária correlaciona-se diretamente com a busca pela redução de idade de abate (HARRIS, 1970; BIANCHINI *et al.*, 2008; GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017). Ademais, o aumento da precocidade através da intensificação do sistema resulta em uma melhor qualidade da carne produzida (BIANCHINI *et al.*, 2008; KOPUZLU *et al.*, 2018). Isso possibilita o aumento da competitividade no mercado nacional e internacional e o investimento em nichos seletivos de consumo, uma vez que a preferência do consumidor por maciez, suculência e sabor tem sido confirmada por diversos autores (DELGADO *et al.*, 2006; DESTEFANIS *et al.*, 2008; GRUNERT; MADALENA; AGUIAR, 2010; COLLE *et al.*, 2015; GONZALEZ; PHELPS, 2018).

Além de eficiência do sistema e qualidade do produto, a redução da idade de abate atende a preocupações em relação ao respeito ambiental da produção pecuária. O aumento do uso de recursos naturais e sua degradação, contribuição para ocorrência de aquecimento global, esgotamento dos recursos hídricos e destruição da biodiversidade são consequências ambientais

associadas ao crescimento do setor pecuário. Tais consequências podem ser minimizadas através da combinação de fatores que objetivam a busca pela redução na idade de abate (OPIO *et al.*, 2013; BERRY; CROMIE; JUDGE, 2017).

A determinação da idade de abate dos animais de produção é definida pelo estágio de desenvolvimento animal. Essa determinação sofre influência de um complexo sistema neuroendócrino que controla o crescimento e o desenvolvimento, sendo os processos de hiperplasia e hipertrofia muscular controlados por interações entre fatores nutricionais, hormonais e gênicos (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993).

O crescimento e desenvolvimento de bovinos de corte está relacionado a uma sequência de fases dependentes da idade composta pelas fases pré-púbere e pós-puberal, em que as taxas de crescimento aumentam até a puberdade, mas começam a diminuir após essa fase. Por esse motivo, características reprodutivas e de maturidade sexual têm sido utilizadas como indicadores de desenvolvimento e crescimento em bovinos por meio da seleção de animais com precocidade puberal para a produção de carne bovina (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993). A melhor compreensão desses processos biológicos pode ajudar a elucidar os mecanismos genéticos e, conseqüentemente, aumentar a precisão da seleção de animais ainda jovens através do direcionamento de programas de melhoramento genético (GUO *et al.*, 2021).

No entanto, os fatores que influenciam no crescimento e que deveriam ser avaliados podem ser de difícil mensuração estarem ou indisponíveis para serem avaliadas. Isso pode ocorrer, por exemplo, quando são expressas mais tarde no desenvolvimento, como peso, acabamento de carcaça e circunferência escrotal (PENITENTE-FILHO *et al.*, 2018; RUSSELL; POLLAK; SPANGLER, 2021). Assim, a seleção genética usando técnicas modernas de melhoramento podem ser utilizadas para estimar e prever fenótipos específicos de crescimento acelerado e precocidade reprodutiva (LOPES *et al.*, 2013).

Como alternativa, o desenvolvimento de metodologias de biologia molecular de alta performance têm contribuído para o conhecimento desses mecanismos e das bases genéticas da variação entre indivíduos. Tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing ou NGS*) transformaram a análise do genoma e do transcriptoma, gerando grandes conjuntos de dados e permitindo a identificação de novos genes, vias metabólicas e processos biológicos que influenciam o fenótipo (BLASCO; ANGEL, 2014; WICKRAMASINGHE *et al.*, 2014; ROYER *et al.*, 2015; SILVA-VIGNATO *et al.*, 2019).

A técnica de sequenciamento em larga escala *RNA Sequencing* (RNA-Seq) se apresenta como o método de escolha e atualmente o mais eficiente para análise e quantificação dos transcriptomas, tanto para a avaliação do perfil de expressão gênica global de determinado

organismo quanto para a quantificação dos níveis de expressão diferencial envolvendo condições específicas (ZHANG *et al.*, 2014; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Embora a técnica de RNA-Seq venha sendo utilizada com êxito na investigação de possíveis genes candidatos e vias metabólicas que regulam características produtivas e de interesse econômico na pecuária de corte (PAPALEO MAZZUCCO *et al.*, 2016; FONSECA *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020), estudos de genes e vias relacionadas com crescimento, precocidade reprodutiva e de abate são raros.

A hipótese desse trabalho se baseia no fato de que animais da raça Angus desenvolvem características de terminação para o abate com idades variando entre 11 e 24 meses. Essa diferença de tempo tem grande impacto no sistema produtivo e ainda não há biomarcadores disponíveis que incluam, além de genes relacionados com a precocidade reprodutiva, genes que se relacionem com características de precocidade na produção de carne.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de metodologias funcionais e de biologia molecular características relacionadas à produtividade de carne, como o peso vivo, peso de carcaça e cobertura de gordura, características reprodutivas, como a avaliação seminal por técnicas convencionais e de funcionalidade espermática, dosagens séricas hormonais de testosterona, di-hidrotestosterona, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), análise da expressão de genes alvo e análise da expressão gênica global nos tecidos muscular esquelético e testicular.

Para isso, o abate de dois grupos de animais foi acompanhado e estes foram classificados de acordo com a faixa etária em hiperprecoce e precoce. Destes animais, foram obtidos os parâmetros produtivos, colhido as amostras de testículos e epidídimos para a avaliação espermática, colhido o sangue para as dosagens hormonais e colhido amostras dos tecidos muscular esquelético e testicular para as análises de expressão gênica.

O melhor entendimento dos mecanismos moleculares associados à expressão dessas características de interesse econômico e ambiental poderá contribuir para a descoberta de possíveis marcadores que poderão complementar os métodos quantitativos de melhoramento animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO MUSCULAR EM BOVINOS

Para a bovinocultura de corte, a compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento e desenvolvimento muscular dos tecidos e do organismo como um todo são fundamentais. Tal compreensão é útil para adequação de programas de melhoramento genético, manejo nutricional, ambiência, controle da qualidade de carne produzida e definição da idade de abate, sendo um dos fatores determinantes na busca pela eficiência dos sistemas de produção (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993; REHFELDT *et al.*, 2000; OKSBJERG; GONDRET; VESTERGAARD, 2004).

O crescimento é caracterizado pelo aumento de peso, comprimento, altura e circunferência em função da idade. É definido como a produção de novas células e engloba a multiplicação celular (hiperplasia), o aumento do tamanho celular (hipertrofia) e a incorporação de componentes específicos do ambiente, como a deposição de gordura, sendo esses processos consequências da duplicação de DNA e sínteses proteicas (BEERMANN; CASSENS; HAUSMAN, 1978; OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993).

O número e o tamanho das células musculares são os principais determinantes da massa muscular, sendo estes estabelecidos seguindo uma sequência complexa de eventos pré e pós-natais influenciados por fatores nutricionais e principalmente genéticos (REHFELDT *et al.*, 2000; MALTIN *et al.*, 2001).

O processo de formação do tecido muscular é denominado miogênese, que pode ser dividido em miogênese primária e miogênese secundária. A miogênese primária se refere à formação das miofibras durante o estágio embrionário. Como em outras espécies, a miogênese bovina envolve diferentes gerações de células, que aparecem por volta dos 60, 90 e 110 dias de vida fetal (pós-concepção) em bovinos. Após o nascimento, não há aumento líquido no número das fibras musculares, sendo que o crescimento muscular pós-natal ocorre principalmente devido ao aumento do tamanho da fibra muscular, o que caracteriza a miogênese secundária (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993; DU *et al.*, 2015).

Na miogênese primária ou fase de hiperplasia, ocorre a proliferação de células musculares mononucleadas, os mioblastos, que irão se fundir e originar os miotubos (multinucleados), que por sua vez se desenvolverão em miofibrilas do músculo esquelético maduro (OKSBJERG; GONDRET; VESTERGAARD, 2004; DU *et al.*, 2015)

Na miogênese secundária, como o aumento da massa muscular é devido principalmente ao aumento no comprimento e circunferência das fibras musculares, o processo de crescimento pós-natal depende do balanço entre a síntese e a degradação de proteínas. Uma maior taxa de síntese leva a maior deposição de proteínas no músculo levando a hipertrofia muscular. Esses dois processos ocorrem concomitantemente nas fibras musculares, porém durante o crescimento a taxa de síntese/deposição supera a de degradação (OKSBJERG; GONDRET; VESTEGAARD, 2004; REHFELDT *et al.*, 2000). O principal fator que determina a taxa de síntese de proteínas é a abundância de ribossomos ou capacidade de tradução (WEN; ALIMOV; MCCARTHY, 2017).

O processo de hipertrofia é acompanhado pela atividade proliferativa das células satélites, que são células musculares indiferenciadas presentes na periferia das fibras musculares adultas. Em resposta a estímulos como crescimento, remodelação ou trauma, essas células são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores da linhagem miogênica (similar ao crescimento pré-natal). Nesse estágio são também denominadas mioblastos e podem se fundir às fibras musculares já existentes ou a outras células satélites vizinhas na formação de novas fibras musculares. O acúmulo de células satélites durante o desenvolvimento está fortemente associado com o potencial hipertrófico das fibras musculares (REHFELDT *et al.*, 2000).

Além das fibras musculares esqueléticas, o músculo esquelético é constituído também de células de gordura, tecido conjuntivo ou matriz extracelular e vários outros tipos de células, incluindo as células satélites citadas anteriormente, células imunes e vasos sanguíneos. Da mesma forma que as células musculares, o crescimento das células adiposas ocorre devido aos processos de hiperplasia e hipertrofia que ocorrem na adipogênese (DU *et al.*, 2013).

Adipogênese é um termo abrangente que inclui o comprometimento de células-tronco mesenquimais com pré-adipócitos, a determinação e proliferação de pré-adipócitos e a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (HAUSMAN *et al.*, 2009). Em ruminantes, a adipogênese tem início na metade da gestação e a diferenciação das células adipogênicas ocorre também durante os estágios fetal e pós-natal (DU *et al.*, 2010, 2013).

O processo de desenvolvimento do músculo esquelético e do tecido adiposo foi bem descrito nas revisões de Du *et al.* (2013, 2015). Em suma, os autores elucidam que as células miogênicas, adipogênicas e fibrogênicas são derivadas de células progenitoras mesenquimais comuns em que as células-tronco mesenquimais são primeiro comprometidas com as linhagens de células miogênicas e adipogênicas-fibrogênicas durante o desenvolvimento muscular fetal. Em seguida, as células progenitoras miogênicas se desenvolvem em fibras musculares e células satélites, enquanto as células progenitoras adipogênicas-fibrogênicas se desenvolvem na fração

estromal-vascular do músculo esquelético, onde residem adipócitos, fibroblastos e células progenitoras adipogênicas - fibrogênicas residentes. Uma mudança no desenvolvimento de células-tronco mesenquimais de miogênese para adipogênese pode aumentar a deposição de gordura intramuscular nas etapas seguintes do crescimento (DU *et al.*, 2010).

O aumento da massa corporal do bovino ocorre em função do tempo, com fases de velocidades de crescimento diferentes: pré-natal e pós-natal até a desmama, da desmama até a puberdade ou sobreano e da puberdade até a maturidade (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993).

O crescimento pode ser representado por uma curva sigmoide, sendo este o modelo teórico mais aceito para explicar o crescimento dos animais. A curva é composta por dois segmentos principais, o primeiro segmento caracteriza o crescimento acelerado (fase de aceleração), onde a taxa de ganho de peso aumenta até atingir o ponto de inflexão da curva que representa o ponto em que a taxa de crescimento é máxima. A junção entre as duas fases ocorre durante a puberdade do animal, e a partir deste ponto que caracteriza o segundo segmento da curva, passa a haver uma diminuição no crescimento com um aumento crescente na taxa de deposição de gordura. Portanto, o teor de gordura na carcaça aumenta com o avançar da idade do animal. Para a maioria das raças bovinas o ponto de inflexão (a puberdade) é o momento em que os hormônios do crescimento passam a ser substituídos pelos hormônios da reprodução, o que ocorre entre os 12 e 18 meses, dependendo da precocidade do animal (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993; LUCHIARI, 2000).

Assim, animais que se encontram em estágio avançado de acabamento apresentam um crescimento muscular muito baixo e lento. Esse fator, associado aos altos custos energéticos para deposição de gordura quando comparados ao custo da deposição de tecido muscular, somado ao alto custo de manutenção do animal pesado, resultam em uma eficiência biológica baixa para o crescimento muscular durante a fase de terminação. Ou seja, à medida que o animal cresce, a sua eficiência biológica decresce (LUCHIARI, 2000; BRIDI, 2010).

Em geral, animais com maturidade precoce, possuem menor tamanho e, em consequência, iniciam a deposição de gordura a um menor peso. A precocidade pode ser definida como a velocidade que o animal atinge a puberdade, momento no qual cessa o crescimento ósseo e a maior parte do crescimento muscular, e ocorre a intensificação do enchimento dos adipócitos, ocorrendo deposição da gordura na carcaça (BRIDI, 2010). Assim, o termo precocidade de terminação é utilizado para denotar animais que atingem composição corporal da carcaça adequada ao abate à uma idade jovem (LUCHIARI, 2000).

Em bovinos, é possível distinguir grupos de acordo com a precocidade: as raças precoces ou de pequeno porte (*Bos taurus* britânicos, como o Angus e Hereford), as raças médias (*Bos indicus*, como o Nelore e Brahman) e as raças tardias ou de grande porte (*Bos taurus* continentais como a Charolesa e Chianina). Para a mesma idade cronológica e regime alimentar, as raças precoces apresentam menor peso e maior deposição de tecido adiposo na carcaça (BRIDI, 2010).

Como descrito, as taxas de crescimento e desenvolvimento muscular em bovinos são consideradas um parâmetro multifatorial, pois são afetadas por fatores extrínsecos e intrínsecos que agem na regulação da miogênese e adipogênese. Entre os fatores que afetam o crescimento e desenvolvimento estão os fatores maternos (PARADIS *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2021), fatores nutricionais, hormonais (NUNES, 2003; VELLOSO, 2008) e gênicos (DA SILVA NETO *et al.*, 2020).

2.2. CONTROLE HORMONAL DO CRESCIMENTO

O crescimento animal depende da integração de vários hormônios, sendo os principais: o hormônio do crescimento, esteroides gonadais, hormônios tireoidianos, insulina e glicocorticoides. Portanto, qualquer alteração no balanço desses hormônios implica em mudanças na taxa de crescimento e mesmo na composição do animal (NUNES, 2018).

O eixo-somatotrófico, essencialmente constituído pelo fator liberador de hormônio de crescimento (GHRH), hormônio de crescimento (GH), fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e IGF-II), suas proteínas carregadoras associadas e seus receptores (GHRH, GHR, IGF-IR e IGF-IIR), apresentam papel chave na regulação do metabolismo e fisiologia do crescimento em mamíferos (NUNES, 2018).

O GH é um hormônio somatotrófico secretado pela hipófise anterior na circulação, o qual se liga a receptores nos tecidos-alvo com o objetivo de estimular o crescimento (HERRINGTON; CARTER-SU; CARTER-SU, 2001). A secreção de GH ocorre em pulsos e é controlada pelo hipotálamo por meio do hormônio liberador do GH (GHRH), da somatostatina (SS) e da grelina. A somatostatina exerce um efeito inibitório, enquanto o GHRH e a grelina estimulam a secreção de GH por intermédio de receptores específicos distintos acoplados à proteína G (ROSICKÁ *et al.*, 2002; KHATIB; GAIDHANE; GAIDHANE, 2014).

Em relação a pulsatilidade da secreção do GH em bovinos, Plouzek e Trenkle (1991) determinaram o perfil secretor de GH aos 5, 8, 12 e 15 meses de idade em bovinos machos e fêmeas. Os autores observaram que GH é secretado de forma pulsátil irregular com maior

amplitude em touros e que as concentrações plasmáticas de GH foram diminuídas de acordo com a idade. Burtont *et al.* (1994) relataram que a concentração sanguínea de GH em bovinos varia de 10 a 15 ng/mL nos primeiros meses de vida, decaindo para 2 a 8 ng/mL durante a fase pré-púbere, atingindo picos de 15 a 18 ng/mL próximo à puberdade, estabilizando-se na faixa de 5 a 10 ng/mL no animal adulto.

O GH promove resposta fisiológica através da interação direta com seus receptores teciduais e indiretamente através do estímulo à produção de fatores de crescimento, principalmente IGF-1 ou através da modulação da atividade de outros hormônios como a insulina (ROSICKÁ *et al.*, 2002).

Claramente GH-dependente, o IGF-I pertence ao sistema IGF o qual é composto também por IGF-II, dois tipos de receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e seis proteínas de ligação (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, e -6). Os IGFs I e II são fatores de crescimento peptídicos com elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e exercem atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular (BURTONT *et al.*, 1994).

Cerca de 95% do IGF-1 circulante encontra-se acoplado a seis tipos de proteínas ligantes, denominadas *insulin - like growth factor binding proteins* (IGFBP), sendo que em muitas espécies as formas predominantes são a IGFBP-3 e a IGFBP-2. A predominância de uma ou de outra no plasma sanguíneo é modulada por uma série de fatores dentre os quais o nível nutricional e as concentrações plasmáticas de GH, IGF-1 e insulina (BURTONT *et al.*, 1994).

O IGF-1 se liga a receptores próprios distribuídos pelo organismo (Tipo I e II), sendo que essa ligação leva à atividade promotora de crescimento. Além disso, se liga a receptores de insulina no tecido adiposo, promovendo atividade de modulação metabólica como captação e oxidação de glicose para a produção de gordura, induzindo a lipogênese e inibindo a lipólise e estimulando o transporte de glicose e aminoácidos para os músculos (atividade semelhante à insulina) (FELD; HIRSCHBERG, 1996).

A concentração plasmática de IGF-1 nos animais domésticos é estável, não apresentando picos de produção devido à sua meia vida biológica ser longa. A concentração de IGF-1 é baixa até o nascimento quando então passa a se elevar concomitantemente com o aparecimento de receptores de GH no fígado, o que comprova sua dependência em relação à ação do GH sobre a concentração de secreção de IGF-1 (BREIER; GLUCKMAN, 1991). A concentração basal de IGF-1 em bovinos é mais elevada que a do GH, variando de 100 ng/mL na fase pré-púbere até 2000 ng/mL próximo à puberdade, com valor médio em torno de 100 ng/mL em animais adultos (BURTONT *et al.*, 1994).

Thomas *et al.* (2002) avaliaram o perfil hormonal e a glicose sérica de bovinos das raças Angus, Brangus e Brahman dos 6 aos 10 meses de idade e relacionaram este perfil com o crescimento e desenvolvimento reprodutivo. Os autores verificaram que ocorreu um aumento linear da concentração de IGF-1 com o aumento da idade do animal, uma correlação positiva entre IGF-1 e peso corporal ($r = 0,52$), e também IGF- 1 e insulina ($r = 0,61$).

Da mesma forma, os hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos. Embora essa ação já ocorra no período embrionário, alguns desses órgãos e tecidos ainda são imaturos ao nascimento e têm um padrão de desenvolvimento temporal específico, o qual depende de um aporte adequado de T₃. Dele também depende o crescimento, a diferenciação e a regulação da atividade e metabolismo desses mesmos órgãos e tecidos na vida adulta, razões pelas quais os hormônios tireoidianos são considerados essenciais para o crescimento e desenvolvimento (NUNES, 2003).

O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) produzido no hipotálamo controla a liberação do hormônio estimulador da tireoide (TSH) pela hipófise anterior. O TSH atua nos receptores na tireoide para promover a síntese e liberação dos hormônios tireoidianos, principalmente de T4, mas também uma pequena quantidade de T3. Embora T4 seja secretado em maior quantidade pela glândula tireoide, T3 é a forma biologicamente ativa no organismo produzido pela desiodação enzimática de T4 na glândula tireoide e em tecidos extratireoidianos (HUSZENICZA; KULCSAR; RUDAS, 2002).

Desta forma, para a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvo, níveis intracelulares adequados de T3 devem ser garantidos. Tal equilíbrio está na dependência não só da atividade tiroideana como também da geração intracelular deste hormônio, processos que dependem, respectivamente, da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e da atividade de enzimas específicas, as desiodases (DIO1, DIO2 E DIO3) (BIANCO; DA CONCEIÇÃO, 2018).

Os hormônios tireoidianos aumentam o transporte e o armazenamento de glicose, sendo que os efeitos de T3 são aumentados pela insulina e inibidos pelo glucagon. Esses hormônios não afetam somente o crescimento, mas também a composição da carcaça através do aumento da atividade da lipase lipoproteica, aumentando a mobilização dos estoques de triglicérides do tecido adiposo e aumentando a concentração de ácidos graxos não esterificados (SQUIRES, 2003).

As concentrações de T4 e T3 em bovinos são influenciados por fatores ambientais como a temperatura ambiente, componentes da dieta e ingestão alimentar, existindo uma correlação

positiva entre as concentrações hormonais e o balanço energético (HUSZENICZA; KULCSAR; RUDAS, 2002).

Os glicocorticoides, o GH, insulina, T3 e T4 são todos fatores que regulam a expressão da leptina ou seu nível plasmático em certa medida. Em bovinos, os níveis plasmáticos de leptina estão diretamente correlacionados com a celularidade do tecido adiposo, escore de condição corporal e estado nutricional. Assim, os níveis circulantes de leptina em bovinos de corte aumentam durante a engorda (DAIX *et al.*, 2008).

Esteroides gonadais participam também da regulação hormonal do crescimento animal (NUNES, 2018). Em relação aos andrógenos, parte de sua ação ocorre por estímulo da secreção de GH e parte por propiciar aumento da síntese de IGF-I por ação direta, sendo que o pico de crescimento que ocorre na puberdade revela a importância desses hormônios no crescimento (BARTH; BRITO; KASTELIC, 2008).

A associação do peso corporal e testosterona pode ser explicada pelos efeitos anabólicos deste hormônio, dentre os quais se destacam o aumento da massa muscular, concentração de hemoglobina, de hematócrito, retenção de nitrogênio, deposição de cálcio nos ossos e diminuição das reservas de gordura do corpo. Os mecanismos anabólicos desencadeados para aumento da massa muscular incluem: aumento da síntese proteica via RNA mensageiro, balanço nitrogenado positivo, inibição dos efeitos catabólicos da massa muscular esquelética, estimulação da formação de osso, inibição do catabolismo proteico e estímulo da eritropoiese. Os efeitos anabólicos ocasionam retenção de nitrogênio, um constituinte básico da proteína, promovendo crescimento e desenvolvimento de massa muscular pela melhor utilização da proteína ingerida (ZHOU *et al.*, 2011).

2.3. CONTROLE GÊNICO DO CRESCIMENTO

A seleção fenotípica ao longo de várias gerações buscando aumentar e acelerar o crescimento pós-natal em relação ao peso ao nascer de bovinos se mostra eficaz ao longo dos anos. No entanto, a otimização dessa importante característica pode ser acelerada se a expressão de fatores de transcrição responsáveis pelo peso ao nascer e de crescimento forem determinados (MACNEIL, 2003; BENNETT, 2008).

O desenvolvimento embrionário do músculo esquelético é dependente da expressão coordenada de uma série de fatores de transcrição que irão determinar desde as células progenitoras do mesoderma até a realização do controle da diferenciação dos mioblastos que darão origem às fibras musculares (DU *et al.*, 2015).

Fatores de transcrição pertencentes a família de genes *PAX* desempenham um papel essencial na formação de tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção da função normal de certas células após o nascimento por meio do controle da atividade de genes específicos. No mesoderma (de onde derivam as células musculares), adipócitos e fibroblastos, as células que irão desempenhar atividade miogênica, inicialmente se expressam como os fatores de transcrição *Pax3+* e na sequência *Pax7+* sendo que a expressão subsequente de *Myf5* confere a essas células a determinação da atividade miogênica (DU *et al.*, 2015).

Dentre os fatores de transcrição está a família das proteínas miogênicas bHLH (*basic helix-loop-helix*), que atuam como fatores regulatórios da miogênese (MFRs). Os fatores regulatórios que compõe essa família são: *MyoD*, *miogenina*, *MFR4* e *Myf5*. Cada um dos MRFs possui a capacidade de converter células não musculares em células miogênicas competentes. Estudos sobre a função dos MRFs revelam uma hierarquia genética em que *MyoD* e *Myf5* atuam na especificação de células indiferenciadas em mioblastos (ou seja, determinação da linhagem miogênica) enquanto a *Miogenina* e *MRF4* são requeridos para controlar os processos de diferenciação final (BRYSON-RICHARDSON; CURRIE, 2008).

Adicionalmente, a miostatina (*MSTN*), é um membro da superfamília do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e um regulador negativo autócrino/parácrino crítico da massa muscular esquelética durante a embriogênese e crescimento muscular pós-natal precoce (BEYER *et al.*, 2013). Estudos demonstram que a expressão de *MSTN* regula negativamente *Pax3+* (AMTHOR *et al.*, 2002) e que sua inibição por algum fator resulta em fenótipos de dupla musculatura em função da hiperplasia e hipertrofia dos mioblastos resultando em um aumento significativo na massa muscular (YANG *et al.*, 2018; SHENG *et al.*, 2021). Autores relatam que bovinos de dupla musculatura apresentam em seu tecido muscular o dobro de fibras musculares com cerca de 20% a mais em hipertrofia muscular e 50% a menos de taxa de deposição de gordura em sua carcaça em comparação com outros com musculatura normal (WEGNER *et al.*, 2000).

Aiello; Patel; Lasagna (2018) descrevem um modelo para a ação da miostatina durante a proliferação e diferenciação de mioblastos no qual proteínas de retinoblastoma (Rb) em um baixo estado fosforilado inibem a divisão celular. A atividade de Rb é atenuada devido à hiperfosforilação pela ação da quinase de *CKD2*. No entanto, a atividade da *CDK2* é inibida pela p21, que é induzida pela ação do *MSTN*. O *MSTN* também ativa a sinalização *Smad2/3*, que inibe a expressão de *MyoD*, necessário para a diferenciação normal dos mioblastos. Na ausência de *MSTN*, a atividade de *CDK2* não é inibida, o que permite inativar Rb resultando

em aumento da proliferação de mioblastos. Ao mesmo tempo, a expressão de *MyoD* não é mais inibida pelas vias de sinalização *Smad2/3*, sendo possível então promover a diferenciação dos mioblastos extranumerários.

2.4. O CRESCIMENTO E SUA CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS

Como o crescimento e desenvolvimento de bovinos de corte está relacionado às fases pré-púbere e pós-puberal nas quais as taxas de crescimento aumentam até a puberdade mas começam a diminuir após essa fase, as características reprodutivas que determinam a puberdade têm sido amplamente utilizadas como indicadores de desenvolvimento e maturação sexual de touros (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993). Para os machos, o desenvolvimento sexual está associado ao crescimento gonadal acentuado, no qual o perímetro escrotal é a característica física mais comum avaliada para determinar o desenvolvimento testicular e a puberdade (SILVA *et al.*, 2015; MENEGASSI *et al.*, 2019).

Biologicamente, a puberdade pode ser definida no macho quando o ejaculado alcança 50 milhões de espermatozoides totais e 10% de motilidade (WOLF; ALMQUIST; HALE, 1965). A qualidade do sêmen em touros pré-púberes é ruim e uma melhora gradual caracterizada por um aumento na concentração, motilidade espermática e redução nas anormalidades morfológicas do espermatozóide é observada após a puberdade (WOLF; ALMQUIST; HALE, 1965; BOURGON *et al.*, 2017).

Não existe uma característica única que possa atestar a precocidade reprodutiva em touros. Em busca da identificação de rebanhos bovinos sexualmente precoces, algumas técnicas e metodologias são propostas. A técnica da ultrassonografia testicular é utilizada com o objetivo de determinar a ecotextura testicular e identificar a capacidade espermatogênica dos testículos uma vez que essa característica foi altamente correlacionada com a área de túbulos seminíferos, assegurando uma avaliação dos touros antes de atingirem a puberdade (ARAVINDAKSHAN *et al.*, 1999). No mesmo contexto, o uso do Hormônio Anti-Mulleriano (AMH) tem sido proposto como marcador biológico de precocidade sexual dos machos bovinos uma vez que apresenta correlação negativa com as concentrações de testosterona. A concentração sérica do AMH em animais não púberes é elevada enquanto os níveis de testosterona são baixos. Já nos animais púberes acontece uma inversão dessas concentrações, quando os níveis de AMH são reduzidos e os da testosterona se elevam (SILVA *et al.*, 2015; KITAHARA *et al.*, 2016).

Adicionalmente, para a seleção à puberdade alguns genes têm sido identificados como prováveis candidatos a marcadores genéticos. Fortes *et al.* (2012) associaram regiões genômicas nos cromossomos BTA2, BTA14 e no cromossomo X com características de puberdade em touros Brahman. Stafuzza *et al.* (2020) realizaram um estudo de associação genômica ampla para detectar regiões genômicas e genes candidatos putativos relacionadas a idade à puberdade em touros Nelore. Entre eles, vários genes já foram identificados relacionado às funções da espermatogênese, como *ADAM11*, *PARP2*, *PARP9*, *NECTIN3*, *SPA17*, *PRSS21*, *TRIP13*, *NDRG2*, *RNASE4*, *TEX14*, *MEIOC*, *SLX4*, *RAD51C*, *BRCA1*, *CSNK2A*, *CREBBP* e *TIMP2*. Da mesma forma, associações putativas entre a idade na puberdade em touros Angus e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos cromossomos BTA 1 e X foram identificadas por Fernández *et al.* (2016).

Além das características relacionadas a puberdade, estudos demonstram que alguns genes que têm impacto significativo nas características reprodutivas também podem afetar características de crescimento em animais de produção. Wang *et al.* (2017) identificaram que o gene *GDF9* (fator de diferenciação de crescimento 9) é um gene candidato para alta prolificidade em bovinos pois regula enzimas-chave das células da granulosa envolvidas na expansão do cumulus de oócitos bovinos. Ao mesmo tempo, os autores relataram que uma nova inserção/deleção na região reguladora 3' do gene *GDF9* caprino apresentou uma associação com o tamanho da ninhada e características de crescimento nesses animais (WANG *et al.*, 2017).

Duas variantes de inserção/exclusão do gene *SPAG17* (antígeno 17 associado ao esperma), que desempenha uma variedade de funções biológicas na reprodução, foram associadas significativamente com características de crescimento corporal em cabras, especialmente altura corporal (ZHANG *et al.*, 2019).

Pausch *et al.* (2014) realizaram estudos de associação genômica ampla (GWAS) e identificaram que uma mutação funcional no gene acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (*ACADVL*) estava relacionada com subfertilidade masculina. Outros estudos apontaram que essa mesma mutação foi associada a características de crescimento de bovinos de corte (ZHANG *et al.*, 2015).

O gene da proteína transmembrana 95 (*TMEM95*) é encontrado na região acrossomal de espermatozoides de touros heterozigotos e está intimamente relacionado ao desempenho reprodutivo de machos bovinos. Este gene possui relação com à interação de proteínas e reação acrossômica no momento da capacitação espermática (ZHANG *et al.*, 2016a). Recentemente,

Guo *et al.* (2021) relataram que polimorfismos no mesmo gene estão também relacionados com as características de crescimento corporal de bovinos.

2.5. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos em uma célula ou tecido, e sua quantidade, para um estágio de desenvolvimento específico, condição fisiológica, tratamento ou fenótipo. Representa um elo chave entre a informação codificada no DNA e o fenótipo e, portanto, compreender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares de células e tecidos (MALONE; OLIVER, 2009; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2010).

Os objetivos da análise do transcriptoma incluem a catalogação de todas as espécies de transcritos presentes em uma amostra biológica, a determinação da estrutura transcricional de genes (em termos de seus locais de início, extremidades 5' e 3', padrões de *splicing* e outras modificações pós-transcricionais) e a quantificação da mudança dos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento e sob diferentes condições (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2010).

Nas últimas décadas, algumas metodologias foram propostas visando o mapeamento e a quantificação de transcriptomas como por exemplo, análise da expressão gênica em série (SAGE, *Serial analysis of gene expression*), *microarrays* (microarranjos de cDNA), e o *RNA Sequencing* (RNA-Seq), técnica fortemente influenciada pelo desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento (*High-throughput Sequencing Technologies*) (ZHANG *et al.*, 2014).

Na técnica SAGE, após a transcrição o cDNA de fita dupla é digerido por enzimas de restrição para produzir fragmentos *tags* de 11 nucleotídeos que serão unidas novamente em longas fitas (500pb), amplificadas por PCR, concatenadas, clonadas em um vetor plasmidial e sequenciadas usando o sequenciamento Sanger de leitura longa. O número de vezes que uma determinada *tag* foi sequenciada reflete diretamente a abundância de cada RNA mensageiro (mRNA) presente no tecido (LOWE *et al.*, 2017). Uma das limitações da técnica é o chamado *tag mapping*, o estabelecimento de uma correta associação entre cada uma das *tags* sequenciadas e o transcrito que lhe deu origem (LASH *et al.*, 2000).

Na metodologia de microarranjos, sondas são hibridizadas com amostras de cDNA permitindo a detecção destas moléculas. Os cDNAs alvos são marcados com moléculas fluorescentes sendo possível a sua detecção após a hibridização e obtenção de sinal que será

proporcional ao número de moléculas hibridizadas e que por sua vez, será proporcional a abundância dos transcritos na amostra estudada (BARBULOVIC-NAD *et al.*, 2008). Apesar de ter sido muito utilizada, a metodologia possui algumas limitações como altos níveis de ruídos devido a hibridização cruzada, acurácia limitada para a identificação de transcritos expressos em pequena quantidade, o conhecimento prévio da sequência do genoma a ser analisada, a não detecção de variantes de *splicing* ou genes novos que não estejam presentes no arranjo e a dificuldade em comparar os níveis de expressão entre diferentes experimentos (MALONE; OLIVER, 2009; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2010; LOWE *et al.*, 2017).

A técnica de sequenciamento em larga escala RNA-Seq, em função das suas vantagens em relação às anteriores, se apresenta atualmente como o método mais eficiente para o mapeamento e quantificação dos transcriptomas, sendo o método principal de escolha para quantificação dos níveis de expressão diferencial envolvendo condições específicas (ZHANG *et al.*, 2014; STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

O RNA-Seq resulta em uma determinação dos níveis de expressão gênica de maneira mais acurada que os microarranjos pois permite acesso direto às sequências de mRNA, evita viés e variação devido à hibridização e possibilita a detecção de *splicing* alternativo (MALONE; OLIVER 2009). Ademais, por não existirem etapas de clonagem *in vivo* (em vetor plasmidial), a técnica requer uma quantidade muito menor de RNA. Outra vantagem é que a detecção dos transcritos não fica restrita somente aqueles correspondentes a uma sequência genômica preexistente (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2010).

Os sequenciamentos estão divididos em Sequenciamento de Primeira Geração (degradação química e Interrupção da cadeia-Sanger), Sequenciamento de Segunda Geração conhecidos como Sequenciamento NGS - *Next Generation Sequencing* (454-Roche, Illumina Genome Analyser-HiSeq/MiSeq, SOLID, Ion Torrent, PacBio RS) e Sequenciamento de Terceira Geração (Pacific Biosciences e o Oxford Nanopore). Atualmente, a plataforma Illumina é a mais popular de sequenciamento de nova geração pois é capaz de realizar grandes sequenciamentos com alta qualidade de *reads* por um valor mais acessível.

De uma forma geral, na técnica de RNA-Seq utilizando a plataforma Illumina, após a extração do mRNA de um organismo, as amostras de RNA são fragmentadas em pequenas sequências de DNA complementares (cDNA) e depois sequenciadas a partir de uma plataforma de alto rendimento. Essas pequenas sequências são então alinhadas a uma sequência genômica de referência para reconstruir quais regiões do genoma estavam sendo transcritas. Em seguida, os níveis de expressão para cada gene ou isoforma são estimados e os dados mapeados são normalizados usando métodos estatísticos. Esses dados podem ser então utilizados para análises

de co-expressão gênica, identificação de SNPs, identificação de expressão alelo específica, identificação de padrões de *splicing* alternativos e identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs). Por fim, a relevância dos dados produzidos é avaliada a partir de um contexto biológico (LI *et al.*, 2015; LOWE *et al.*, 2017).

Em bovinos, os primeiros estudos a utilizar a técnica de RNA-Seq foram de Medrano; Rincon; Islas-Trejo (2010) e Huang; Khatib (2010). Os primeiros autores realizaram uma análise comparativa do transcriptoma de células somáticas do leite e tecido mamário em bovinos da raça Holandesa. Já Huang; Khatib (2010) realizaram levantamento profundo dos transcriptomas embrionários fornecendo uma maior compreensão do desenvolvimento embrionário de pré-implantação em bovinos. Ambos os estudos demonstraram que a técnica de RNA-Seq é uma ferramenta poderosa para analisar a expressão gênica global em tecido animal.

Desde então, uma série de trabalhos vem sendo realizados utilizando a técnica de RNA-Seq para o entendimento de mecanismos moleculares que influenciam em características de interesse econômico de bovinos de corte.

Em trabalhos recentes, a técnica de RNA-Seq foi utilizada para a identificação de possíveis genes candidatos e vias metabólicas que regulam características produtivas como área de olho de lombo e espessura de gordura (SILVA-VIGNATO *et al.*, 2019; SANTOS SILVA *et al.*, 2020), para a análise de associação entre concentração mineral e qualidade de carne (DINIZ *et al.*, 2019), identificação de reguladores genéticos da quantidade mineral nas células musculares (AFONSO *et al.*, 2020), identificação de processos biológicos relacionados ao consumo alimentar residual (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018), identificação de processos biológicos associados ao teor de ácidos graxos no músculo esquelético e seus fatores regulatórios (CESAR *et al.*, 2015, 2016), identificação de processos relacionados a maciez e qualidade da carne bovina (GONÇALVES *et al.*, 2018) entre outros.

A técnica de RNA-Seq também tem auxiliado no estudo da expressão de genes relacionados a características reprodutivas como a investigação de transcritos envolvidos na espermatogênese e associados a fertilidade em bovinos (DE LIMA *et al.*, 2021; PRAKASH *et al.*, 2021) e a identificação de receptores reguladores da secreção de hormônios importantes como o hormônio luteinizante e o hormônio folículo-estimulante em fêmeas (KADOKAWA, 2020).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para este trabalho foram utilizados 129 novilhos machos, não castrados e certificados para raça Angus de acordo com padrão racial definido pela Associação Brasileira de Angus – filhos de touros puros de pedigree Angus e vacas ½ Angus. Os animais foram provenientes de três fazendas localizadas no município de Guarapuava/PR que adotam o mesmo sistema de criação (semi-intensivo - modalidade *Creep feeding*), mesmo manejo sanitário e nutricional e que realizam intensa seleção genética para precocidade produtiva e ganho de peso.

Durante a fase de cria, os bezerros alimentaram-se de, além do leite materno, suplemento concentrado comercial específico para esta fase contendo 20% de proteína bruta sendo fornecido à vontade em sistema de *creep feeding*, o qual proporcionou um consumo médio diário de 1,2 kg/dia. Os animais foram desmamados com aproximadamente 7 meses de idade (com cerca de 150-200kg), seguindo para um sistema de recria em pastagens de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) no verão e Azevém (*Lolium multiflorum*) no inverno com suplementação de concentrado na quantidade de 1% do peso corporal até atingir peso mínimo para entrada no confinamento (350 kg de peso corporal). Na fase de terminação, antes do início do confinamento, os animais foram submetidos a um período de 15 dias de adaptação à dieta de terminação em que o incremento de concentrado foi realizado gradativamente. No confinamento, a dieta foi fornecida 3 vezes ao dia, sendo composta por 50% de volumoso (silagem de milho) e 50% de concentrado comercial com 19% de proteína bruta. O controle da oferta foi realizado por técnico capacitado através da leitura diária do cocho. Essa leitura se trata da observação dos alimentos disponibilizados no cocho do fornecimento anterior a fim de quantificar sobras ou escassez de alimento. Para isso, considera fatores como a observação do escore de cocho (vazio ou quantidade de sobras), o comportamento dos animais, o escore de cocho noturno e o período do confinamento. Baseado nessas características, fatores de correção foram calculados com metodologia de notas que determinaram a necessidade ou não de ajustes no volume da dieta.

Os animais permaneceram em confinamento até atingirem peso vivo e cobertura de gordura suficiente para atender os padrões de classificação de carcaça de acordo com a Resolução N°070/2006 que define o Padrão do Novilho Paranaense. O peso de carcaça mínimo exigido para machos varia entre 105-225 kg e para espessura de gordura na carcaça, o valor mínimo exigido é de 1 mm enquanto o valor máximo é de 10 mm (PARANÁ, 2006). No

momento em que os animais atingiram esses padrões, os mesmos foram encaminhados para abate, realizado de acordo com as normas de abate e bem-estar animal no manejo pré-abate dos animais de produção como proposto pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA).

Os animais foram divididos em 2 grupos de acordo com a idade a qual atingiram o peso e a cobertura de gordura ideais para abate. Os grupos foram então definidos como: grupo de animais abatidos até os 13 meses e classificados como hiperprecoces, e grupo de animais abatidos acima de 17 meses e classificados como precoces.

Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com o preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) sob o parecer CEUA nº 8936230517.

3.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRODUTIVOS

Os parâmetros produtivos mensurados foram: peso vivo, peso e rendimento de carcaça e espessura de gordura. A classificação e tipificação das carcaças ocorreram conforme a Instrução Normativa nº 9, de 4 de maio de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2004).

A aferição do peso vivo dos animais ocorreu por pesagem em balança eletrônica no momento da saída dos animais da fazenda produtora para o frigorífico de abate.

O peso de carcaça foi verificado no frigorífico logo após o abate por meio da pesagem da carcaça quente com utilização de balança eletrônica. O rendimento de carcaça foi calculado dividindo-se o peso da carcaça (soma das duas meias carcaças resultantes do abate) pelo peso vivo do animal. Esse resultado multiplicado por 100, forneceu o rendimento expresso em porcentagem.

A aferição da espessura de gordura de carcaça foi realizada na carcaça quente, após sua pesagem e anteriormente a entrada da mesma na câmara de resfriamento. Com auxílio de paquímetro, três locais diferentes da carcaça foram avaliados, sendo: a altura da 6ª costela, sobre o músculo grande dorsal, em sua parte dorsal; a altura da 9ª costela, sobre o músculo grande dorsal, em sua parte ventral; e a altura da 12ª costela, sobre o músculo serrátil dorsal caudal. A espessura de gordura foi determinada através da média aritmética das regiões analisadas.

3.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS

Os parâmetros reprodutivos avaliados foram: peso e volume testicular, motilidade, morfologia e concentração espermática, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e atividade mitocondrial.

3.3.1. Testículos, epidídimos e colheita de espermatozoides

Testículos e epidídimos foram colhidos no frigorífico no momento do abate na etapa de sangria e imediatamente armazenados em sacos plásticos individuais devidamente identificados, acondicionados em caixa térmica previamente estabilizada a temperatura de 5°C e transportados ao laboratório para análises subsequentes. O tempo entre colheita e início da manipulação dos testículos e epidídimos no laboratório foi de 2 horas pós-abate.

Os testículos foram avaliados individualmente quanto ao seu peso e volume. Para a aferição de peso, utilizou-se balança de precisão semi-analítica. Já a medida de volume testicular foi realizada através da imersão do testículo em cálice volumétrico repleto de água e a mensuração do volume deslocado.

A colheita de espermatozoides do epidídimo foi realizada através de pequenas incisões com auxílio de um bisturi na cauda do epidídimo e as células colhidas com pipeta automática, de acordo com Nichi *et al.* (2017). Para limitar a contaminação com sangue, os epidídimos foram cuidadosamente dissecados buscando evitar a incisão em regiões vascularizadas. O volume da amostra foi suspenso em meio PBS (Tampão fosfato – salino; 34,72 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 18,68 mM KH₂PO₄, 92,4 mM NaCl) para análises subsequentes.

3.3.2. Avaliações espermáticas morfofuncionais: convencionais e funcionais

Os espermatozoides coletados da cauda do epidídimo de cada testículo foram avaliados quanto as suas características através das análises convencionais de motilidade total, morfologia e concentração espermática segundo técnicas de rotina (CBRA, 1998). As análises funcionais realizadas foram: integridade das membranas plasmática e acrossomal e avaliação da atividade mitocondrial.

3.3.2.1. Avaliações espermáticas convencionais

3.3.2.1.1. Motilidade espermática

Para avaliação subjetiva da motilidade total, uma alíquota de 10 µL da amostra previamente diluída em meio PBS foi avaliada através de visualização em microscopia óptica (Modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 40x, entre lâmina e lamínula e mantidas a temperatura de 37°C sobre placa aquecida. Para motilidade total a amostra foi classificada em uma escala de 0 a 100% de motilidade.

3.3.2.1.2. Morfologia e concentração espermática

A amostra espermática foi fixada em solução salina tamponada contendo 4% de formaldeído (34,72 mM Na₂HPO₄ 2H₂O, 18,68 mM KH₂PO₄, 92,4 mM mM NaCl, 4 % (v/v) formaldeído) previamente aquecida a 37° C. Para a avaliação da morfologia espermática, foram analisadas 200 células pela técnica da câmara úmida sob microscopia de contraste de fase (Modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 400x. As células foram classificadas de acordo com (BLOM, 1973) em porcentagem de defeitos espermáticos maiores [defeitos de acrossomo; gota protoplasmática proximal; teratológicas; *pouch formation*; defeitos de cabeça (subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal e contorno anormal); defeitos de peça intermediária; defeitos de cauda (enrolada na cabeça, fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota)], defeitos menores [gota protoplasmática distal, defeitos de cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal); inserção da cauda anormal (oblíqua, retroaxial e abaxial)] e defeitos totais (soma dos maiores e menores).

A concentração espermática foi avaliada por meio da técnica da câmara de Neubauer utilizando diluição prévia (1:100) em solução salina tamponada contendo 4% de formaldeído. Após montagem da câmara, a contagem dos espermatozoides foi realizada em aumento de 400x em microscopia de contraste de fase (Modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão).

3.3.2.2. Avaliações espermáticas funcionais

3.3.2.2.1. Integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi avaliada por meio da técnica de coloração de eosina-nigrosina, como previamente descrita (BARTH; OKO, 1989). A preparação da solução de coloração foi realizada com 1% de eosina Y (referência E4009, Sigma-Aldrich Co, MO,

USA) e 10% de nigrosina (referência 198285, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) em água ultrapura. Cinco microlitros de cada amostra foram incubadas com 5 µl de solução de coloração e o volume total foi depositado em lâmina de microscopia para realização de esfregaço com posterior secagem a temperatura ambiente. A análise foi realizada em microscopia óptica de imersão em aumento de 1000x na qual foram analisados 200 espermatozoides por lâmina e a membrana plasmática classificada em íntegra ou lesionada.

3.3.2.2.2. *Integridade acrossomal*

A integridade do acrossomo foi avaliada através da coloração simples contendo 1% (w/v) rosa bengala (Sigma-Aldrich Co, MO, USA), 1% (w/v) fast green FCF (Sigma-Aldrich Co, MO, USA), e 40% de etanol em 200 mM de tampão de fosfato dissódico contendo 100 mM ácido cítrico pH 7,2, como previamente descrito Pope *et al.* (1991). Cinco microlitros de cada amostra foram incubados com 5 µl de solução de coloração por 1 min a 37°C. O volume total foi depositado em lâmina de microscopia para realização de esfregaço com posterior secagem em placa aquecida a 37°C. A análise foi realizada em microscopia óptica de imersão em aumento de 1000x na qual foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina e o acrossomo classificado em intacto ou não intacto.

3.3.2.2.3. *Atividade mitocondrial*

A atividade mitocondrial foi avaliada pela medição da atividade da enzima citocromo C oxidase na peça intermediária como previamente descrito (HRUDKA, 1987). Para isso, o DAB (3,3'-Diaminobenzidina, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) foi diluído em PBS (2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 8 mM NaHPO₄, 1,4 mM KPO₄, pH 7.4) para a concentração final de 1 mg/ml e mantido a - 20° C até o uso. Vinte microlitros de cada amostra foram incubados a 37°C durante 1 hora a 37°C na ausência de luz com 20 µl de solução de DAB pré-aquecida. Dez microlitros de cada amostra foram depositados em lâmina de microscopia, para realização do esfregaço e posterior secagem a 37°C também na ausência de luz. Após a secagem, as lâminas foram incubadas por 10 minutos em solução contendo 10% de formaldeído (F8775, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) em PBS. Após secagem das lâminas em temperatura ambiente, 200 espermatozoides foram analisados em microscopia de contraste de fase em imersão em aumento de 400X e classificados com base no grau de coloração da peça intermediária, sendo que quanto maior o grau de coloração, maior a atividade mitocondrial da célula. As células foram

classificadas em: DAB I (completamente corada), DAB II (mais de 50% corado), DAB III (menos de 50% corado) e DAB IV (não corada).

3.4. DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS

Para as dosagens séricas hormonais, amostras de sangue foram colhidas durante a etapa de sangria no abate e encaminhadas ao laboratório para separação do soro o qual foi armazenado a - 80°C. As concentrações séricas de triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e testosterona foram analisadas por imunoensaio quimioluminescente utilizando-se os *kits* IMMULITE da SIEMENS (T3 total, T4 total e testosterona; Siemens, Dublin, Ireland) de acordo com as instruções do fabricante. A diidrotestosterona (DHT) foi analisada por um imunoensaio enzimático competitivo colorimétrico usando um *kit* comercial de ELISA de Diidrotestosterona Bovina (DHT) (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ALVO

No tecido testicular foram analisados seis genes relacionados com a espermatogênese (*NDRG2*, *ADAM11*, *TRIP13*, *SPA17*, *CSNK2A1* e *CSNK2A2*), dois genes relacionados com a esteroidogênese (*STAR* e *HSD3B1*) e um gene relacionado com a puberdade (*AMH*). No tecido muscular dos mesmos animais foram analisados genes relacionados com a proliferação e a diferenciação celular reguladas pela miostatina (*MYOD*, *MYF5*, *RBI*, *MSTN*), conforme previamente descrito por Aiello; Patel; Lasagna (2018). Além desses genes, incluímos o *IGFRI* e a *LEP* pelo seu papel já conhecido no crescimento.

Para a análise de expressão gênica, fragmentos de tecido testicular e do tecido muscular (músculo *Psoas maior*) foram colhidos, acondicionados em microtubos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. A colheita do tecido testicular foi realizada na etapa de sangria do processo de abate. Já o tecido muscular foi colhido ao final do processo de abate antes da etapa de refrigeração. As amostras foram então transportadas ao laboratório e armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C até análises subsequentes.

A metodologia para análise da expressão do mRNA de genes que participam da regulação da espermatogênese e do desenvolvimento muscular envolveu as etapas de: extração do RNA total dos tecidos testicular e muscular, análise de concentração e integridade do RNA

total extraído, reação de transcrição reversa para obtenção de cDNA, confecção e padronização dos oligonucleotídeos específicos e quantificação dos transcritos por PCR em tempo real (RTqPCR). O detalhamento dessas metodologias está apresentado nos subitens a seguir.

Para a extração de RNA total do tecido testicular a metodologia utilizada foi a de separação em coluna de sílica. Para a extração de RNA total do tecido muscular utilizou-se o método de guanidina-fenol-clorofórmio.

3.5.1. Extração de RNA total do tecido testicular pela metodologia de coluna de sílica

Os fragmentos de testículos coletados e congelados anteriormente foram pulverizados individualmente em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo de porcelana. O material pulverizado foi transferido para microtubos em alíquotas contendo 30 mg de tecido de cada amostra e armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C. Na sequência, o RNA total dos testículos foi extraído pela metodologia de separação em coluna de sílica com o auxílio do kit *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as células do tecido foram inicialmente lisadas através da adição de 600 µl de *Buffer RLT Plus* (preparado anteriormente: 10 µl de β - Mercaptoetanol para 1 ml de *Buffer RLT Plus*) ao tubo contendo o tecido e homogeneizadas com auxílio de agitador de tubos tipo vórtex por 30 segundos. Em seguida, o lisado passou por centrifugação durante 3 minutos a velocidade de 10.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido por pipetagem e transferido para a coluna *gDNA Eliminator* para nova centrifugação a 10.000 x g durante 30 segundos. Após o descarte da coluna *gDNA Eliminator*, 450 µl de etanol 70% foram adicionados ao fluxo, homogeneizados e 700 µl dessa solução transferidos para uma coluna de centrifugação *RNeasy* acoplada a um tubo de coleta e centrifugadas a 10.000 x g durante 30 segundos. O fluxo foi descartado e 700 µl de *Buffer RW1* adicionado à coluna de rotação do *RNeasy* seguido de centrifugação a 10.000 x g durante 30 segundos. O mesmo procedimento de centrifugação foi realizado adicionando 500 µl de *Buffer RPE* (preparado anteriormente: 4 volumes de etanol 100% foram adicionados para cada 1 volume de *Buffer RPE*) à coluna de rotação *RNeasy*. Para lavagem final da membrana da coluna, outros 500 µl de *Buffer RPE* foram adicionados à coluna de rotação *RNeasy* e centrifugada por 2 minutos a 10.000 x g. O fluxo foi descartado e a coluna centrifugada a 10.000 x g durante 1 minuto para secagem da membrana. Por fim, a coluna *RNeasy* foi transferida para um novo tubo de coleta e a eluição do RNA ocorreu através da adição de 40 µl de água livre de RNase diretamente à membrana da coluna

seguido de centrifugação a 10.000 x g durante 1 minuto. Finalizada a etapa de extração, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C.

3.5.2. Extração de RNA total do tecido muscular pelo método de guanidina-fenol-clorofórmio

Os fragmentos de tecido muscular colhidos e congelados anteriormente foram pulverizados individualmente em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo de porcelana. O material pulverizado foi transferido para microtubos em alíquotas contendo 30 mg de tecido de cada amostra e armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C. Posteriormente, o RNA total dos testículos foi extraído através do método guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 2006) através da utilização do Reagente Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, 1 mL do reagente Trizol® foi adicionado ao microtubo contendo 30 mg do tecido pulverizado e, com auxílio de um agitador de tubos do tipo vortex, a amostra foi homogeneizada durante 1 minuto. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados, homogeneizados durante 15 segundos e novamente incubados durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcorrido o tempo de incubação, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C para que ocorresse a separação da solução em 3 fases: fase aquosa incolor composta pelo RNA, interfase de coloração branca e fase de fenol de coloração vermelha onde estão presentes DNA e proteínas. A fase aquosa foi transferida para um microtubo novo e o RNA total presente nesta fase foi precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol e incubado *overnight* a - 20 °C. Após período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para formação do sedimento de RNA. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado por duas vezes através da adição de 500 µL de etanol a 75 % seguido de centrifugação a 12.000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Ao término das lavagens, o sobrenadante foi removido e o sedimento presente no fundo do microtubo passou por secagem a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Finalizando a fase de extração, o sedimento de RNA de cada amostra foi diluído em água ultrapura (Ultrapure™ Distilled Water, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) em volume proporcional ao tamanho dos sedimentos. Por fim, as amostras de RNA foram armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C.

3.5.3. Análise de concentração e integridade do RNA total

A concentração do RNA total foi estimada pela densidade óptica da solução através de espectrofotômetro (KASVI Modelo K23-002, São José dos Pinhas, PR) mensurando-se a absorvância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A leitura a 260 nm permitiu o cálculo da concentração de RNA na amostra, sendo que uma densidade óptica de 1 corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de RNA de fita simples. Já a razão da absorvância a 260 nm e 280 nm (A_{260} / A_{280}) forneceu uma estimativa da pureza do RNA, sendo que essa proporção deve estar acima de 1,8 no RNA isolado. As preparações puras de RNA têm uma razão A_{260} / A_{280} entre 1,8 e 2,0. Todas as amostras utilizadas no estudo respeitaram esses parâmetros.

A integridade do RNA total extraído do tecido testicular e tecido muscular foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% por meio da visualização, em transiluminador UV, das bandas do RNA ribossomal 18S e 28S coradas com brometo de etídeo. Após confirmação de integridade, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C e posteriormente submetidas a transcrição reversa.

3.5.4. Reação de Transcrição Reversa (RT)

Após a etapa de extração, análise de concentração e integridade do RNA, 2,5 µg de RNA total foram submetidos a reação de transcrição reversa (RT) para a síntese da fita de DNA complementar (cDNA) a fita de mRNA. Para isso, utilizou-se o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Seguindo o protocolo, uma alíquota de volume correspondente a 2,5 µg de RNA total juntamente com 0,5 µg/µl de oligonucleotídeos de desoxitimidina (oligo dt) e quantidades suficientes de água livre de RNase para volume final de 2,5 µL foram adicionados em um microtubo. As amostras foram incubadas em termociclador (AXYGEN MAXYGENE modelo term-1000, Foster City, Califórnia, USA) a temperatura de 70 °C por 5 minutos para abertura da fita de RNA e anelamento dos oligonucleotídeos. Transcorrido período de incubação, as amostras foram imediatamente resfriadas a 4°C e mantidas nessa temperatura durante 5 minutos. Na sequência, foram adicionados para cada amostra uma solução contendo 2 µL de tampão da enzima (GoScript 5X), 3,25 µL de água livre de RNase, 0,5 µL de desoxirribonucleotídeos (ddNTPs), 0,25 µL de inibidor de ribonuclease (RNasin), 1 µL de cloreto de magnésio e 0,5 µL da enzima M-MLV GoScript Reverse Transcriptase. A reação com volume total de 10 µL foi incubada em termociclador inicialmente por 5 minutos a 25 °C e em seguida por 1 hora a 42 °C. A inativação ocorreu a 42 °C por 15 minutos. Para cada reação

foram obtidos 10 µL de cDNA com concentração final estimada em 250 ng/µL. As amostras foram armazenadas a - 20 °C até subseqüentes análises de PCR em tempo real.

3.5.5. Confeção dos oligonucleotídeos

Para a confeção dos oligonucleotídeos, as seqüências de referência dos transcritos dos genes previamente selecionados *TRIP13*, *ADAM11*, *AMH*, *CNK2A1*, *CNK2A2*, *HSD3B1*, *NDRG2*, *SPA17*, *STAR*, *IGF1R*, *LEP*, *MSTN*, *MYOD1*, *MYOF5*, *RBI* e *ACTB* (constitutivo) foram obtidos no banco de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os oligonucleotídeos foram confeccionados com o auxílio do recurso *Pick Primer* de forma a amplificar ao menos uma região de junção entre dois éxons distintos, proporcionando maior especificidade e não amplificação de DNA genômico. A análise da especificidade das seqüências senso e antisenso obtidas dos mRNAs de estudo foram obtidas pela comparação com outras seqüências do banco de dados do NCBI através do programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Os pares de oligonucleotídeos foram verificados quanto a ligações complementares pelos recursos do OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Na tabela 1 estão descritos os genes, as seqüências dos oligonucleotídeos e a seqüência de referência utilizada no NCBI.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos senso (S) e antisenso (A) dos genes utilizados para o ensaio de RTqPCR e as suas respectivas seqüências de referência

Gene	Oligonucleotídeo (5' – 3')	Seqüência de referência
<i>TRIP13</i> (Interator 13 do receptor do hormônio tireoidiano)	S: TGGTCTGAGTTTGACGAGCC A: TTGCACGCGCTCAAATCAAT	XM_002696452.4
<i>ADAM11</i> (Metalopeptidase domínio 11)	S: AGGTCTCTCCACACTTGGG A: GGACCCTGGTATCCAACCTGC	XM_024980925.1
<i>AMH</i> (Hormônio anti-mulleriano)	S: GTGACTTGACCACCTTCGCA A: AACCTCAGCAAGGGTGTGG	NM_174110.1
<i>CNK2A1</i> (Caseína quinase 2 α 1)	S: GCCGCCATATTGTCTGTGTG A: GAGAGGCAGCTGGGGAGTAA	NM_174635.2
<i>CNK2A2</i> (Caseína quinase 2 α 2)	S: CAGCCTTGTGCAGATAACGC A: CCGTTTTGTGTCTGCTCACG	NM_174636.2

(continua)

(continuação)

Gene	Oligonucleotídeo (5' – 3')	Sequência de referência
<i>HSD3B1</i> (Hidroxi- δ -5-esteróide desidrogenase, 3 β esteróide δ -isomerase 1)	S: TGCTTTCTGGTTCCTGGTGAG A: CTCCACCAACAGGCAGATGAT	NM_174343.3
<i>NDRG2</i> (Membro 2 da família NDRG)	S: ACCCTGACCCCTAACCCCTAC A: GAGTGAGTCTTGGCCACCTC	NM_001035304.1
<i>SPAI7</i> (Proteína autoantigênica Sp 17)	S: ACCTGAAAAACATGAGCCTGGA A: CTGTGGGGGTAAAGCCAGTC	NM_001076440.2
<i>STAR</i> (Proteína reguladora aguda esteroideogênica)	S: ATCAAAAGCAAGGGACTGAATGG A: CCCCAGTCAAGCTAAGAGG	NM_174189.3
<i>IGF1R</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)	S: AGCGCCTCCAACCTTTGTCTT A: CGCTGATCCTCGACTTGGG	NM_001244612.1
<i>LEP</i> (Leptina)	S: ACTACAGGACATGTTGCGGC A: AGGATGCCACATAGGCTCT	NM_173928.2
<i>MSTN</i> (Miostatina)	S: CGCCTGGAAACAGCTCCTAA A: GAAGATCAGACTCCGTGGGC	NM_001001525.3
<i>MYOD1</i> (Diferenciação miogênica 1)	S: AGCAAGTTTCTGGCAACCCT A: AAGTTGCAGAGAGAGCCGTC	NM_001040478.2
<i>MYF5</i> (Fator miogênico 5)	S: TCTGATGGCATGCCTGAATGT A: AGGTTGAGAATCGGTGCTGG	NM_174116.1
<i>RB1</i> (Co repressor transcricional RB1)	S: TTGCCTGGCTCTCAGATTCAC A: ACGTGGAGTTGGCCCTTTTT	NM_001076907.1
<i>ACTB</i> (Actina beta)	S: GCAGGAGTACGATGAGTCCG A: TGTCACCTTCACCGTTCCAG	NM_173979.3

Fonte: Cavallin (2022).

3.5.6. Padronização dos oligonucleotídeos

Após confecção pela empresa Exxtend Biotecnologia Ltda. (Paulínia, SP, BR), os oligonucleotídeos foram padronizados a partir de *pool* de cDNA previamente obtido. Com o intuito de otimizar as reações, foram avaliados diferentes concentrações de cDNA e oligonucleotídeos. O cDNA foi diluído de forma seriada (1:5, 1:10, 1:20 e 1:40) e as concentrações dos oligonucleotídeos avaliadas utilizando-se inicialmente 2 μM e, quando necessário, ajustada para 1 μM , 0,8 μM ou 0,2 μM . O fluoróforo utilizado foi o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Life Technologies Corporation, Van Allen Carlsbad, CA, USA). Todas as reações foram realizadas em duplicata, em placas de 96 poços MicroAmp (Applied Biosystems, Foster City, EUA) no equipamento StepOnePlus™ Real- Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para determinar o desempenho do ensaio, a especificidade dos produtos amplificados e a eficiência da reação foi avaliada de acordo com NOLAN; HANDS; BUSTIN (2006). A especificidade foi determinada através da curva de dissociação (*melt curve*) que caracteriza a temperatura de dissociação da dupla fita de DNA baseada em tamanho e composição dos fragmentos, distinguindo-a de dímeros de oligonucleotídeos e outros produtos inespecíficos. A eficiência da reação foi calculada através da construção automática da curva padrão pela equação: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Uma curva padrão (*standard curve*) de PCR em tempo real é representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico. Um *slope* da curva padrão de -3,32 indica uma reação de PCR com 100% de eficiência. Os *slopes* mais negativos que -3,32 (p. ex. -3,9) indicam reações com menos de 100% de eficiência. Os *slopes* mais positivos que -3,32 (p. ex. -2,5) podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem. Dessa forma, a eficiência ideal da PCR deve ser de 100% (quando a reação produzirá um aumento de 10 vezes no *amplicon* da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação $\log_2 10 = 3,3219$), sendo indicado valores entre 90% e 110%.

3.5.7. Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Após a padronização das concentrações de cDNA e oligonucleotídeos e a identificação das condições ideais para o ensaio, a expressão dos genes relacionados com a regulação da espermatogênese e ao desenvolvimento muscular foi avaliada pelo método de PCR quantitativo em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR). O objetivo da avaliação foi estimar a quantidade relativa dos níveis mRNA dos genes estudados comparando os níveis de mRNA de

das amostras com a expressão de um gene constitutivo. Nesse estudo, utilizamos o gene constitutivo β -actina (*ACTB*) devido a sua conhecida consistência para uso como gene normalizador em bovinos (ROBINSON; SUTHERLAND; SUTHERLAND, 2007; PÉREZ; TUPAC-YUPANQUI; DUNNER, 2008).

O ensaio foi realizado com uso do reagente PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação foi realizada com os recursos do equipamento Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore) nas seguintes condições de ciclo: 50°C (2 min), 95°C (2 min), e 40 ciclos de 95 °C (15 s) e 60°C (30 s). Ao final da amplificação, obteve-se a curva de dissociação ou *melting curve* para confirmar a especificidade da reação. Os valores médios de *cycle threshold* (Ct) foram automaticamente determinados pelo StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems) e a quantificação relativa realizada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

Para análise da expressão gênica global foram selecionados 6 animais de cada grupo. Desta forma, para cada grupo foram sequenciadas 12 amostras, sendo 6 provenientes do tecido testicular e 6 amostras provenientes do tecido muscular de acordo com tamanho amostral sugerido por Schurch *et al.* (2016).

A análise das diferenças gênicas a partir da técnica de RNA-Seq abrange as seguintes etapas: extração do RNA total dos tecidos testicular e muscular, análise de concentração do RNA extraído, controle de qualidade das amostras extraídas através do sistema TapeStation Agilent, preparação da biblioteca de mRNA, sequenciamento de nova geração (NGS) e análise da qualidade dos dados do sequenciamento. O detalhamento dessas metodologias está apresentado nos subitens a seguir.

3.6.1. Extração do RNA total do tecido testicular e muscular pela metodologia de coluna de sílica

O RNA total do tecido testicular foi extraído pela metodologia de separação em coluna de sílica com o auxílio do kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com protocolo do fabricante, conforme descrito no item 3.5.1. O RNA total livre de DNA

genômico extraído para análise de expressão gênica alvo foi utilizado também na etapa de expressão gênica global.

O RNA total do tecido muscular foi extraído pela metodologia de separação em coluna de sílica com o auxílio do kit *RNeasy® Fibrous Tissue Mini* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com protocolo do fabricante. Para isso, os fragmentos de tecido muscular colhidos e anteriormente pulverizados em nitrogênio líquido foram transferidos para microtubos em alíquotas de 30 mg. As células do tecido foram inicialmente lisadas através da adição de 300 µl de *Buffer RLT* (preparado anteriormente: 10 µl de β-Mercaptoetanol para 1 ml de *Buffer RLT*) e homogeneizadas com auxílio de agitador de tubos tipo vórtex. Em seguida, 590 µl de água livre de RNase e 10 µl de solução de proteinase K foram adicionados ao lisado, o qual foi homogeneizado por pipetagem completa e incubado a 55 °C durante 10 minutos. Transcorrido tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g durante 3 minutos e o sobrenadante da centrifugação transferido para um novo tubo no qual se adicionou 0,5 volumes (geralmente 450 µl) de etanol 100%. Após homogeneização por pipetagem, 700 µl da amostra foram transferidos para coluna *RNeasy Mini spin* e submetidas a centrifugação a 10.000 x g durante 15 segundos. Após centrifugação, o fluxo foi descartado e o mesmo procedimento de centrifugação se repetiu com o restante da amostra. Nessa etapa, a membrana da coluna *RNeasy Mini spin* recebeu tratamento com 80 µl de DNase I (preparado anteriormente: 10 µl de solução-mãe DNase I e 70 µl de *Buffer RDD*) para remoção de traços de DNA da amostra e obtenção de RNA total livre de DNA genômico. Transcorrido o tempo de digestão (15 minutos a temperatura ambiente) a membrana passou por seguidas lavagens, inicialmente através da adição de 350 µl de *Buffer RW1*, centrifugação por 15 segundos a 10.000 x g e descarte do fluxo. A segunda e terceira lavagens foram realizadas pela adição de 500 µl de *Buffer RPE* (preparado anteriormente: 4 volumes de etanol 100% foram adicionados para cada 1 volume de *Buffer RPE*), sendo a primeira por 15 segundos a 10.000 x g e a segunda durante 2 minutos a 10.000 x g. Após realização das lavagens e do descarte do fluxo, a coluna *RNeasy Mini spin* foi submetida a centrifugação na mesma rotação das lavagens durante 1 minuto para completa secagem da membrana. Por fim, a coluna foi transferida para um novo tubo de colheita e a eluição do RNA ocorreu através da adição de 30 µl de água livre de RNase diretamente à membrana da coluna seguido de centrifugação a 10.000 x g durante 1 minuto. Finalizada a etapa de extração, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a - 80 °C.

3.6.2. Análise da concentração do RNA total

Para o RNA-Seq, a determinação da concentração e pureza do RNA total foram realizadas por fluorometria com o uso dos reagentes específicos (Qubit RNA assay kit, ThermoFisher) e auxílio do equipamento Qubit (ThermoFisher). Para isso, a solução de trabalho Qubit® foi preparada diluindo o reagente Qubit® RNA BR na proporção 1: 200 em Tampão Qubit® RNA BR. Foram adicionados 190 µL de solução de trabalho Qubit® em cada um dos microtubos utilizados para os padrões. Na sequência, foram adicionados 10µL de cada padrão Qubit® ao tubo com solução de trabalho e homogeneizados cuidadosamente em vórtex durante 3 segundos. Para as amostras, a solução de trabalho Qubit® foi adicionada aos microtubos individuais para um volume final de 200 µL, sendo 198 µL de solução de trabalho e 2 µL de amostra. Na sequência, padrões e amostras foram incubados em temperatura ambiente durante 2 minutos. Após tempo de incubação, realizou-se a calibração com os padrões e a leitura da concentração das amostras.

3.6.3. Controle de qualidade do RNA total

A análise da integridade do RNA total foi realizada por eletroforese capilar das amostras utilizando o sistema Agilent 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Germany) e o kit Agilent RNA Screen Tape Quick, (Agilent Technologies). Para isso, os reagentes do kit foram mantidos a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido de homogeneização em vórtex. Para o preparo do *Ladder*, foram adicionados 5 µl de tampão e 1 µl de *RNA Ladder*. As amostras foram descongeladas a 4 °C e preparadas adicionando-se 5 µl de tampão e 1 µl de amostra de RNA. As amostras e o *Ladder* foram homogeneizadas e na sequência desnaturados a 72 ° C durante 3 minutos. Com o objetivo de parar a desnaturação, os tubos foram resfriados a 4 °C durante 2 minutos. Em seguida, as amostras foram inseridas no equipamento 2200 TapeStation para leitura.

3.6.4. Preparo da biblioteca de mRNA

Para o preparo da biblioteca de mRNA, utilizou-se o kit Illumina Stranded mRNA library Preparation (Illumina Inc) de acordo com protocolo do fabricante. A partir de 500 ng de RNA total, o mRNA foi purificado utilizando-se sequências complementares de timinas (poli T) ligadas a esferas magnéticas. Após a purificação, o RNA poliA+ isolado foi fragmentado e

preparado para a síntese de DNA complementar (cDNA). O cDNA foi obtido por meio de transcrição reversa utilizando hexâmeros randômicos e gerando assim a primeira fita de cDNA. Em seguida, a fita de RNAm que gerou a primeira fita de cDNA foi removida e sintetizada uma segunda fita de cDNA. Nessa reação utilizou-se esferas paramagnéticas (AMPure XP beads, Beckman Coulter) para purificar o cDNA, separando-o do restante de reagentes e enzimas utilizados na reação. Em seguida, foi adicionada uma única base “A” (adenina) às extremidades 3’ cDNA. A base A é necessária para a próxima etapa de ligação dos adaptadores, pois estes possuem uma base T (timina) complementar ao A nas suas extremidades 3’. Além de auxiliar na ligação dos adaptadores, a adição da base A ao cDNA evita a formação de concatâmeros de cDNA. Múltiplos adaptadores (*Indexes*) foram ligados às extremidades do cDNA utilizando a enzima ligase e tampões apropriados contidos no kit. Depois da ligação dos adaptadores, realizou-se reação de PCR para enriquecer de forma seletiva os fragmentos de cDNA aos quais foram ligados os adaptadores e amplificação da biblioteca. Foram utilizados oligonucleotídeos complementares aos adaptadores e a PCR realizada com poucos ciclos de amplificação para evitar amplificação tendenciosa.

3.6.5. Avaliação do tamanho dos fragmentos da biblioteca

Após amplificação, o tamanho dos fragmentos formados na biblioteca foi avaliado utilizando-se o equipamento Agilent 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Germany) e o kit D1000 (Agilent Technologies), utilizado para analisar moléculas de DNA de 35 a 1000 pb. Para isso, os reagentes do kit foram mantidos a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido de homogeneização em vórtex. Na sequência, foram preparados *Ladder* e amostra. Para o *Ladder* foram adicionados e homogeneizados 3 µL de tampão D1000 com 1 µL de *Ladder* D1000. Para o preparo da amostra foram adicionados e homogeneizados 3 µL de tampão D1000 com 1 µL de amostra de DNA. Na sequência, o *Ladder* e as amostras foram distribuídos em duas *strips tube* (com 8 tubos cada) próprias para o equipamento. As amostras e o *Ladder* foram homogeneizados durante 1 minuto usando um vórtex de placa IKA programado em 2.000 rpm. As amostras preparadas e a D1000 ScreenTape foram então inseridas no equipamento para leitura. O tamanho dos fragmentos foi de aproximadamente 360 pb. Nesse momento realizou-se também a quantificação das bibliotecas em fluorímetro Qubit com o kit dsDNA HS (ThermoFisher). Após a quantificação precisa, as bibliotecas foram diluídas e desnaturadas para 2,3 nM.

3.6.6. Sequenciamento de nova geração (NGS) e controle de qualidade

O sequenciamento foi realizado no equipamento Illumina NovaSeq 6000 utilizando o Kit NovaSeq V4 (2x150) (Illumina Inc, San Diego, Ca, USA). Todas as análises de sequenciamento foram realizadas no Instituto para Pesquisa do Câncer de Guarapuava (IPEC), em Guarapuava/PR.

As análises de controle de qualidade para os dados brutos das amostras de RNA-Seq foram realizadas utilizando os programas FastQC (0.11.3) e MultiQC (v1.10).

As leituras foram alinhadas ao genoma de referência (*Bos taurus*, ARS-UCD1.2) utilizando o software STAR (v2.7.8a) (DOBIN *et al.*, 2013). O mesmo software foi utilizado para a identificação e quantificação de transcritos.

3.6.7. Identificação de genes diferencialmente expressos, formação de redes de interação e perfil de expressão gênica por subtipo celular testicular

A análise da expressão diferencial de genes entre os grupos foi realizada com os recursos do pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) em ambiente R (v4.1.0) (R CORE TEAM, 2021). A análise de componentes principais (PCA), os gráficos volcano plots e os heatmaps foram gerados utilizando o pacote ggplot2 (v3.3.4). O parâmetro “fazenda”, referente a fazenda de origem dos animais, foi utilizado no modelo estatístico como fator de correção para este possível efeito.

O software STRING v11.5 foi utilizado para formação das redes de interação conhecidas entre proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos (DEGs) (SZKLARCZYK *et al.*, 2017). A rede de interação entre proteínas (PPI) foi então visualizada pelo software Cytoscape v3.9.9 (SHANNON *et al.*, 2003). O valor de $\log_2\text{FoldChange} > |0,5|$ foi utilizado como filtro para visualização das proteínas *up regulated* e *down regulated*. Com o objetivo de identificar as proteínas centrais da rede, a análise de centralidade foi realizada utilizando o aplicativo CytoHubba disponibilizado pelo próprio Cytoscape. Este tipo de análise se baseia em dois parâmetros: *degree* (K) e *betweenness centrality* (BC). As proteínas com altos valores de K são consideradas *hubs*, enquanto que as que possuem altos valores de BC são conhecidas como *bottlenecks*, e quando possuem altos valores para ambos são denominadas de *hub-bottlenecks*.

Para o tecido testicular foi realizado o perfil de expressão por subtipo celular (células de Leydig, células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermátides, células endoteliais,

células mióides peritubulares, células musculares lisas e macrófagos) a partir das informações de single cell RNA-seq do experimento *The Dynamic Transcriptional Cell Atlas of Testis Development during Human Puberty* que avaliou testículos humanos da puberdade ao adulto (GUO *et al.*, 2020) com os recursos da ferramenta *Single Cell Expression Atlas* disponibilizada pela EMBL-EBI no endereço <https://www.ebi.ac.uk/gxa/sc/home>.

3.6.8. Avaliação do gene *SPEM1* no tecido muscular por RT-qPCR

O gene *SPEM1* foi avaliado no tecido muscular pela metodologia de RT-qPCR. A metodologia para essa avaliação está descrita no item 3.5.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram primeiramente submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov–Smirnov e o teste de homocedasticidade de Bartlett. Seguiu-se a análise entre os grupos pelo teste *t*-Student para as variáveis paramétricas ou a teste *U* Mann-Whitney para as variáveis não-paramétricas, com a utilização dos recursos do software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, LLC). As diferenças estatísticas foram consideradas quando o valor de $p < 0,05$. Os dados de RNA-Seq foram avaliados estatisticamente por metodologia específica, como detalhada no item 3.6.7.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRODUTIVOS NO MOMENTO DO ABATE

Em relação às características produtivas avaliadas no momento do abate observou-se que não houve diferença entre os grupos em relação aos parâmetros de peso vivo (PV), peso e cobertura de gordura da carcaça (Tabela 2).

Tabela 2 - Média e erro padrão da média dos parâmetros produtivos de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate

Variáveis	Hiperprecoce	Precoce	Valor p
Peso Vivo (kg)	512,1± 4,095	507,6 ± 5,678	0,1780
Peso Carcaça (kg)	281,6± 3,595	289,1± 3,647	0,1479
Cobertura Gordura (cm)	4,95± 0,07	4,917± 0,14	0,6137

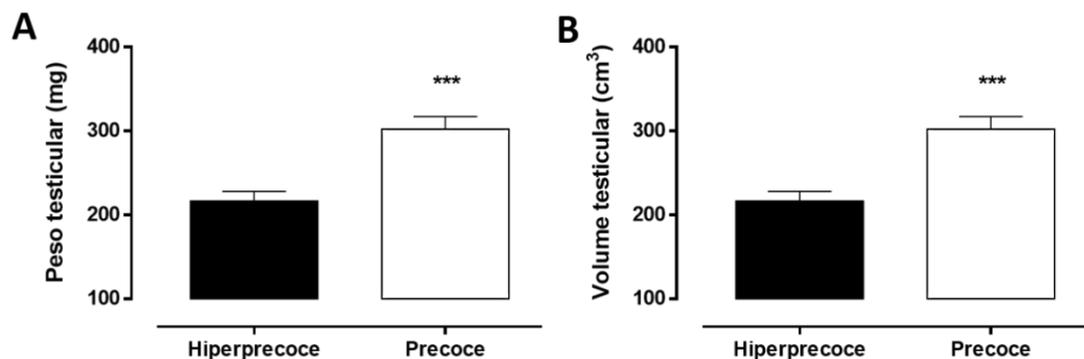
Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. Os valores são expressos como a média ± EPM. (n=23/grupo).

4.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS NO MOMENTO DO ABATE

Através das mensurações testiculares entre os grupos, foi possível observar um maior peso e maior volume testicular dos animais classificados como precoces (Figura 1).

Figura 1 - Média e erro padrão da média do peso (A) e volume testicular (B) de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate



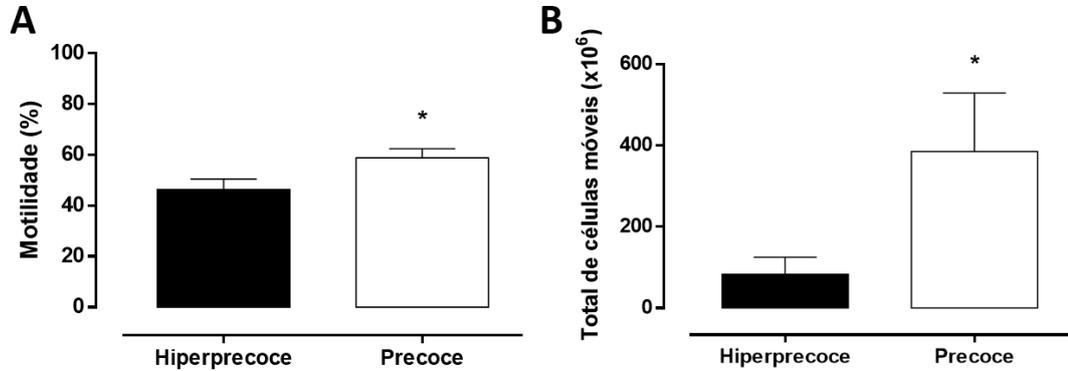
Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média ± EPM. *** indica diferença entre os grupos com $p < 0,003$ (n=23/grupo).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. EPM: erro padrão da média.

Em relação à avaliação espermática, o grupo de animais precoces apresentou maior porcentagem de células móveis e maior concentração espermática (Figura 2).

Figura 2 - Média e erro padrão da média da motilidade (A) e concentração total de células móveis (B) de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate



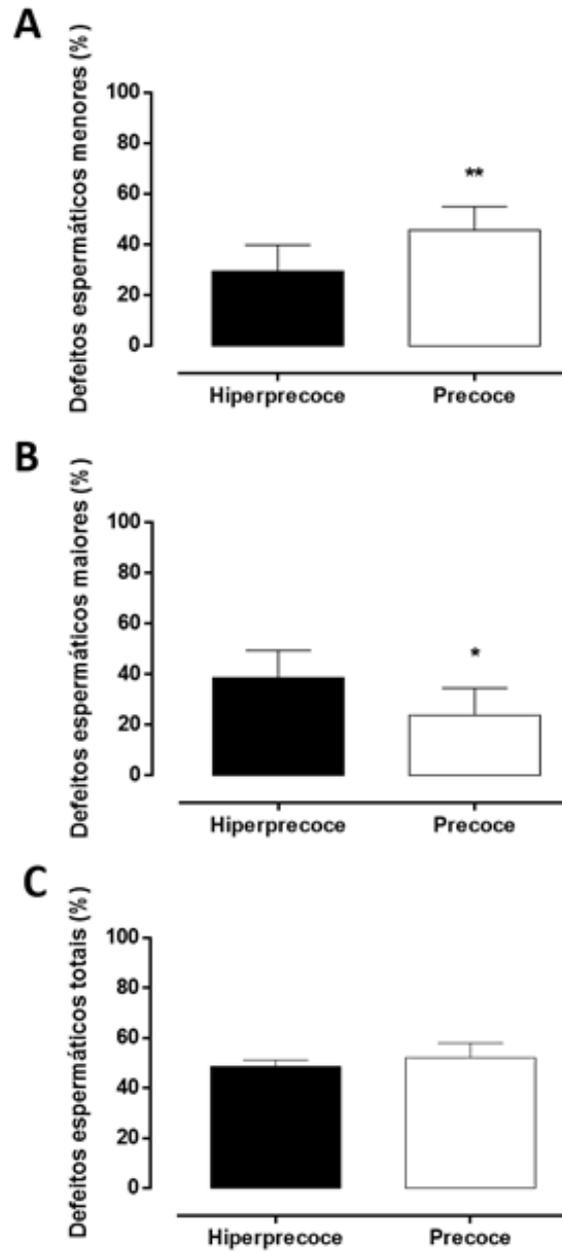
Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM; * indica diferença entre os grupos com $p < 0,05$ ($n = 23/\text{grupo}$).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. EPM: erro padrão da média.

Na avaliação de morfologia espermática, os animais precoces apresentaram uma maior porcentagem de defeitos espermáticos menores. Já os defeitos espermáticos maiores foram observados em menor proporção nos animais precoces (Figura 3). No entanto, não houve diferença estatística na característica de defeitos espermáticos totais entre os grupos. Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na avaliação de integridade das membranas plasmática, acrossomal e atividade mitocondrial das células espermáticas (Tabela 3).

Figura 3 - Média e erro padrão da média dos defeitos maiores, menores e totais de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate



Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM. * indica diferença entre os grupos com $p < 0,05$; ** indica diferença entre os grupos com $p < 0,01$. (n=23/grupo).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. EPM: erro padrão da média.

Tabela 3 - Média e erro padrão da média dos parâmetros funcionais de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo de animais da raça Angus classificados em hiperprecoce e precoce no momento do abate

Variáveis	Hiperprecoce	Precoce	Valor p
Integridade Acrossomal (%)	95,68 ± 0,75	96,58 ± 0,5	0,336
Atividade Mitocondrial I (%)	90,55 ± 3,98	92,05 ± 4,26	0,797
Atividade Mitocondrial II (%)	28,00 ± 24,48	29,38 ± 26,8	0,41
Atividade Mitocondrial III (%)	14,78 ± 13,83	16,41 ± 15,64	0,399
Atividade Mitocondrial IV (%)	3,86 ± 2,78	3,56 ± 3,21	0,131
Integridade de Membrana Plasmática	77,45 ± 4,66	85,11 ± 4,9	0,95

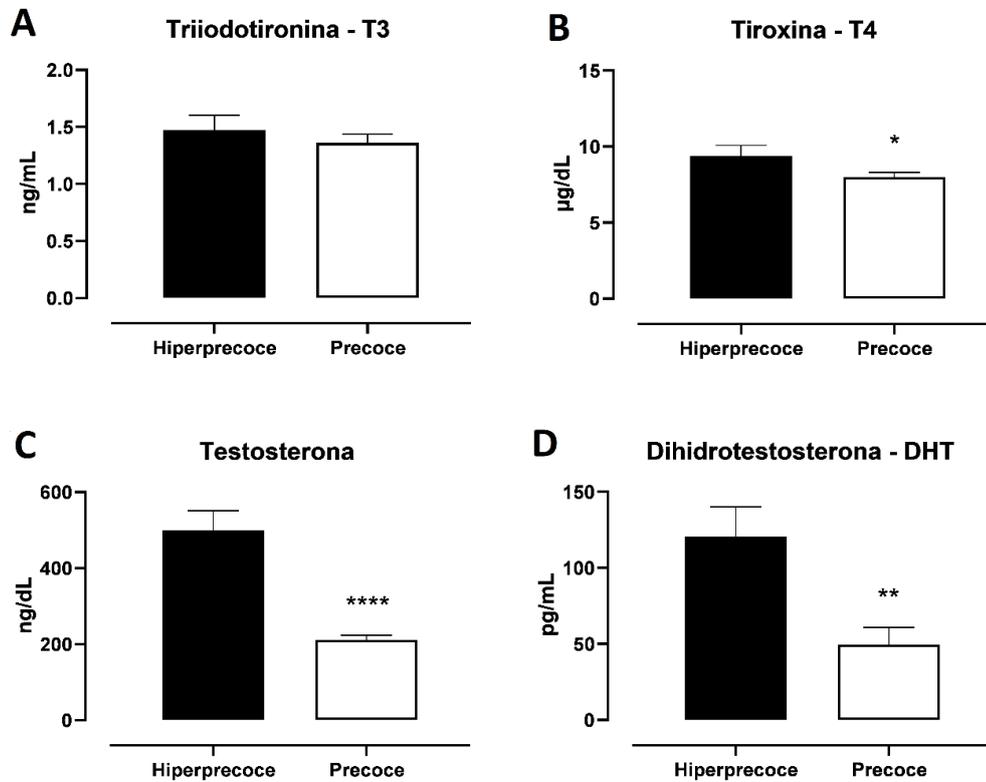
Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. Os valores são expressos como a média ± EPM. (n=23/grupo).

4.3. DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS

O perfil hormonal dos hormônios triiodotironina (T3), tiroxina (T4), testosterona e dihidrotestosterona (DHT) de animais classificados como hiperprecoces e precoces no momento do abate pode ser visualizado na Figura 4. O grupo de animais precoces apresentou menor concentração sérica de testosterona e de DHT em relação aos animais hiperprecoces. Embora a concentração sérica de T3 tenha sido igual entre os grupos, a concentração sérica de T4 foi menor nos animais do grupo precoce.

Figura 4 - Média e erro padrão da média da concentração sérica de testosterona (A), di-hidrotestosterona (B), triiodotironina (C) e de tiroxina (D) no momento do abate de animais da raça Angus classificados como hiperprecoce e precoce



Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM. A *ACTB* foi empregada como gene constitutivo. * indica diferença entre os grupos com $p < 0,05$; ** indica diferença entre os grupos com $p < 0,01$; **** indica diferença entre os grupos com $p < 0,0001$. (n=20/grupo).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. EPM: erro padrão da média.

4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ALVO

4.4.1. Padronização dos oligonucleotídeos dos genes de interesse *TRIP13*, *ADAM11*, *AMH*, *CNK2A1*, *CNK2A2*, *HSD3B1*, *NDRG2*, *SPA17*, *STAR*, e genes constitutivos *ACTB* e *MRPL19* no tecido testicular

As concentrações de oligonucleotídeos e cDNA utilizadas nas reações de PCR em tempo real foram testadas em ensaios preliminares como previamente descrito. Na tabela 4 estão contidos as concentrações de oligonucleotídeos, concentração de cDNA e a eficiência da reação obtida em cada padronização e utilizada nas análises de expressão gênica alvo.

Tabela 4 - Padronização da concentração de oligonucleotídeo (μM), concentração de cDNA (ng) e eficiência da reação (%) dos genes de interesse e constitutivos do tecido testicular

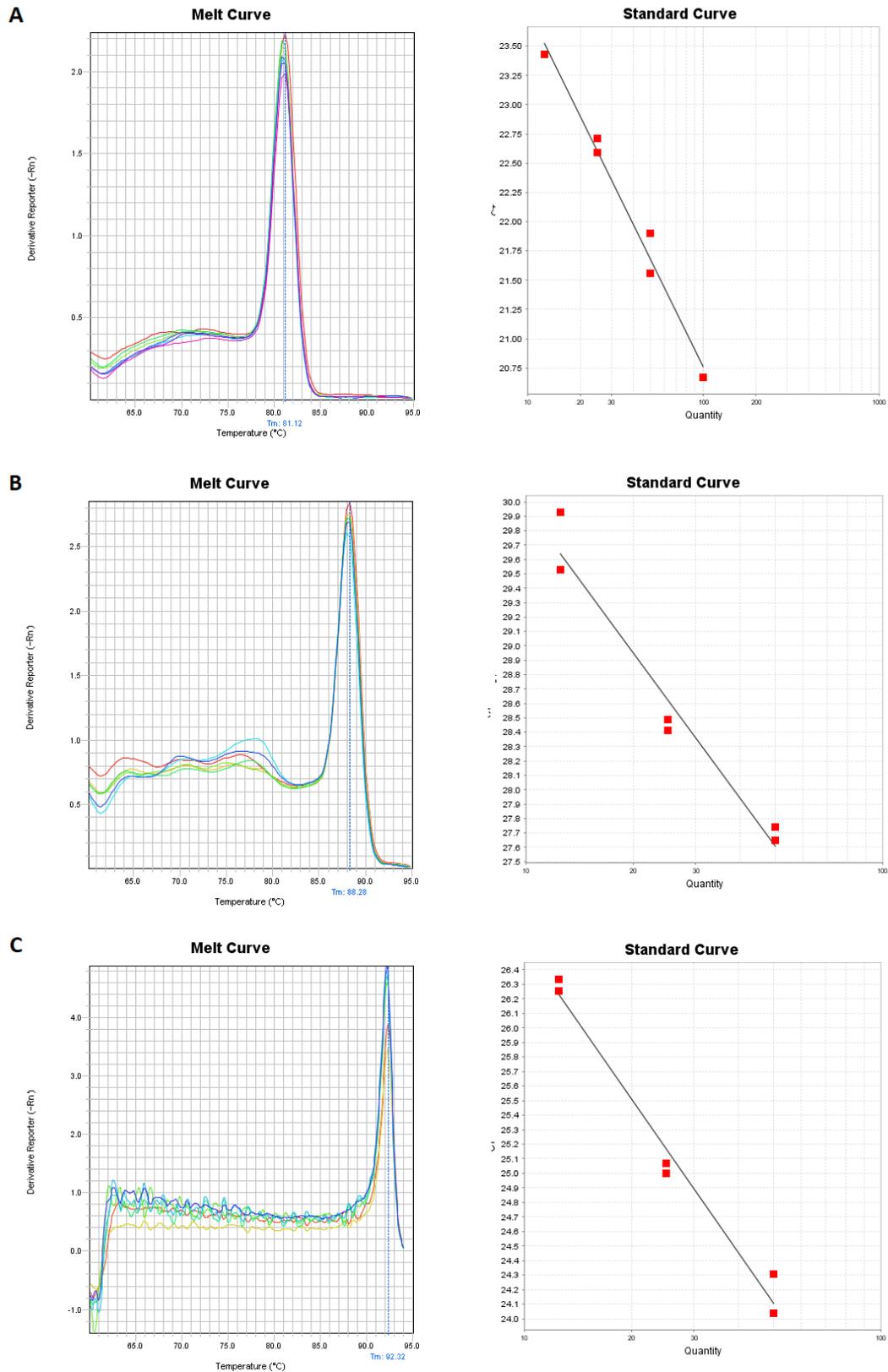
Gene	Concentração de primers (μM)	Concentração de cDNA (ng)	Eficiência da reação (%)
<i>TRIP13</i>	1	25	112,55
<i>ADAM11</i>	1	25	97,67
<i>CNK2A1</i>	1	25	96,31
<i>AMH</i>	1	25	92,178
<i>CNK2A2</i>	1	25	102,59
<i>HSD3B1</i>	1	25	133,37
<i>NDRG2</i>	1	25	109,12
<i>SPA17</i>	1	25	109,57
<i>STAR</i>	1	25	124,87
<i>ACTB</i>	0,8	25	90,59
<i>MRPL19</i>	1	25	103,85

Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *TRIP13*: Interator 13 do receptor de hormônio tireoidiano; *ADAM11*: Metalopeptidase domínio 11; *CNK2A1*: Caseína quinase 2 α 1; *AMH*: Hormônio anti-mulleriano; *CNK2A2*: Caseína quinase 2 α 2; *HSD3B1*: Hidroxi- δ -5-esteróide desidrogenase, 3 β esteroide δ -isomerase 1; *NDRG2*: Membro 2 da família NDRG; *SPA17*: Proteína autoantigênica Sp 17; *STAR*: Proteína reguladora aguda esteroideogênica; *ACTB*: Actina beta; *MRPL19*: Proteína ribossomal mitocondrial L19.

As *melt curves* que determinaram a especificidade das reações e as *standard curves* que determinaram a eficiência de cada *primer* padronizado estão representadas nas Figuras 5, 6, 7 e 8. Em todos os ensaios, pode-se observar na *melt curve* apenas um *amplicon*, o que é reflexo da especificidade dos oligonucleotídeos utilizados.

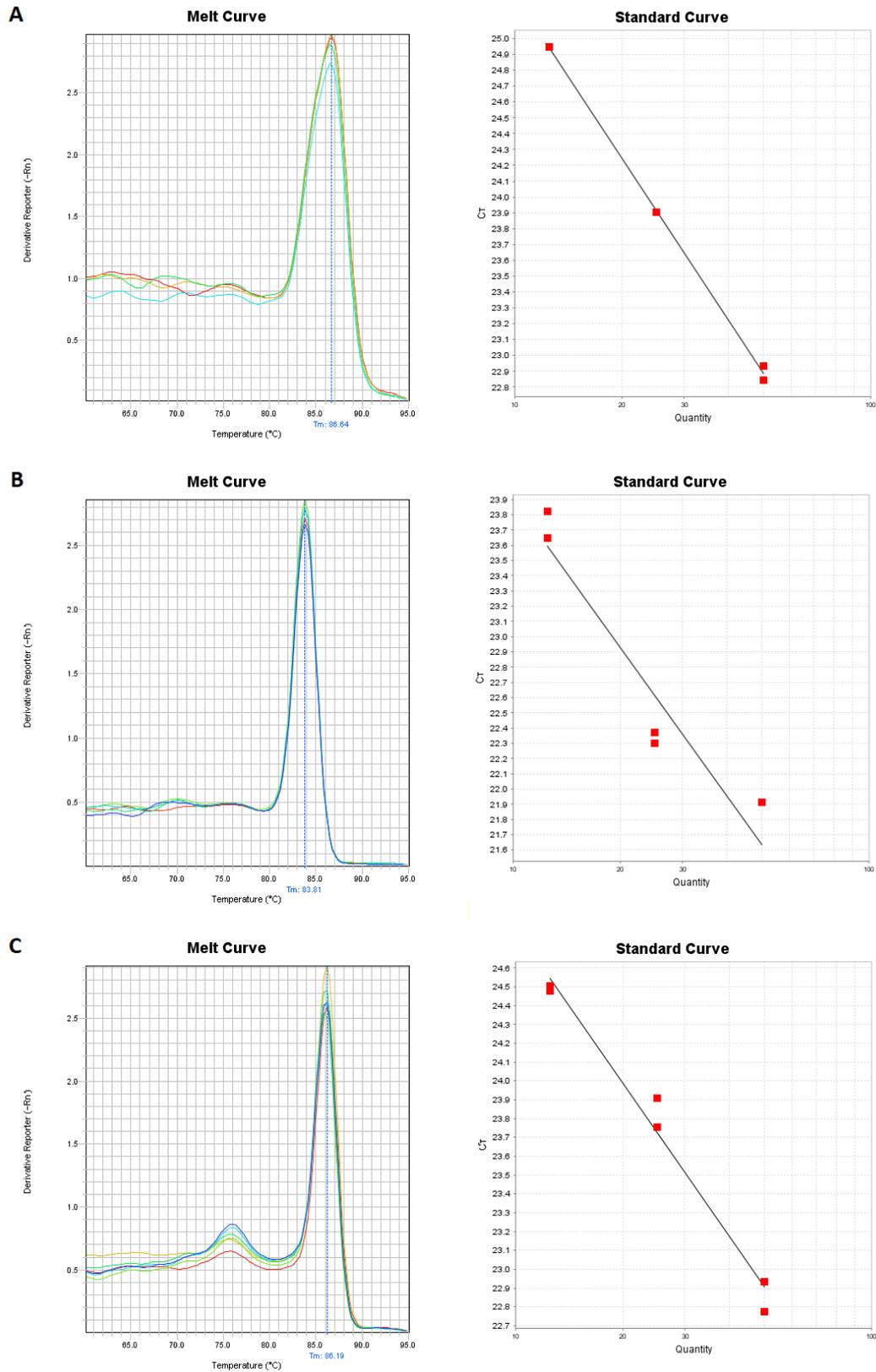
Figura 5 - *Melt curve* e *standard curve* demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes *TRIP13* (A), *ADAM11* (B) e *AMH* (C) no tecido testicular



Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *TRIP13*: Interator 13 do receptor de hormônio tireoidiano; *ADAM11*: Metalopeptidase domínio 11; *CNK2A1*: Caseína quinase 2 α 1; *AMH*: Hormônio anti-mulleriano.

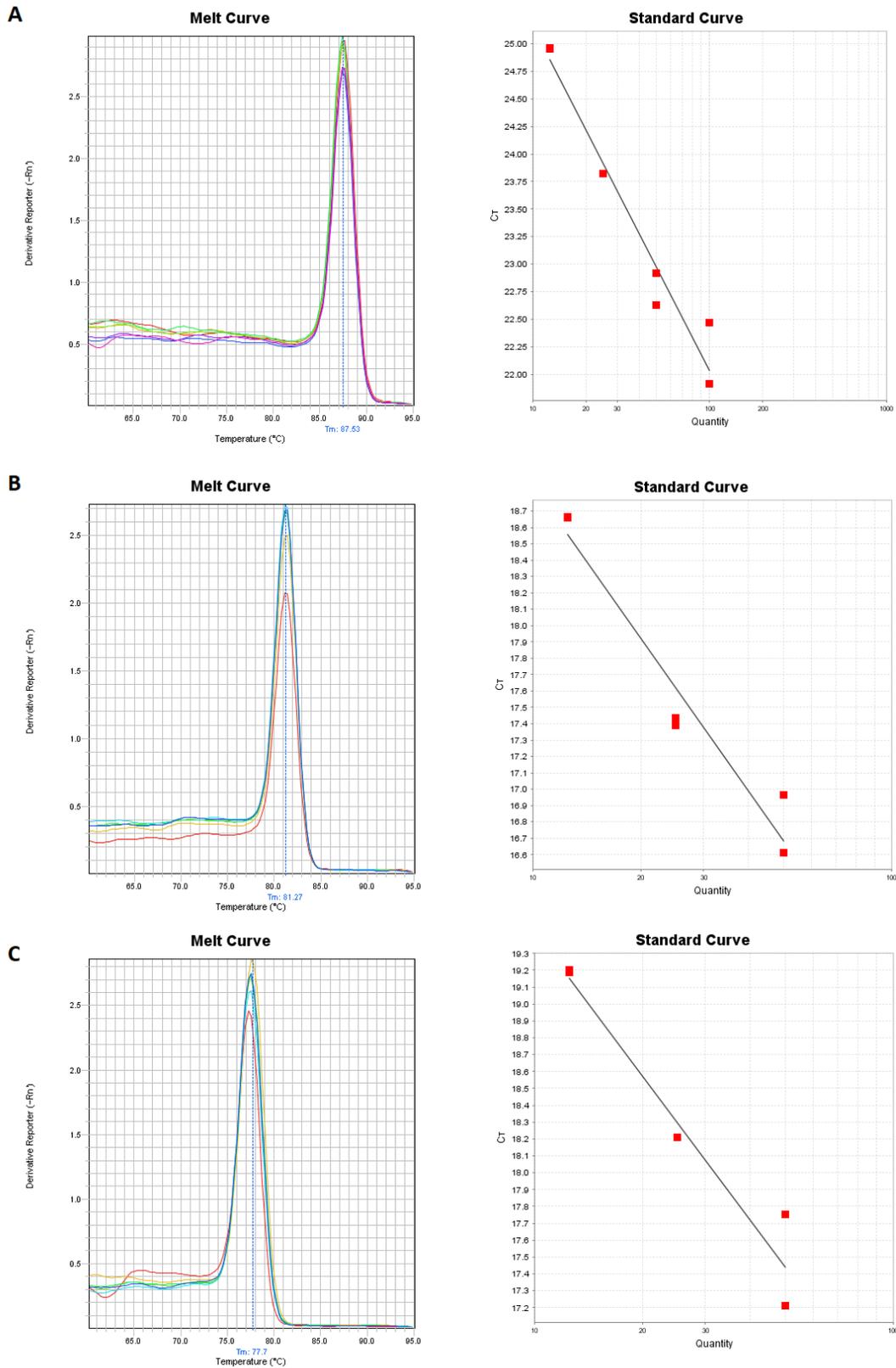
Figura 6 - *Melt curve* e *standard curve* demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes *CNK2A1* (A), *CNK2A2* (B) e *HSD3B1* (C) no tecido testicular



Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *CNK2A1*: Caseína quinase 2 α 1; *CNK2A2*: Caseína quinase 2 α 2; *HSD3B1*: Hidroxi- δ -5-esteróide desidrogenase, 3 β esteroide δ -isomerase 1.

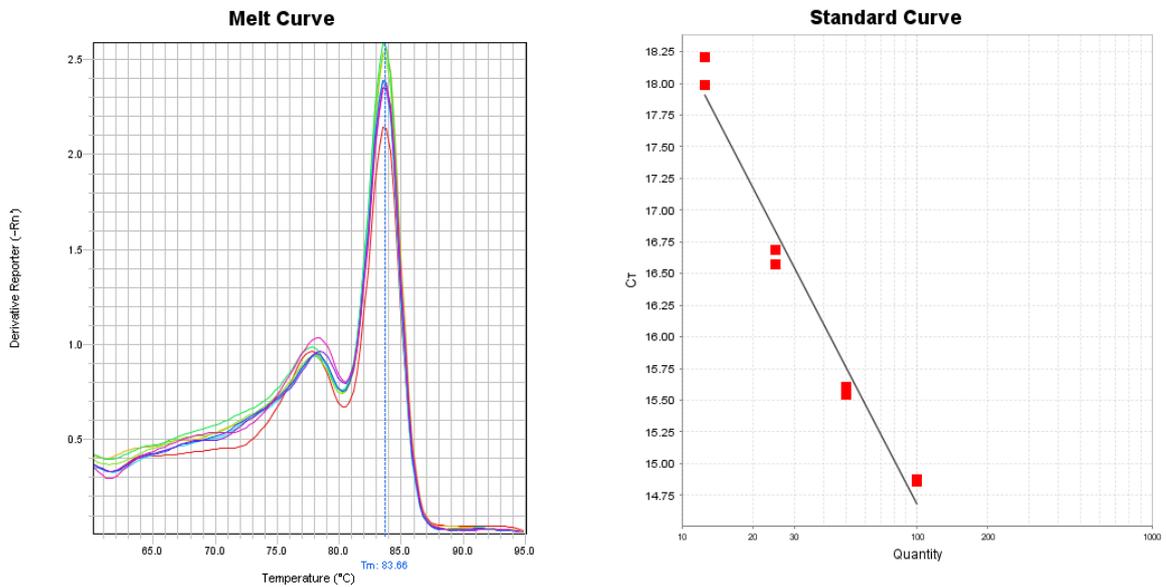
Figura 7 - *Melt curve* e *standard curve* demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes *NDRG2* (A), *SPA17* (B) e *STAR* (C) no tecido testicular



Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *NDRG2*: Membro 2 da família NDRG; *SPA17*: Proteína autoantigênica Sp 17; *STAR*: Proteína reguladora aguda esteroidogênica.

Figura 8 - *Melt curve* e *standard curve* demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios do gene *ACTB*



Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *ACTB*: Actina beta.

4.4.2. Padronização dos oligonucleotídeos dos genes de interesse *IGF1R*, *LEP*, *MSTN*, *MYOD1*, *MYOF5*, *RBI* e gene constitutivo *ACTB* no tecido muscular

Da mesma forma, para a padronização de genes de interesse no tecidos muscular as concentrações de oligonucleotídeos e cDNA utilizados nas reações de PCR foram testados em ensaios preliminares buscando uma melhor eficiência para as reações de quantificação por PCR em tempo real. Na tabela 5 estão contidas as concentrações de oligonucleotídeos, concentração de cDNA e a eficiência da reação obtida em cada padronização e utilizada nas análises de expressão.

Tabela 5 - Padronização da concentração de oligonucleotídeos (μM), concentração de cDNA (ng) e eficiência da reação (%) dos genes de interesse e constitutivos do tecido muscular

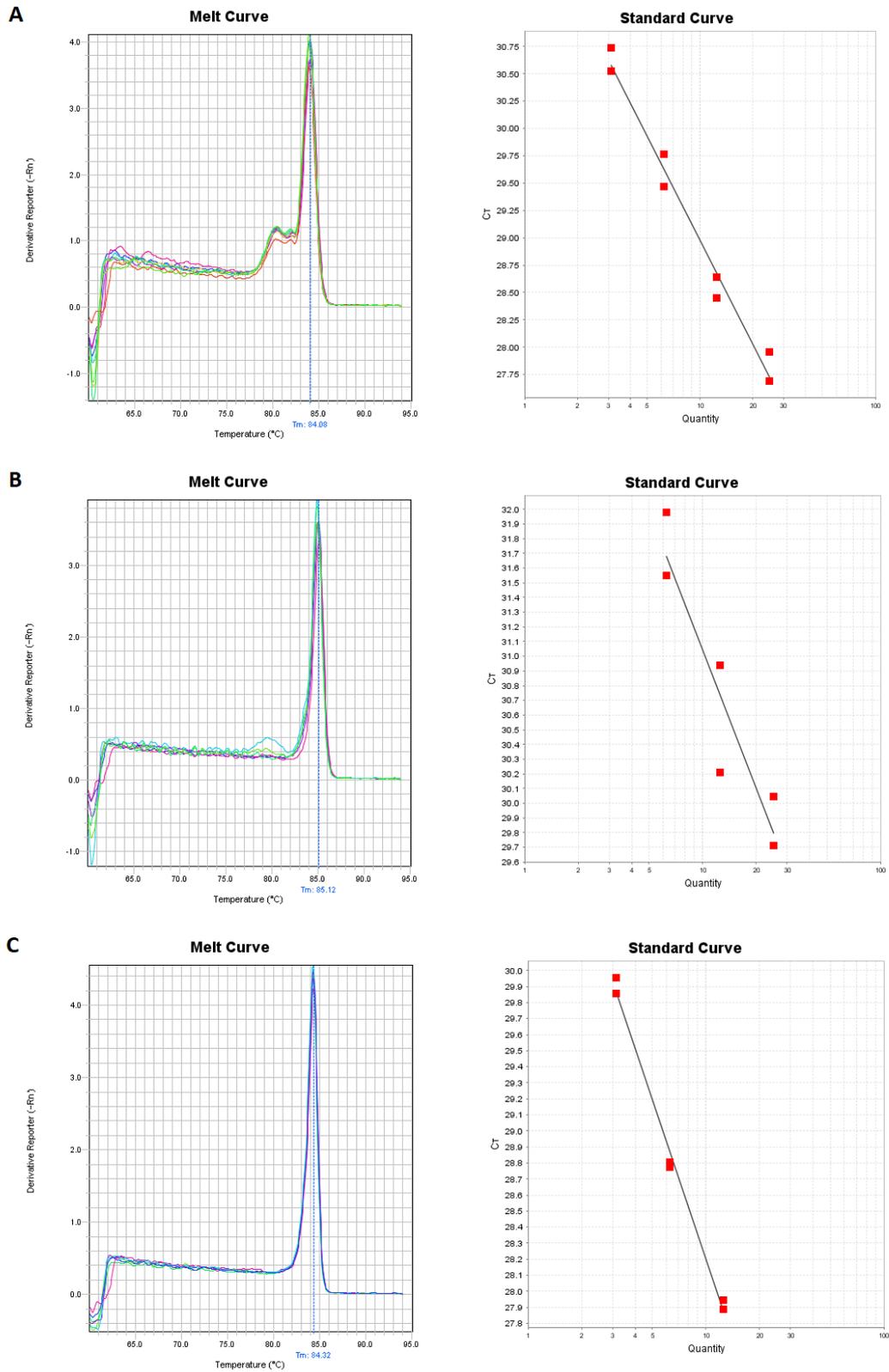
Gene	Concentração de <i>primers</i> (μM)	Concentração de cDNA (ng)	Eficiência da reação (%)
<i>IGF1R</i>	1	12,5	107,36
<i>LEP</i>	1	12,5	108,45
<i>MSTN</i>	1	6,25	100,75
<i>MYOD1</i>	1	12,5	106,68
<i>MYF5</i>	1	12,5	120,57
<i>RBI</i>	1	12,5	101,03
<i>ACTB</i>	0,5	12,5	93,34

Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *IGF1R*: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; *LEP*: Leptina; *MSTN*: Miostatina; *MYOD1*: Diferenciação miogênica 1; *MYF5*: Fator miogênico 5; *RBI*: Co repressor transcricional RB1; *ACTB*: Actina beta.

As *melt curves* que determinaram a especificidade das reações e as *standard curves* que determinaram a eficiência de cada oligonucleotídeo padronizado estão representadas nas Figuras 9, 10 e 11. Da mesma forma que no tecido testicular, em todos os ensaios do tecido muscular pode-se observar na *melt curve* apenas um *amplicon*, o que é reflexo da especificidade do primer utilizado.

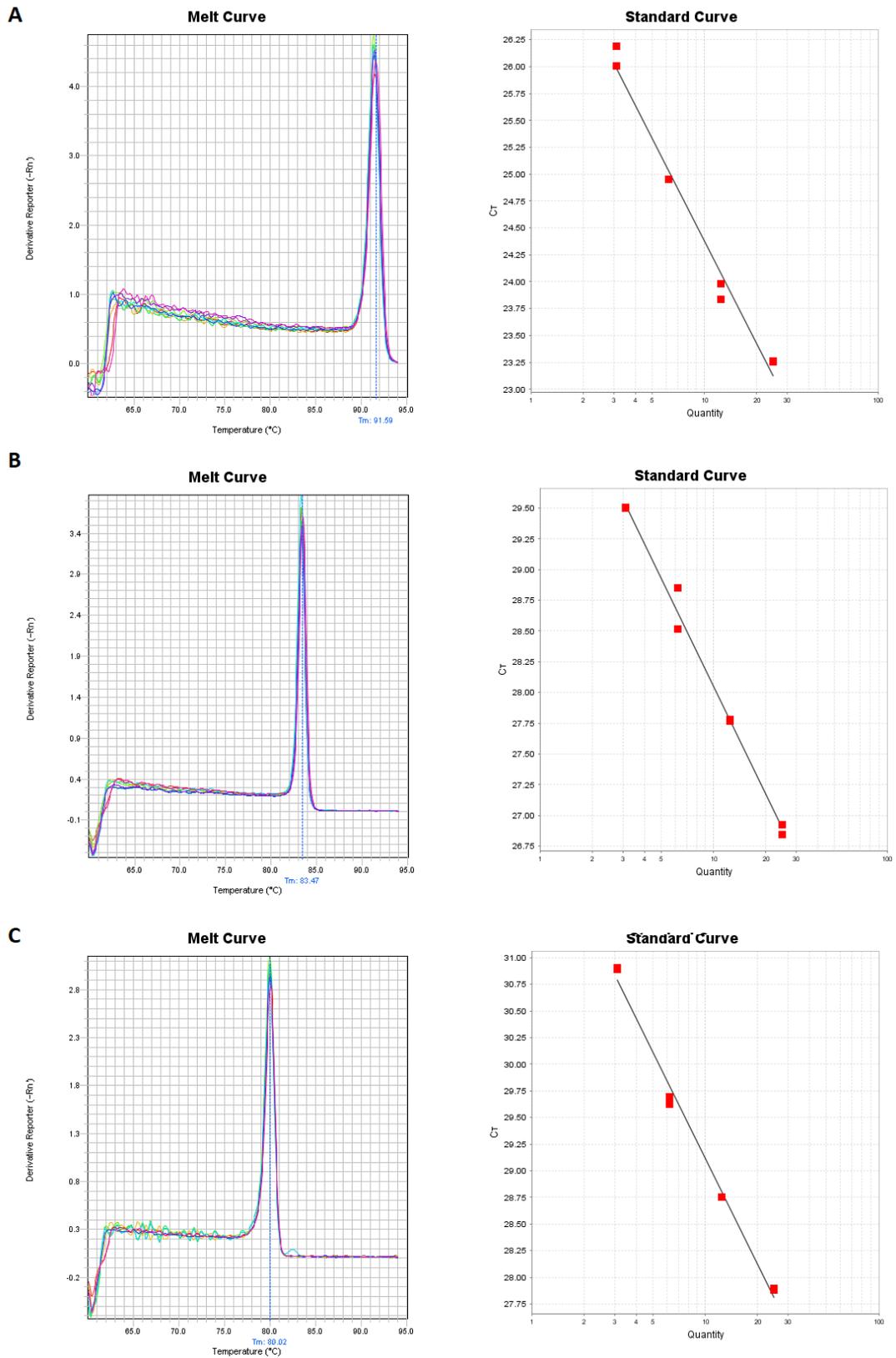
Figura 9 - *Melt curve* e *standard curve* demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes *IGFR1* (A), *LEP* (B) e *MSTN* (C) no tecido muscular



Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *IGFR1*: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; *LEP*: Leptina; *MSTN*: Miostatina beta.

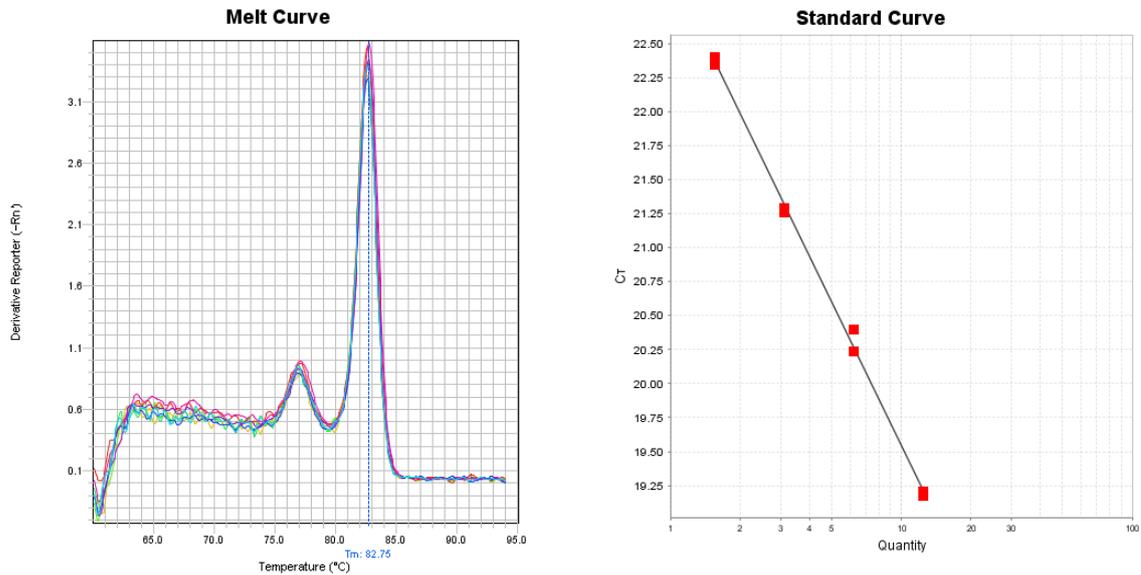
Figura 10 - *Melt curve* e *standard curve* demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes *MYOD1* (A), *MYOF5* (B) e *RBI* (C) no tecido muscular



Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *MYOD1*: Diferenciação mio gênica 1; *MYF5*: Fator mio gênico 5; *RBI*: Co repressor transcricional RB1.

Figura 11 - *Melt curve* e *standard curve* demonstrando a especificidade da reação e a eficiência de amplificação, respectivamente, para os ensaios dos genes *ACTB* no tecido muscular



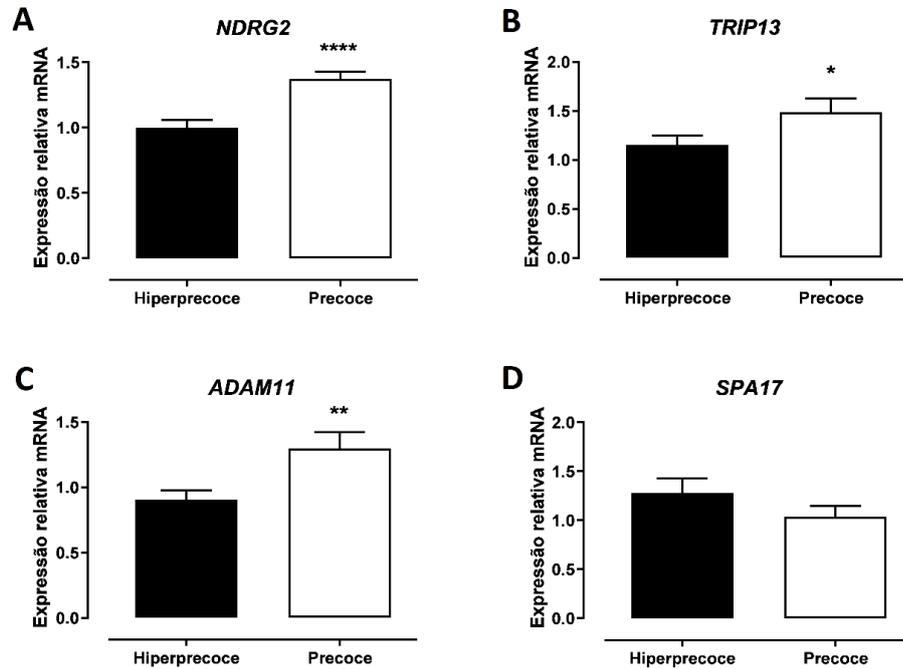
Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: *ACTB*: Actina beta.

4.4.3. Expressão relativa de genes que participam da regulação da espermatogênese, esteroidogênese e pré-puberdade em bovinos

A análise da expressão dos genes que participam da regulação da espermatogênese (*NDRG2*, *TRIP13*, *ADAM1*, *SPA17*, *CSNK2A1* e *CSNK2A2*) estão representadas nas Figuras 12 e 13. O grupo de animais precoces apresentou maior nível de expressão relativa dos transcritos de *NDRG2*, *TRIP13* e *ADAM1* quando comparado aos animais hiperprecoces. Já a expressão relativa dos transcritos de *SPA17*, *CSNK2A1* e *CSNK2A2* não apresentou diferenças entre os grupos.

Figura 12 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes *NDRG2* (A), *TRIP13* (B), *ADAM1* (C) e *SPA17* (D) no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoce e precoces

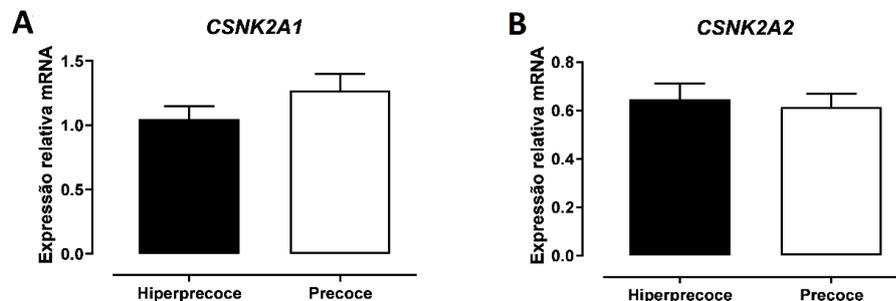


Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM. A *ACTB* foi empregada como gene constitutivo. * indica diferença entre os grupos com $p < 0,05$; ** indica diferença entre os grupos com $p < 0,01$; *** indica diferença entre os grupos com $p < 0,001$. (n=24/grupo).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. *NDRG2*: Membro 2 da família NDRG; *TRIP13*: Interator 13 do receptor de hormônio tireoidiano; *ADAM11*: Metalopeptidase domínio 11; *SPA17*: Proteína autoantigênica Sp 17; *ACTB*: Actina beta. EPM: erro padrão da média.

Figura 13 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes *CSNK2A1* (A), *CSNK2A2* (B), no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoce e precoces



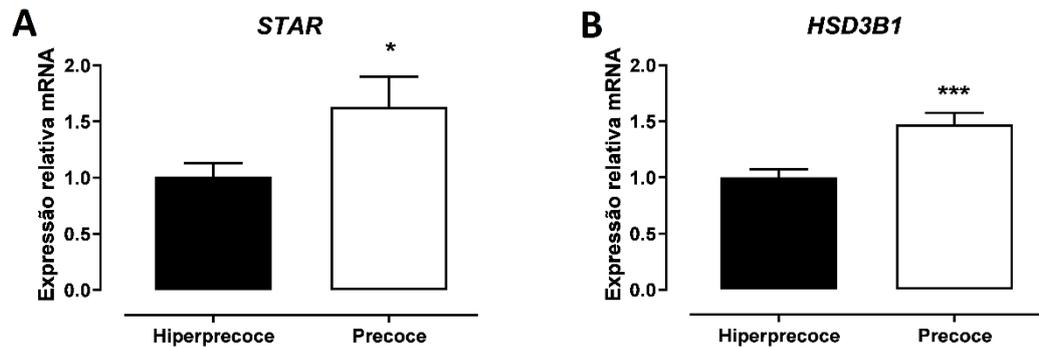
Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM. A *ACTB* foi empregada como gene constitutivo. (n=24/grupo).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. *CSNK2A1*: Caseína quinase 2 α 1; *CSNK2A2*: Caseína quinase 2 α 2; *ACTB*: Actina beta. EPM: erro padrão da média.

A análise da expressão dos genes que participam da regulação da esteroidogênese estão representadas na Figura 14. O grupo de animais precoces apresentou maior nível de expressão relativa dos transcritos de *STAR* e de *HSD3B1* quando comparado aos animais hiperprecoces.

Figura 14 – Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes *STAR* (A) e *HSD3B1* (B) no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces



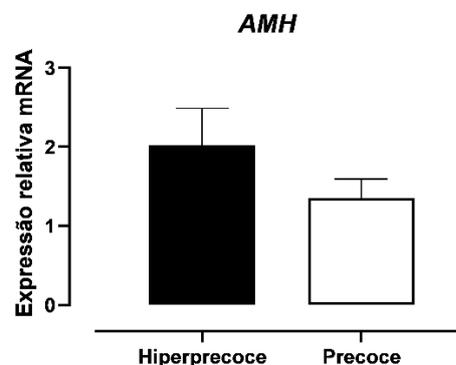
Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM. A *ACTB* foi empregada como gene constitutivo. * indica diferença entre os grupos com $p < 0,05$; *** indica diferença entre os grupos com $p < 0,001$. (n=24/grupo).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. *STAR*: Proteína reguladora aguda esteroidogênica; *HSD3B1*: Hidroxi- δ -5-esteróide desidrogenase, 3 β esteróide δ -isomerase I; *ACTB*: Actina beta. EPM: erro padrão da média.

A expressão relativa dos transcritos de *AMH*, relacionado com a pré-puberdade em bovinos, não apresentou diferença entre os grupos de animais hiperprecoce e precoce (Figura 15).

Figura 15 – Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos do gene *AMH* no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces



Fonte: Cavallin (2022).

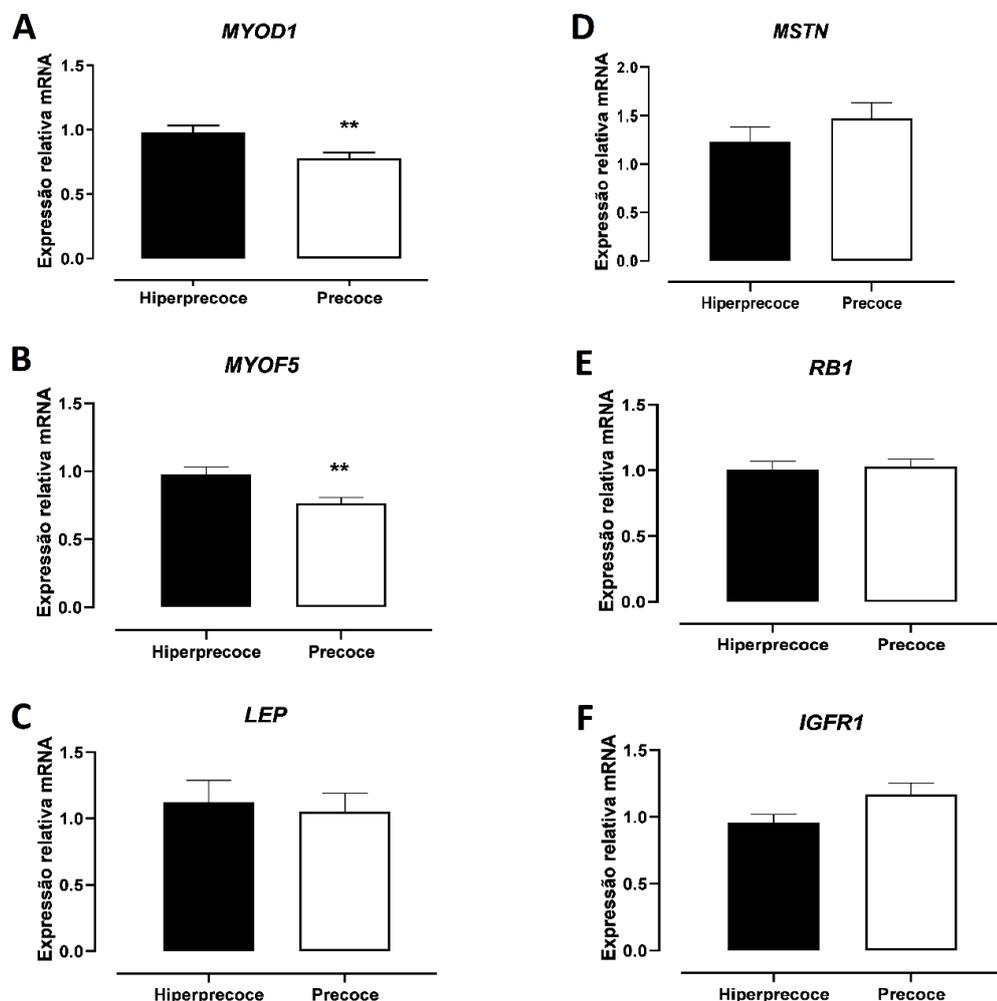
Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM. A *ACTB* foi empregada como gene constitutivo. (n=24/grupo).

Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade. *AMH*: Hormônio anti-mulleriano; *ACTB*: Actina beta. EPM: erro padrão da média.

4.4.4. Expressão relativa de genes que participam da regulação do desenvolvimento muscular

A análise da expressão dos genes que participam da regulação do desenvolvimento muscular (*MYOD1*, *MYF5*, *LEP*, *MSTN*, *RB1* e *IGFR1*) estão representadas na Figura 16. O grupo de animais precoces apresentou menor nível de expressão relativa dos transcritos de *MYOD1* e *MYF5* quando comparado aos animais hiperprecoces. Já a expressão relativa dos transcritos de *LEP*, *MSTN*, *RB1* e *IGFR1* ($p=0,07$) não apresentaram diferenças entre os grupos.

Figura 16 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos transcritos dos genes *MYOD1* (A), *MYF5* (B), *LEP* (C), *MSTN* (D), *RB1* (E) e *IGFR1* (F) no tecido muscular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces



Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a média \pm EPM. A *ACTB* foi empregada como gene constitutivo. ** indica diferença entre os grupos com $p < 0,01$. ($n=24$ /grupo).

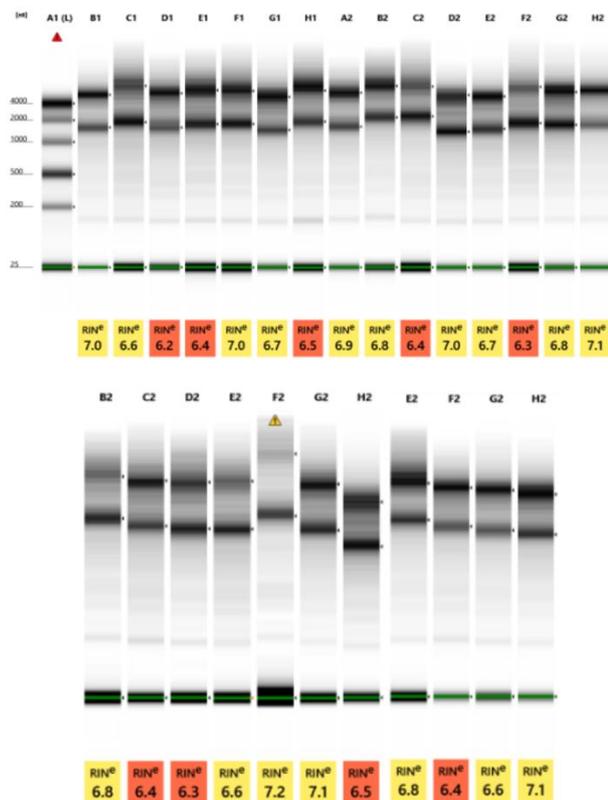
Legenda: Hiperprecocoe: até 13 meses de idade; Precocoe: acima de 17 meses de idade. *MYOD1*: Diferenciação mio gênica 1; *MYF5*: Fator mio gênico 5; *LEP*: Leptina; *MSTN*: Miostatina; *RB1*: Co repressor transcricional RB 1; *IGFR1*: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; *ACTB*: Actina beta; EPM: erro padrão da média.

4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

4.5.1. Controle de qualidade do RNA total

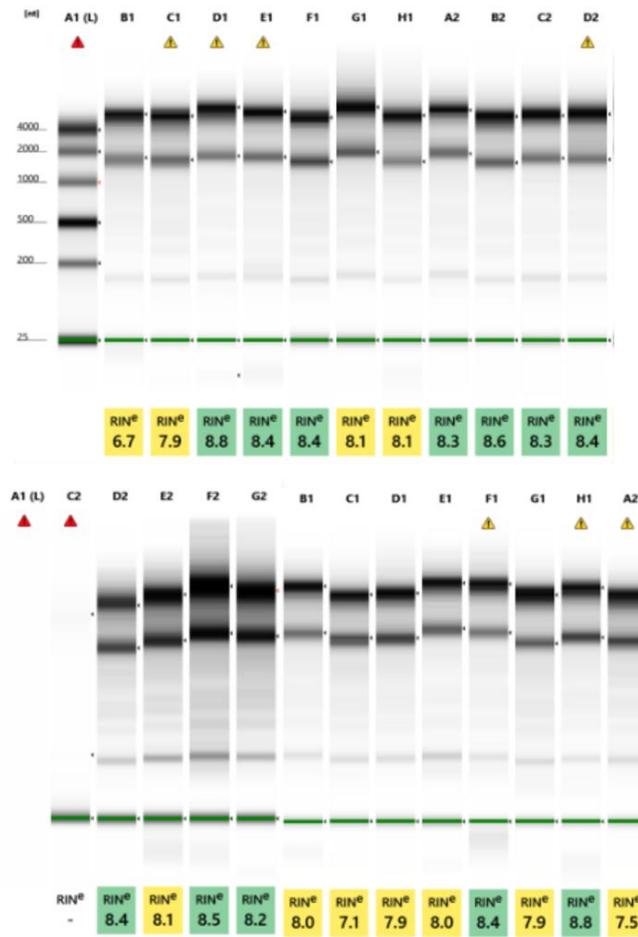
Através da eletroforese capilar observamos a integridade do RNA em todas as amostras evidenciando as duas bandas correspondentes às unidades ribossomais do RNA 18S e 28S, sendo a banda 28S com o dobro da intensidade em relação a 18S, e sem rastros significativos abaixo das bandas, indicando que não houve degradação e nem contaminação por DNA genômico tanto nas amostras do tecido muscular (Figura 17) quanto nas amostras do tecido testicular (Figura 18). A partir das análises obtidas o equipamento determinou o índice RIN (*RNA integrity number*), que varia de 1 a 10 na escala de qualidade. Para amostras de tecido muscular, devido a características de sua atividade, o valor de RIN igual ou superior a 6,5 foi considerado adequado e as amostras foram aprovadas para análises posteriores. Já para as amostras de tecido testicular, o valor de RIN igual ou superior a 7,0 foi utilizado. Portanto, para todas as amostras o valor de RIN atendeu os parâmetros de qualidade requeridos para o sequenciamento.

Figura 17 - Eletroforese capilar do RNA extraído do tecido muscular



Fonte: Cavallin (2022).

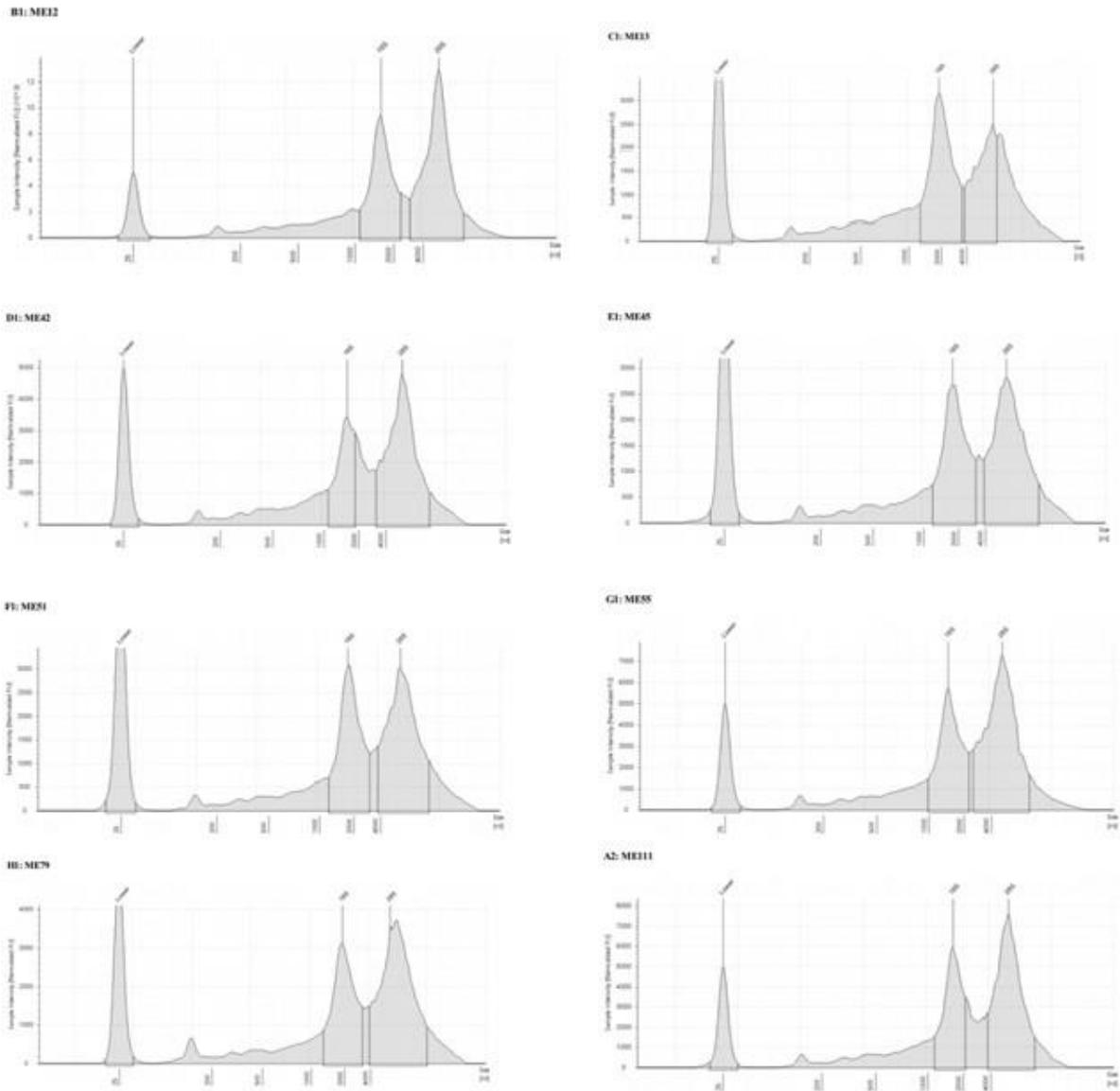
Figura 18 - Eletroforese capilar do RNA extraído do tecido testicular



Fonte: Cavallin (2022).

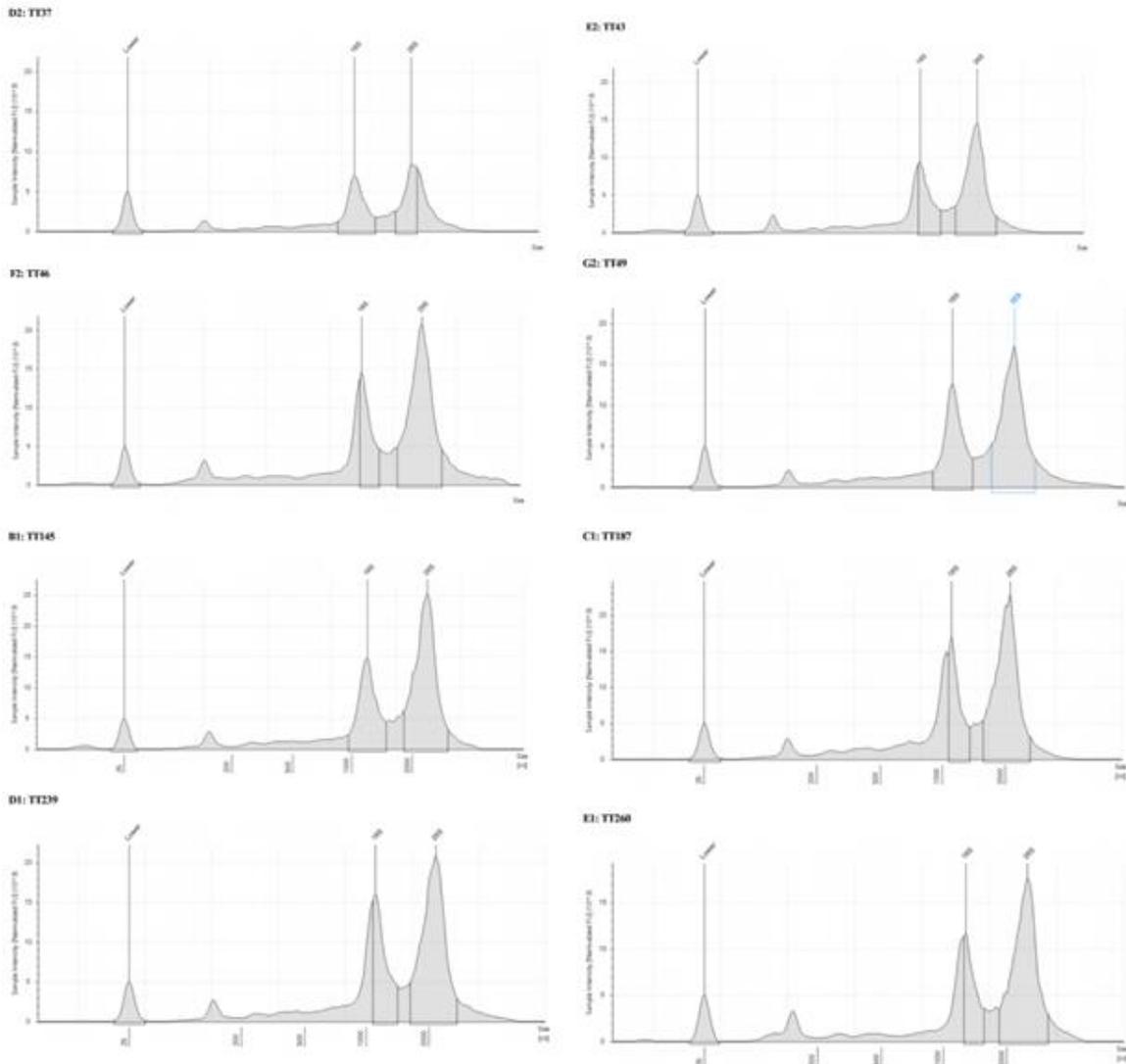
A análise resultou em um eletroferograma para cada amostra composto por dois picos bem definidos (bandas 18S e 28S) possibilitando também a detecção da integridade das amostras. Em caso de degradação, os picos do eletroferograma sofreriam uma diminuição no sinal da fluorescência e outros picos correspondentes à fragmentos degradados seriam detectados. Nas Figuras 19 e 20 podem ser observados os eletroferogramas da análise realizada no RNA extraído do tecido muscular e testicular, respectivamente.

Figura 19 - Eletroferogramas da análise do RNA extraído do tecido muscular



Fonte: Cavallin (2022).

Figura 20 - Eletroferogramas da análise do RNA extraído do tecido testicular



Fonte: Cavallin (2022).

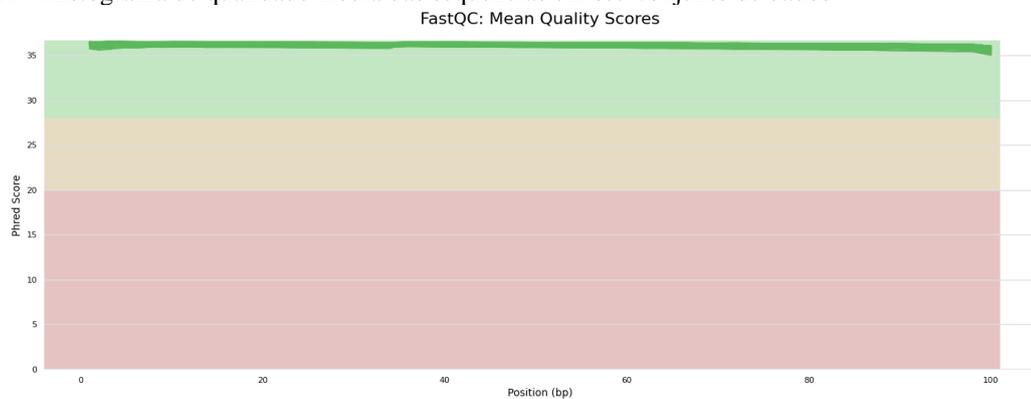
4.5.2. Controle de qualidade dos dados brutos das amostras

O controle de qualidade das sequências obtidas a partir das bibliotecas de cDNA foi realizado utilizando o programa FastQC (0.11.3) e MultiQC (v1.10). Essa etapa permitiu detectar possíveis problemas ou erros sistemáticos que potencialmente afetaram a reação de sequenciamento e que poderiam introduzir vieses nas etapas de interrogação das bases pelo sequenciador, produção das bibliotecas, designação de valores de qualidade às bases interrogadas e, finalmente, repercutindo em todas as etapas de processamento dos dados, culminando em erros na classificação das variantes e sua eventual interpretação errônea.

A qualidade da identificação das bases geradas foi avaliada pela pontuação de *Phred Score* (*Q score*), definido como uma propriedade que está logaritmicamente relacionada às probabilidades de erro na chamada de base. Para um *Phred Score* de 30 a uma base, as chances de que essa base seja chamada incorretamente são de 1 em 1000, com precisão de chamada de 99,9%. Para um *Phred Score* de 40, as chances de que essa base seja chamada incorretamente são de 1 em 10.000, com precisão de chamada de 99,99%.

O sequenciamento realizado gerou aproximadamente 3Tb de dados com um Q30 acima de 90%. O *Phred Score* atribuído para a qualidade média das sequências em seu conjunto de dados do sequenciamento das amostras pode ser visualizado na Figura 21.

Figura 21 - Histograma de qualidade média das sequências em seu conjunto de dados

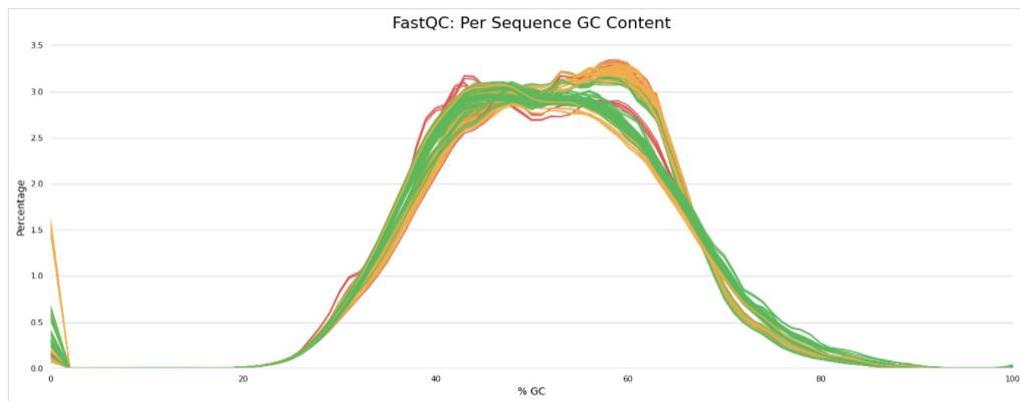


Fonte: Cavallin (2022).

Notas: O eixo y no gráfico mostra as pontuações de qualidade (*Phred Score*). Quanto maior a pontuação, melhor será a chamada de base. O plano de fundo do gráfico divide o eixo y em chamadas de qualidade muito boa (verde), razoável (laranja) e chamadas de baixa qualidade (vermelho).

Outra análise de qualidade importante se refere ao conteúdo de guanina-citosina por sequência (conteúdo GC). A análise mede o conteúdo do GC em toda a extensão de cada sequência em um arquivo e o compara com uma distribuição normal modelada do conteúdo do GC. Nessa análise espera-se uma distribuição aproximadamente normal do conteúdo de GC em que o pico central corresponde ao conteúdo geral de GC do genoma subjacente. Uma distribuição de formato incomum pode indicar uma biblioteca contaminada ou algum outro tipo de subconjunto tendencioso. Na Figura 22, observamos uma distribuição normal do conteúdo de GC dos dados gerados no qual o pico central corresponde ao conteúdo geral de GC do genoma subjacente. Nenhuma contaminação com adaptadores (> 0,1%) foi encontrada nas amostras sequenciadas. As sequências obtidas pelo sequenciamento apresentaram elevado padrão qualidade evidenciando a robustez da técnica de RNA-Seq e a confiabilidade dos dados obtidos.

Figura 22 - Conteúdo GC por sequência das amostras sequenciadas



Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: GC: guanina-citosina

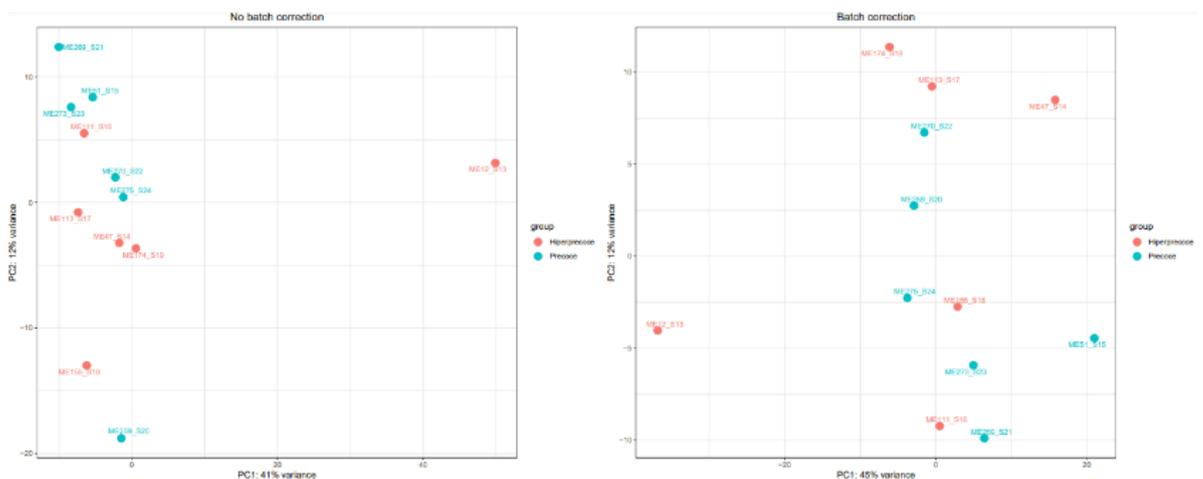
4.5.3. Identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs)

4.5.3.1. Tecido muscular

O sequenciamento do transcriptoma do tecido muscular por RNA-seq identificou 19.581 genes. A análise dos componentes principais das contagens de transcritos no tecido muscular foi realizada para as 24 amostras analisadas por RNA-Seq.

Para o tecido muscular, PC1 no eixo X captura a maior variação e é responsável por 45% da variância total em torno dos PCs, enquanto PC2 no eixo Y captura a segunda maior variação e é responsável por 12% da variação total em torno dos PCs (Figura 23).

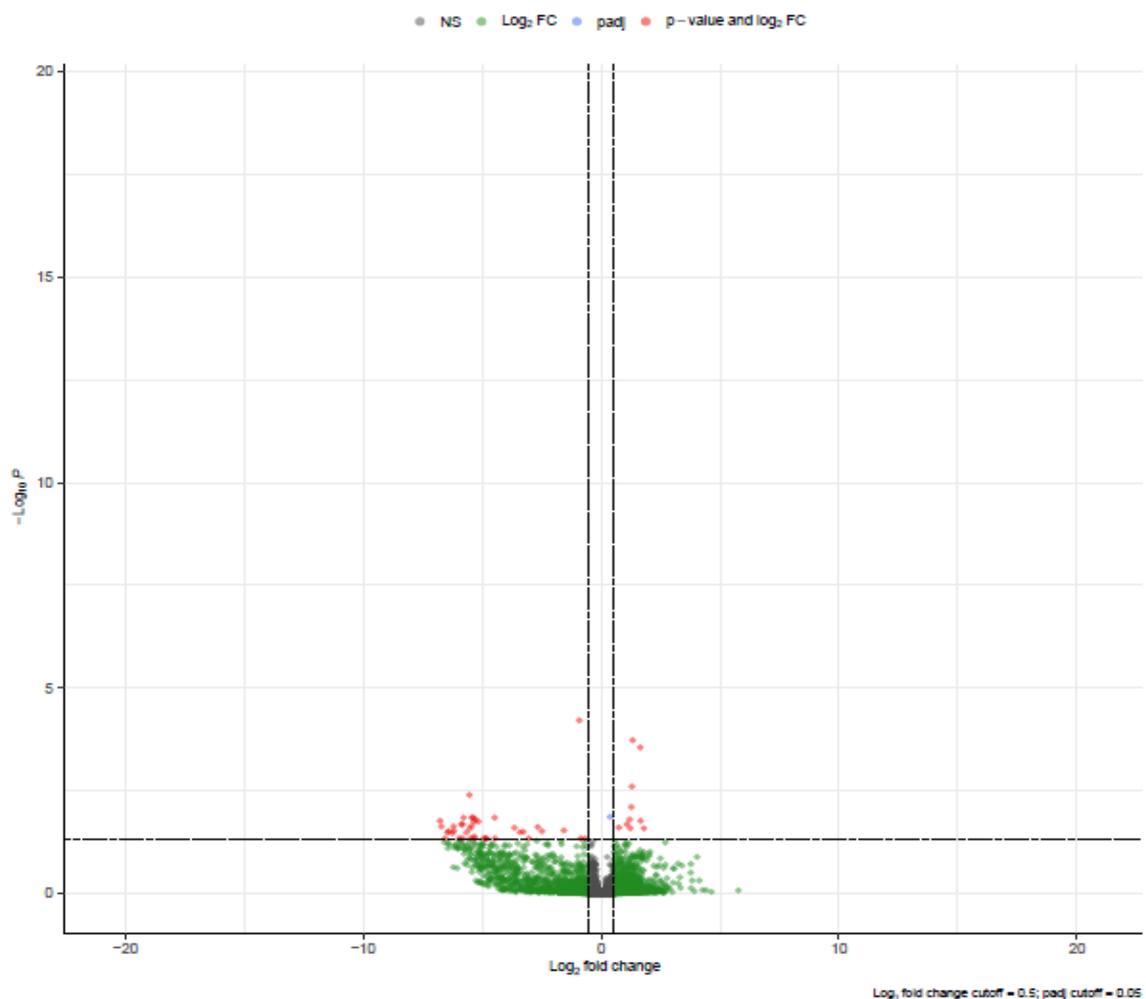
Figura 23 - Análise de componentes principais das contagens de transcritos identificados no tecido muscular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces. Sem efeito fixo e com efeito fixo (fazenda)



Fonte: Cavallin (2022).

No tecido muscular, foram identificados 50 genes diferencialmente expressos entre os grupos hiperprecoce e precoce. Desses, 40 genes apresentaram-se *down-regulated* e 10 genes *up-regulated* no grupo de animais hiperprecoces em relação ao grupo de animais precoces (Figura 24).

Figura 24 - Volcano plot da distribuição de genes que diferem significativamente entre animais hiperprecoces e precoces no tecido muscular



Fonte: Cavallin (2022).

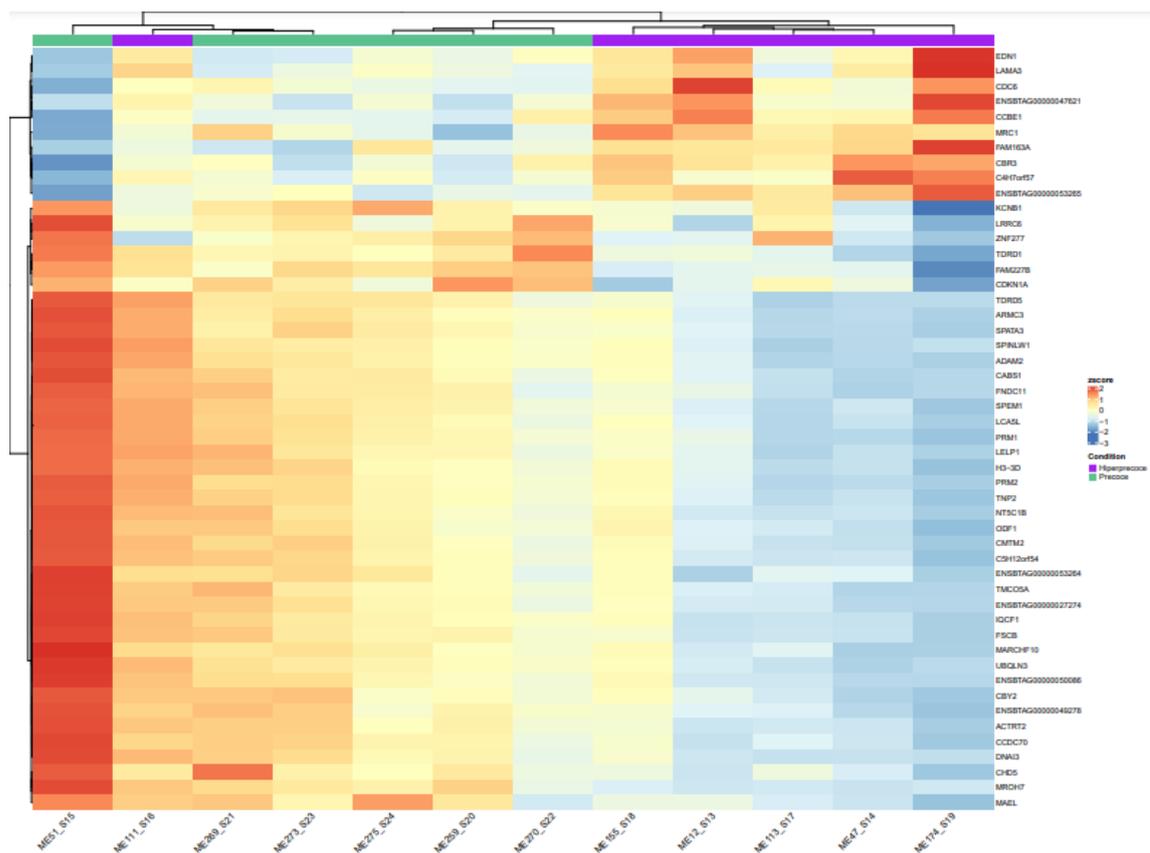
Notas: Os pontos vermelhos representam genes diferencialmente expressos com $\log_2\text{FoldChange} > 0,5$ (positivo e negativo) e p valor ajustado $< 0,05$.

A análise dos dados de sequenciamento possibilitou a visualização do comportamento global dos genes diferencialmente expressos em cada grupo. Os dados normalizados ($\log_2\text{FoldChange}$) foram usados para realização da categorização das amostras, conhecida como análise de *Heatmap*. Ela se refere a matrizes de valores representados graficamente que têm como objetivo agrupar as amostras sequenciadas de acordo com um conjunto de padrões de similaridade baseados na quantidade de genes que foram regulados positivamente (*up-*

regulated) e negativamente (*down-regulated*) e aqueles que não sofreram alteração em cada amostra. Essas representações evidenciam aquelas amostras que apresentaram um comportamento mais homogêneo entre si e aquelas que mostraram um comportamento mais heterogêneo em termos de expressão gênica.

Conforme observado na Figura 25, o resultado obtido no tecido muscular mostra a separação dos transcriptomas em dois grupos distintos, os quais correspondem exatamente aos dois grupos de estudo. Entretanto, é possível observar uma discrepância na qual uma das réplicas biológicas do grupo hiperprecoce se agrupa com o transcriptoma do grupo precoce. Apesar da discrepância apontada, os dados obtidos são suficientemente robustos para as análises subsequentes.

Figura 25 - Heatmap: Comportamento global dos genes diferencialmente expressos das amostras dos grupos precoce e hiperprecoce no tecido muscular



Fonte: Cavallin (2022).

Nota: As colunas representam as amostras indicadas. As linhas representam cada gene analisado. O dendrograma no topo da figura mostra o agrupamento dos transcriptomas. O gráfico no lado direito da figura representa a gradação de cores baseando-se nos valores de $\log_2\text{FoldChange}$ sendo que na escala quanto mais próximo do vermelho maior a expressão (genes *up-regulated*) e, quanto mais próximo do azul, menor a expressão (genes *down-regulated*).

A identificação dos genes *up e down-regulated* identificados no tecido muscular, nomes dos genes, médias das contagens normalizadas, valores de log2FoldChange, valores de p e p ajustado são apresentadas nas Tabelas 6 e 7. Os genes com log2FoldChange positivos representam os genes mais expressos no grupo de animais hiperprecoces em relação aos animais do grupo precoce (*up-regulated*), já os genes com log2FoldChange negativos representam os genes menos expressos no grupo de animais hiperprecoces em relação ao grupo precoce (*down-regulated*).

Tabela 6 - Genes *up-regulated* no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido muscular

Ensembl Gene ID¹	Gene²	baseMean³	Log2FC⁴	P⁵	P – ajust⁶
ENSBTAG00000047621	Novel gene	986.478957	1.329331	1.90E-08	0.000186
ENSBTAG00000053265	Novel gene	224.723744	1.64783	4.26E-08	0.000278
ENSBTAG00000018688	<i>CBR3</i>	683.148861	1.296983	5.09E-07	0.002491
ENSBTAG00000027181	<i>LAMA3</i>	1136.8194	1.278611	2.42E-06	0.007912
ENSBTAG00000008723	<i>CCBE1</i>	66.1383336	1.201843	1.04E-05	0.015721
ENSBTAG00000049599	<i>FAM163A</i>	95.8418393	1.66642	1.30E-05	0.017098
ENSBTAG00000035064	<i>C4H7orf57</i>	192.301791	1.087959	2.00E-05	0.020626
ENSBTAG00000008096	<i>EDN1</i>	305.781296	0.745088	3.16E-05	0.024779
ENSBTAG00000038048	<i>MRC1</i>	1832.31296	1.223434	3.56E-05	0.025833
ENSBTAG00000010384	<i>CDC6</i>	39.8886877	1.804268	3.77E-05	0.026126

Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: ¹Identificação do gene; ²Nome do gene; ³Média das contagens normalizadas; ⁴log2FoldChange; ⁵Valor de P: significância estatística da diferença entre os grupos; ⁶Valor de P ajustado.

Tabela 7 - Genes *down-regulated* no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido muscular

Ensembl Gene ID¹	Gene²	baseMean³	Log2FC⁴	P⁵	P – ajust⁶
ENSBTAG00000008353	<i>CDKN1A</i>	8778.13728	-0.91339	3.13E-09	6.13E-05
ENSBTAG00000044141	<i>MROH7</i>	34.7705661	-5.52711	1.02E-06	0.004006
ENSBTAG00000027274	Novel gene	42.9531759	-4.46497	7.48E-06	0.014312

(continua)

(continuação)

Ensembl Gene ID¹	Gene²	baseMean³	Log2FC⁴	P⁵	P –ajust⁶
ENSBTAG00000027162	<i>TMCO5A</i>	28.1563545	-5.3747	8.04E-06	0.014312
ENSBTAG00000003445	<i>ODF1</i>	54.7982759	-5.4225	7.02E-06	0.014312
ENSBTAG00000019863	<i>CCDC70</i>	15.667194	-5.77888	6.59E-06	0.014312
ENSBTAG00000030993	<i>LCA5L</i>	63.6242284	-5.2734	1.04E-05	0.015721
ENSBTAG00000032576	<i>CMTM2</i>	37.0680677	-6.76812	1.31E-05	0.017098
ENSBTAG00000019849	<i>CABS1</i>	28.3549029	-5.1552	1.53E-05	0.017843
ENSBTAG00000025266	<i>UBQLN3</i>	27.8405401	-5.33589	1.55E-05	0.017843
ENSBTAG00000049278	Novel gene	12.4049907	-5.86757	1.99E-05	0.020626
ENSBTAG00000005270	<i>NT5C1B</i>	33.7585017	-5.81972	2.14E-05	0.020977
ENSBTAG00000018580	<i>CBY2</i>	34.2666279	-5.43349	2.44E-05	0.022727
ENSBTAG00000030718	<i>SPATA3</i>	22.6301481	-6.20627	2.74E-05	0.023349
ENSBTAG00000017929	<i>ACTRT2</i>	12.3190472	-6.70641	2.73E-05	0.023349
ENSBTAG000000053150	<i>FAM227B</i>	12.5397359	-2.66085	2.95E-05	0.024105
ENSBTAG00000004637	<i>MARCHF10</i>	33.9676695	-3.63695	3.36E-05	0.025282
ENSBTAG000000032884	<i>TNP2</i>	94.9559838	-5.51865	3.87E-05	0.026126
ENSBTAG000000040477	<i>CHD5</i>	89.2903128	-1.55794	4.48E-05	0.029215
ENSBTAG00000002407	<i>TDRD5</i>	20.8594609	-6.17749	4.74E-05	0.029928
ENSBTAG00000010548	<i>LRRC6</i>	16.1140771	-2.48182	5.13E-05	0.030469
ENSBTAG00000020929	<i>ARMC3</i>	22.7148099	-6.40256	5.13E-05	0.030469
ENSBTAG00000020253	<i>SPEM1</i>	28.7335667	-3.26229	5.46E-05	0.031451
ENSBTAG00000006855	<i>TDRD1</i>	19.4538461	-3.40934	5.80E-05	0.032436
ENSBTAG00000016996	<i>C5H12orf54</i>	22.2737059	-5.66006	6.20E-05	0.032832
ENSBTAG000000031934	<i>FSCB</i>	10.9958994	-6.45027	6.06E-05	0.032832
ENSBTAG000000032995	<i>LELP1</i>	25.6268873	-6.25321	6.62E-05	0.034131

(continua)

(continuação)

Ensembl Gene ID ¹	Gene ²	baseMean ³	Log2FC ⁴	P ⁵	P –ajust ⁶
ENSBTAG00000021493	<i>PRM1</i>	361.401074	-5.32477	8.24E-05	0.041356
ENSBTAG00000016550	<i>MAEL</i>	41.1910848	-3.03423	9.32E-05	0.045623
ENSBTAG00000013050	<i>ZNF277</i>	2447.39792	-0.86052	0.000115	0.045765
ENSBTAG00000050086	Novel gene	29.4143003	-4.46129	0.000104	0.045765
ENSBTAG00000013778	<i>DNAI3</i>	16.4231175	-4.78716	0.000114	0.045765
ENSBTAG00000011508	<i>H3-3D</i>	42.6364054	-4.90839	0.000111	0.045765
ENSBTAG00000032880	<i>PRM2</i>	40.819258	-5.33175	0.00011	0.045765
ENSBTAG00000053264	Novel gene	11.7014699	-5.48876	9.78E-05	0.045765
ENSBTAG00000001495	<i>SPINLW1</i>	17.0080032	-5.82302	9.92E-05	0.045765
ENSBTAG00000009408	<i>ADAM2</i>	27.835763	-5.95926	0.000114	0.045765
ENSBTAG00000000805	<i>IQCF1</i>	14.0510201	6.56132	0.000108	0.045765
ENSBTAG00000027405	<i>FNDCl1</i>	21.1948184	-4.86585	0.000117	0.045776
ENSBTAG00000027320	<i>KCNBI</i>	6889.71502	-0.68042	0.00012	0.046153

Fonte: Cavallin (2022).

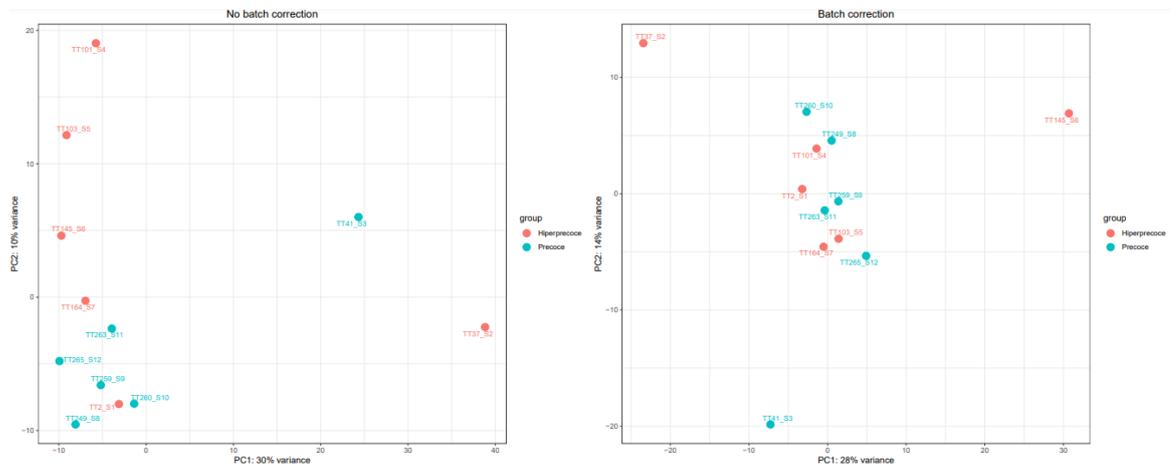
Legenda: ¹Identificação do gene; ²Nome do gene; ³Média das contagens normalizadas; ⁴log2FoldChange; ⁵Valor de P: significância estatística da diferença entre os grupos; ⁶Valor de P ajustado

4.5.3.2. Tecido testicular

O sequenciamento do transcriptoma do tecido testicular por RNA-seq identificou 25.710 genes. A análise dos componentes principais das contagens de transcritos no tecido muscular foi realizada para as 24 amostras analisadas por RNA-Seq.

Para o tecido testicular, PC1 no eixo X captura a maior variação e é responsável e é responsável por 28% da variância total em torno dos PCs, enquanto PC2 no eixo Y captura a segunda maior variação e é responsável por 14% da variação total em torno dos PCs (Figura 26).

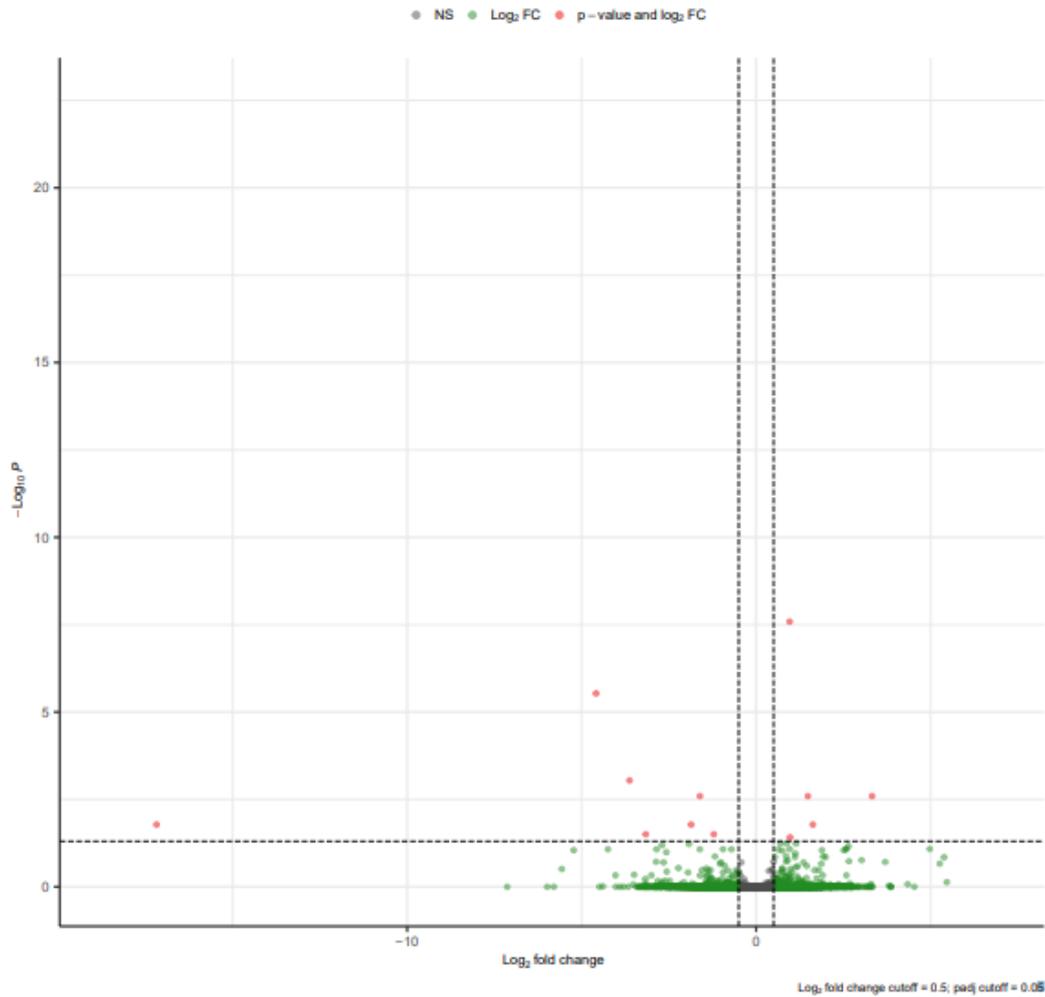
Figura 26 - Análise de componentes principais das contagens de transcritos identificados no tecido testicular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoce e precoces. Sem efeito fixo e com efeito fixo (fazenda)



Fonte: Cavallin (2022).

No tecido testicular, foram identificados 12 genes diferencialmente expressos entre os grupos hiperprecoce e precoce (Figura 27). Desses, 7 genes apresentaram-se *down-regulated* e 5 genes *up-regulated* no grupo de animais hiperprecoces em relação ao grupo de animais precoces.

Figura 27 - Volcano plot da distribuição de genes que diferem significativamente entre animais hiperprecoces e precoces no tecido testicular

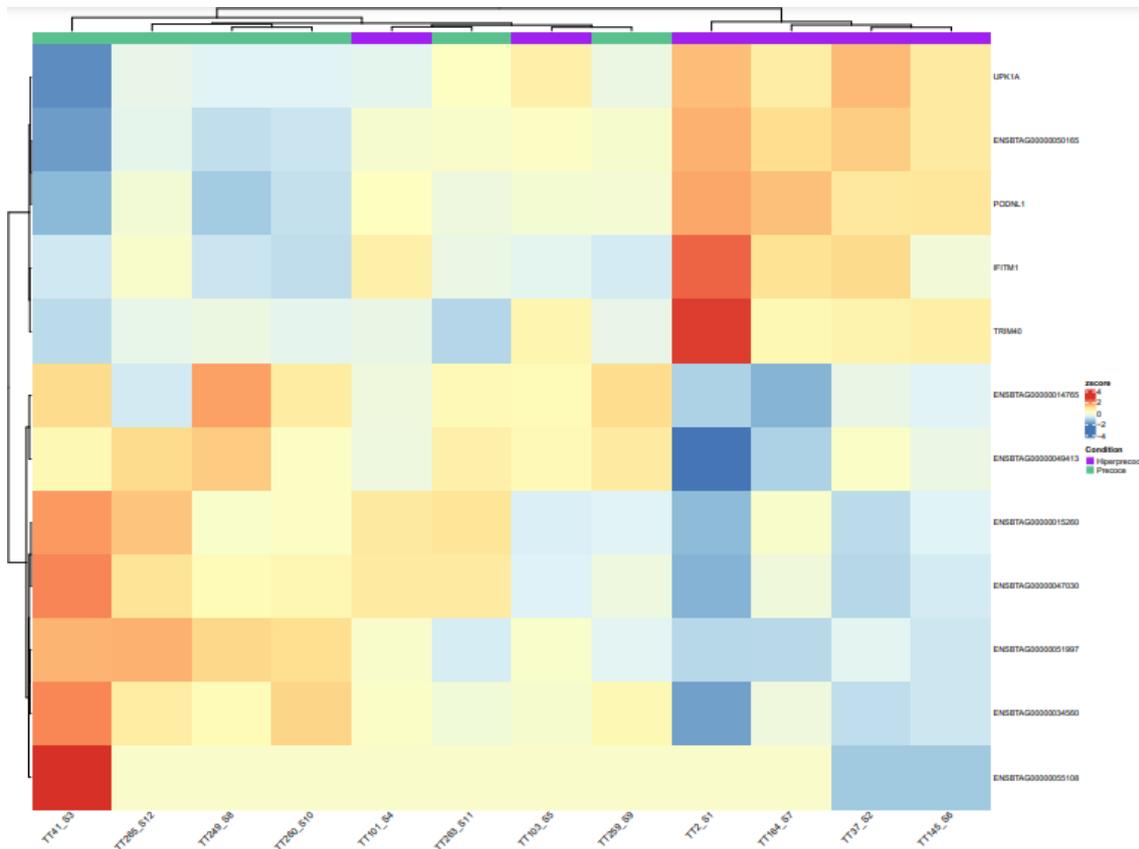


Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os pontos vermelhos representam genes diferencialmente expressos com $\log_2\text{FoldChange} > 0,5$ (positivo e negativo) e p valor ajustado $< 0,05$.

A análise de *heatmaps* no tecido testicular evidencia a separação dos transcriptomas em dois grupos distintos, correspondentes aos dois grupos de estudo. Entretanto, é possível observar discrepâncias na qual duas das réplicas biológicas do grupo hiperprecoces se agrupam com o transcriptoma do grupo precoce. Apesar das discrepâncias apontadas, os dados obtidos são suficientemente robustos para as análises subsequentes (Figura 28).

Figura 28 - Heatmap: Comportamento global dos genes diferencialmente expressos das amostras dos grupos precoce e hiperprecoce no tecido testicular



Fonte: Cavallin (2022).

Nota: As colunas representam as amostras indicadas. As linhas representam cada gene analisado. O dendrograma no topo da figura mostra o agrupamento dos transcriptomas. O gráfico no lado direito da figura representa a gradação de cores baseando-se nos valores de $\log_2\text{FoldChange}$ sendo que na escala quanto mais próximo do vermelho maior a expressão (genes *up-regulated*) e, quanto mais próximo do azul, menor a expressão (genes *down-regulated*).

A identificação dos genes *up e down-regulated* identificados no tecido testicular, nomes dos genes, médias das contagens normalizadas, valores de $\log_2\text{FoldChange}$, valores de p e p ajustado são apresentadas nas Tabelas 8 e 9. Os genes com $\log_2\text{FoldChange}$ positivos representam os genes mais expressos no grupo de animais hiperprecoces em comparação com os animais do grupo precoce (*up-regulated*), já os genes com $\log_2\text{FoldChange}$ negativos representam os genes menos expressos no grupo de animais hiperprecoces em comparação com os precoces (*down-regulated*).

Tabela 8 - Genes *up-regulated* no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido testicular

Ensembl Gene ID ¹	Gene ²	baseMean ³	Log2FC ⁴	P ⁵	P-adj ⁶	Ortholog ⁷ s ⁷	Species ⁷
ENSBTAG00000006073	<i>PODNL1</i>	703.1215	-0.958806	1.01E-12	2.59E-08		
ENSBTAG000000050165	Novel gene	14.55496	3.321052	5.39E-07	0.002543	Ig-like domain-containing protein	Pteropus sp
ENSBTAG000000020543	<i>UPK1A</i>	765.9249	1.481256	5.94E-07	0.002543		
ENSBTAG000000037381	<i>TRIM40</i>	54.90431	1.625448	4.75E-06	0.01661		
ENSBTAG000000048470	<i>IFITM1</i>	2306.813	0.974851	1.80E-05	0.038471		

Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: ¹Identificação do gene; ²Nome do gene; ³Média das contagens normalizadas; ⁴log2FoldChange; ⁵Valor de P: significância estatística da diferença entre os grupos; ⁶Valor de P ajustado; ⁷Ortólogos identificados por homologia

Tabela 9 - Genes *down-regulated* no grupo hiperprecoce em relação ao grupo precoce expressos no tecido testicular

Ensembl Gene ID ¹	Gene ²	base Mean ³	Log2FC ⁴	P ⁵	P-adj ⁶	Ortholog ⁷ s ⁷	Species ⁷
ENSBTAG000000047030	<i>G3N2E2</i>	298.0083	-4.58461	2.28E-10	2.93E-06		
ENSBTAG000000051997	LncRNA Novel gene	141.0384	-3.6261	1.06E-07	0.000909	WAP	
ENSBTAG000000034560	Novel gene	500.2348	-1.61182	4.13E-07	0.002543	PLEKHB2	Bos grunniens
ENSBTAG000000014765	Novel gene	103.5346	-1.86116	5.32E-06	0.01661	PRKRIP1	Capra hircus hircus
ENSBTAG000000055108	miRNA (Novel gene)	0.370515	-17.1773	5.81E-06	0.01661	ZNF	
ENSBTAG000000049413	LncRNA (novel gene)	432.2897	-1.2118	1.33E-05	0.031398	GSK3B	
ENSBTAG000000015260	<i>F1MUF2</i>	117.2676	-3.16282	1.34E-05	0.031398		

Fonte: Cavallin (2022).

Legenda: ¹Identificação do gene; ²Nome do gene; ³Média das contagens normalizadas; ⁴log2FoldChange; ⁵Valor de P: significância estatística da diferença entre os grupos; ⁶Valor de P ajustado; ⁷Ortólogos identificados por homologia

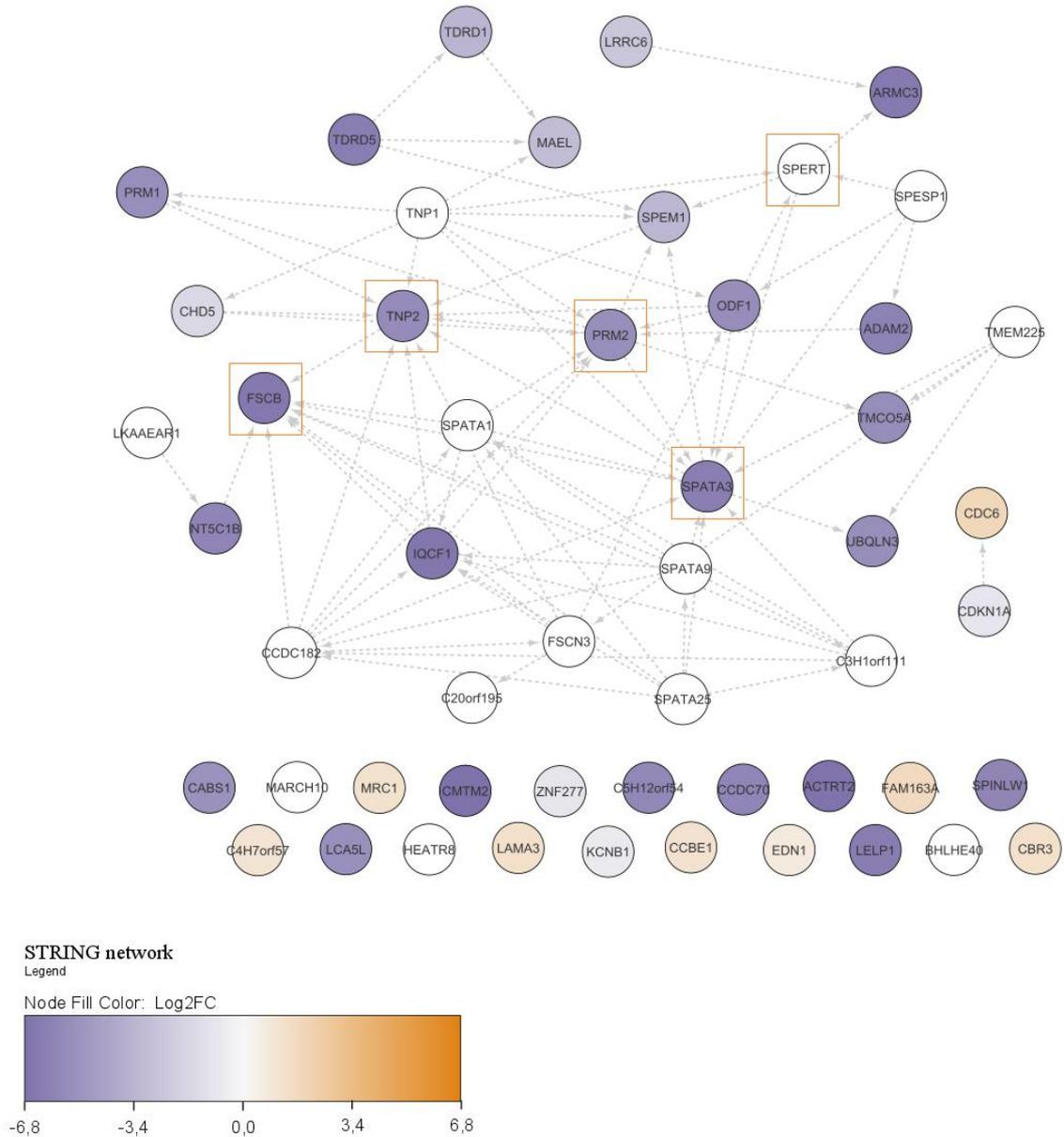
4.5.4. Formação de redes de interação (PPI)

Para a identificação da interação entre proteínas (PPI) dos DEGs foram criadas redes de interação utilizando o software STRING v11.5. Por meio do software Cytoscape v3.8.2, foram visualizadas as interações dos 50 DEGS no tecido muscular, no entanto por haver apenas 12 DEGs no tecido testicular não foi possível criar rede PPI.

No tecido muscular, observamos uma rede composta por 52 nós e 84 arestas, em que cada nó representa uma proteína e cada aresta a interação entre elas (Figura 29). O valor de $\log_2\text{FoldChange}$ foi utilizado como filtro para visualização das comunidades representadas na rede como as cores dos nós, sendo que quanto mais intenso os tons de roxo menor o valor de $\log_2\text{FoldChange}$ e quanto mais intenso os tons de laranja maior o valor de $\log_2\text{FoldChange}$, por sua vez a ausência de cor representa as proteínas preditas. Nem todas as proteínas identificadas e quantificadas foram representadas nas redes devido à ausência de interação entre elas. Também são observadas proteínas com valores para $\log_2\text{FoldChange}$, porém que não interagem entre si e nem com a rede central.

Com auxílio do aplicativo CyChart do software Cytoscape, foi possível identificar as 5 proteínas centrais da rede PPI no tecido muscular. Considerando o *degree* e o *betweenness centrality*, as proteínas *hubs* identificadas foram *SPERT* (*spermatid associated*), *TNP* (*transition protein 1*), *PRM2* (*protamine 2*), *SPATA3* (*spermatogenesis associated 3*) e *FSCB* (*fibrous sheath CABYR binding protein*), se apresentando como os nós centrais da rede. Destas, as proteínas *TNP1* e *SPERT* se apresentaram como *bottlenecks* porém são proteínas preditas. As proteínas *hubs* e *bottlenecks* estão demarcadas dentro de um quadrado vermelho.

Figura 29 - Rede de interação entre proteínas dos DEGs identificados no tecido muscular



Fonte: Cavallin (2022).

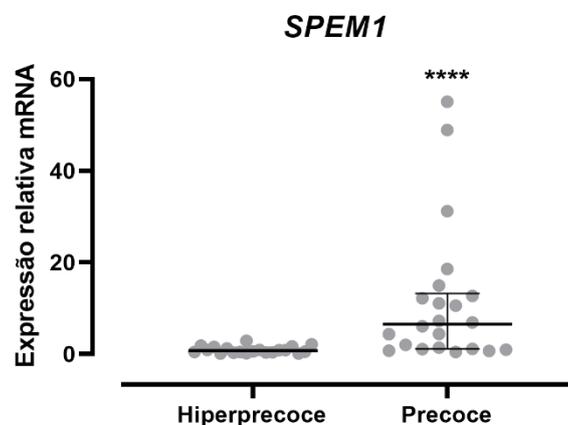
Nota: Os nós representam as proteínas produto dos genes expressos diferencialmente expressos e as linhas representam a interação entre os nós. Tons de roxo: menor o valor de $\log_2\text{ColdChange}$ (*up-regulated*). Tons de laranja: maior o valor de $\log_2\text{FoldChange}$ (*down-regulated*). Nós em branco: proteínas preditas. Nós demarcados em vermelho: proteínas *hubs* e *bottlenecks*.

4.5.5. Avaliação do gene *SPEM1* no tecido muscular por RT-qPCR

A expressão do gene *SPEM1* (Maturação de espermátides 1; NM_001079586.2) foi avaliada por RT-qPCR no tecido muscular dos animais selecionados para o RNA-Seq e também

numa amostragem mais ampla com 23 animais por grupo de tratamento. As concentrações dos oligonucleotídeos (senso: CAACATGGTGACGCTGCTCT e antisenso: CATGGTGCATCGTAGGTGGA) e cDNA utilizadas nas reações de foram padronizadas em ensaios preliminares, como previamente descrito no item 4.4.2. Observa-se na Figura 30 que os transcritos estão aumentados no grupo precoce, enquanto no grupo hiperprecoce a expressão é próxima de zero.

Figura 30 - Mediana e intervalo interquartil da expressão relativa dos transcritos do gene *SPEM1* no tecido muscular de animais da raça Angus abatidos e classificados como hiperprecoces e precoces



Fonte: Cavallin (2022).

Notas: Os valores são expressos como a mediana e intervalo. **** indica diferença entre os grupos com $p < 0,0001$ ($n = 23/\text{grupo}$).

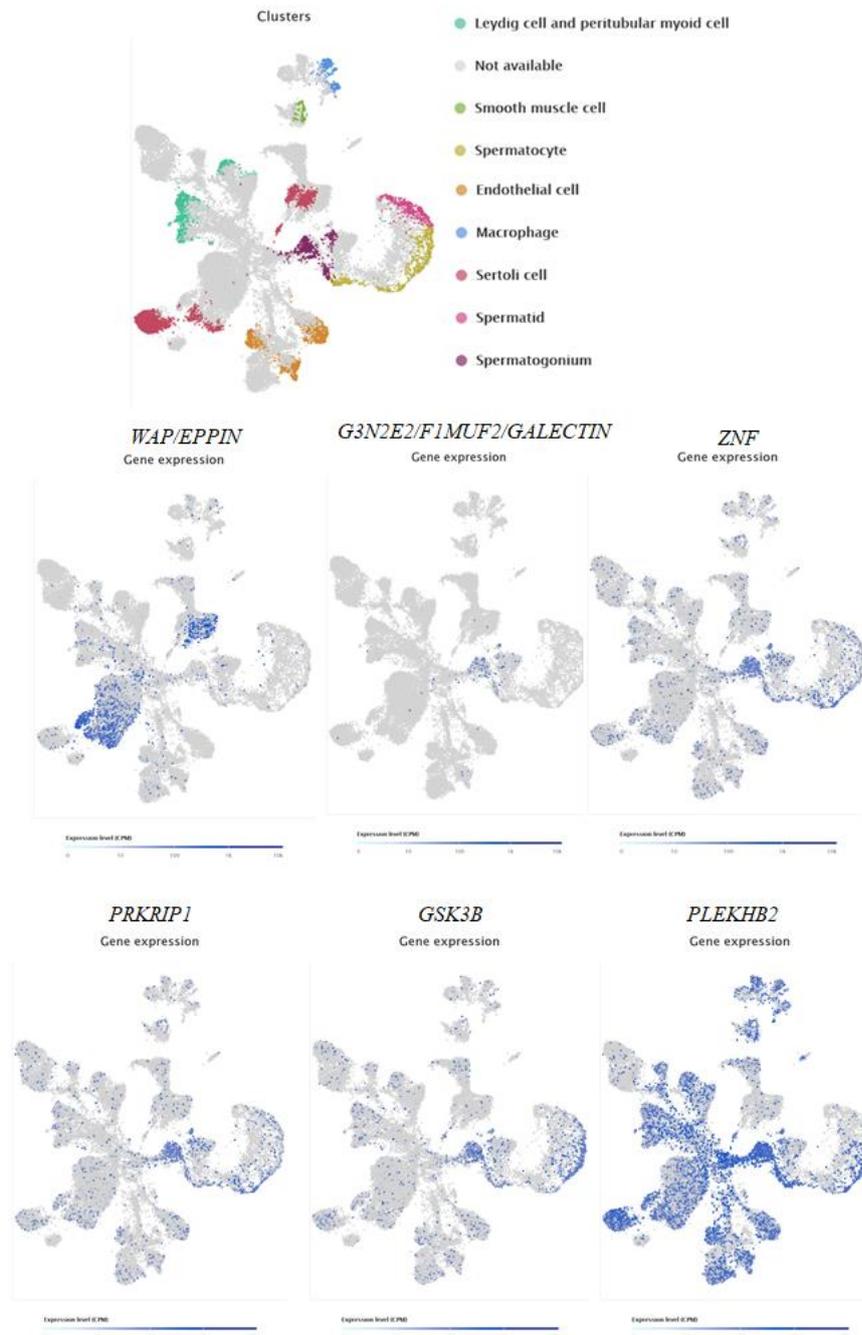
Legenda: Hiperprecoce: até 13 meses de idade; Precoce: acima de 17 meses de idade.

4.5.6. Perfil de expressão gênica por subtipo celular testicular

O perfil de expressão dos genes *down-regulated* no tecido testicular estão demonstrados na Figuras 31. O gene *WAP* está difusamente expresso entre os diversos tipos celulares, mas com marcada maior expressão em *clusters* correspondentes a células de Sertoli. Os genes *G3N2E2* e *F1MUF2* foram analisados em conjunto por codificarem um subtipo de galectina. O clusters de expressão mais significativo corresponde às espermatogônias e, de forma mais rara, a expressão foi identificada em células endoteliais e de Sertoli, células de Leydig e células mioides peritubulares. Os genes *ZNF*, *PRKRIP1* e *GSK3B* são difusamente expressos entre os diversos tipos celulares, mas com maior expressão em *clusters* correspondentes a espermatogônias e espermatócitos. O gene *PLEKHB2* é o que apresenta maiores níveis de expressão entre todos os genes aqui avaliados. Está difusamente expresso em níveis elevados

entre os diversos tipos celulares, exceto nas espermatogônias e espermátides, onde esses níveis são significativamente menores.

Figura 31 - Perfil de expressão por subtipo celular dos genes *down-regulated* no tecido testicular

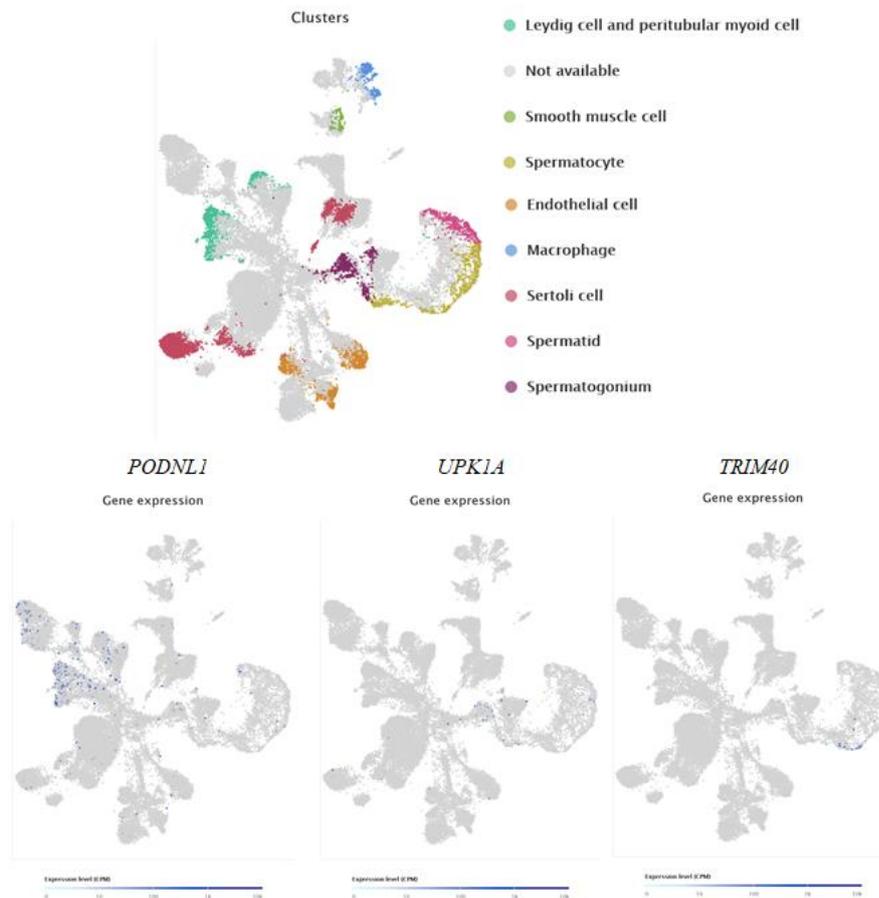


Fonte: Cavallin (2022).

Entre os genes *up-regulated* somente *PODNL1*, *UPK1A* e *TRIM40* foram identificados na base de dados do transcriptoma testicular (Figura 32). Nota-se que os três genes são de expressão rara nesse tecido e possivelmente só foram identificados em nosso experimento de

RNA-seq em consequência da ampla cobertura utilizada. O gene *PODNL1* tem sua maior expressão em *cluster* correspondente a células de Leydig e células mioides peritubulares. Aparece de forma rara e difusa em todos os outros *clusters* celulares, exceto macrófagos. O gene *UPK1A* tem maior expressão em espermatogônias e espermatócitos, aparecendo de forma mais rara em células de Sertoli e células endoteliais. O gene *TRIM40* tem sua expressão exclusivamente identificada em espermatócitos.

Figura 32 - Perfil de expressão por subtipo celular dos genes *up-regulated* no tecido testicular



Fonte: Cavallin (2022).

5. DISCUSSÃO

O crescimento e desenvolvimento de bovinos de corte está relacionado a uma sequência de fases dependentes da idade (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993). Animais da raça Angus submetidos ao sistema semi-intensivo de criação desenvolvem características de terminação para o abate com idades variando entre 11 e 24 meses. No presente trabalho, objetivando entender os mecanismos envolvidos nessas variações, foram avaliadas características relacionadas à produtividade de carne, como o peso vivo, peso de carcaça e cobertura de gordura. Foram avaliadas também características reprodutivas, como a análise seminal por técnicas convencionais e de funcionalidade espermática, dosagens séricas hormonais de testosterona, di-hidrotestosterona, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), análise da expressão de genes alvo e análise da expressão gênica global nos tecidos muscular esquelético e testicular.

A legislação que assegura a padronização e tipificação das carcaças de bovinos jovens comercializados no Estado do Paraná determina que os parâmetros de rendimento de carcaça e cobertura de gordura variam entre 105 - 225 kg para peso de carcaça e entre 1 a 10 mm para a cobertura de gordura (PARANÁ, 2006). Apesar da diferença de idade, os resultados produtivos avaliados de peso vivo, peso de carcaça e cobertura de gordura não diferem entre os dois grupos estudados. Isso demonstra que animais provenientes do mesmo sistema de criação, submetidos à intensa seleção genética para ganho de peso e precocidade e às mesmas condições de manejo nutricional e sanitário nas diversas fases do crescimento, atingem as características desejáveis para abate em idades bastante distintas. Isso corrobora com nossa hipótese inicial de que possam existir biomarcadores que considerem tanto a precocidade reprodutiva quanto a produtiva.

Para investigar os mecanismos fisiológicos envolvidos nessa condição, e uma vez que, fases de crescimento e desenvolvimento são composta pelas fases pré e pós-puberal (OWENS; DUBESKI; HANSON, 1993), foram avaliados parâmetros reprodutivos correlacionados com a puberdade a maturidade sexual. Foram avaliados desde as características morfométricas testiculares bem como características espermáticas, níveis séricos hormonais e expressão de genes envolvidos na espermatogênese, puberdade e esteroidogênese.

Observou-se que tanto o peso quanto o volume testicular foram maiores no grupo precoce. Essa característica se correlaciona positivamente com o momento em que o animal atinge a maturidade sexual no qual se observa que há também uma correlação positiva entre esses parâmetros e a concentração de espermatozoides no ejaculado (SIDDIQUI *et al.*, 2008). De fato, se constatou que nos animais do grupo precoce a concentração espermática foi maior. Outro parâmetro avaliado foi a avaliação da morfologia espermática sendo que, o grupo precoce

apresentou uma menor ocorrência dos defeitos classificados como maiores (principalmente gota citoplasmática proximal) e uma menor ocorrência dos defeitos classificados como menores em comparação ao grupo hiperprecoce. Mais uma vez, a ocorrência de células apresentando gota citoplasmática proximal é comum nos animais mais jovens enquanto que a maior ocorrência dos defeitos menores (principalmente gota citoplasmática proximal) é mais comum nos animais sexualmente maduros (FELTON-TAYLOR *et al.*, 2020). Já os parâmetros funcionais espermáticos não diferiram entre os dois grupos. Esses parâmetros são associados em grande parte ao estresse oxidativo espermático e, em condições normais, o aumento do estresse oxidativo com conseqüente diminuição da funcionalidade espermática é descrita principalmente durante o envelhecimento (KELSO *et al.*, 1997; MARTIN; GROTEWIEL, 2006; AMARAL; AMARAL; RAMALHO-SANTOS, 2013). As condições de manejo utilizadas para os grupos desse estudo não alteraram o estresse oxidativo espermático.

Como apresentado na revisão de literatura, os hormônios esteroides e tireoidianos participam ativamente do processo de desenvolvimento, no qual se enfatizou o período entre a puberdade e a maturidade sexual (fases relacionadas aos dois grupos de estudo). No grupo precoce foi possível observar uma menor concentração dos níveis séricos de testosterona, DHT e T4 quando comparado com o grupo dos animais hiperprecoces. Isso significa que os níveis desses hormônios eram maiores nos animais mais jovens (grupo hiperprecoce). Durante o desenvolvimento da puberdade os níveis desses hormônios são conhecidos por apresentarem um pico. Durante a pré-puberdade há uma elevação no padrão de secreção de LH controlado pelo GnRH hipotalâmico com aumento do LH circulante. Esse processo marca o início da ativação do eixo hipotalâmico hipofisário testicular em que o aumento de LH ativa seus receptores testiculares que por sua vez induzem a produção de testosterona (RAWLINGS *et al.*, 2008). A testosterona produzida nas células de Leydig são secretadas para a corrente circulatória e para os túbulos seminíferos. Nos túbulos seminíferos, atua nas células de Sertoli de forma direta e indireta ao ser convertida em estradiol. Uma parte atinge a luz tubular, se liga a proteína ABP (*Androgen-binding protein*) e é transportada ao epidídimo sendo que parte é convertida em DHT e participa de processos relacionados com a maturação espermática. Na corrente sanguínea, a testosterona atinge o sistema nervoso central (hipotálamo e hipófise) e realiza *feedback* (-) da secreção de LH. Nos órgãos e tecidos, a testosterona age aumentando o metabolismo de diversos genes (RAMASWAMY; WEINBAUER, 2014).

É importante salientar que durante os processos de ativação do eixo até o desencadeamento da puberdade e o início da vida adulta, os níveis hormonais podem ser mais elevados e isso se correlaciona com a sensibilização dos órgãos envolvidos na regulação do

eixo, sendo que quanto maior a quantidade de receptores androgênicos no período pré-púbere maior o nível sérico de LH e testosterona, podendo esse perfil durar de dias, meses, a anos dependendo da espécie, sendo que na maturidade sexual já se observa o perfil normal (pulsátil e circadiano) (AVENDAÑO; VAZQUEZ; TENA-SEMPERE, 2017). Além disso, durante essas fases de desenvolvimento, além da maturação do eixo HHT ocorre também o crescimento corporal acelerado com picos hormonais também de GH, hormônios tireoidianos, corticoides e andrógenos. Em conjunto, promovem a ativação geral do metabolismo com consequente hiperplasia e hipertrofia de diversas células (NUNES, 2018).

A partir dos parâmetros produtivos e reprodutivos avaliados, é possível sugerir que o grupo hiperprecoce encontra-se ainda em fase de crescimento e pré-puberdade, enquanto o grupo precoce já atingiu a fase adulta e de maturação sexual.

A análise da expressão dos genes relacionados às etapas da espermatogênese mostrou que os genes *TRIP13*, *ADAM11* e *NDRG2* possuem uma expressão maior no grupo precoce. O gene *TRIP13* atua no desenvolvimento da estrutura do cromossomo durante a meiose, estabilizando a interação pareada entre cromossomos homólogos (GOMEZ-H *et al.*, 2019). No tecido testicular esse gene é mais expresso nas espermatogônias e espermátides (GUO *et al.*, 2020). O aumento da sua expressão nos animais precoces provavelmente se relaciona com a maior taxa de espermatogênese observada nessa idade.

O gene *ADAM11* pertence à família ADAM (*Disintegrin and metalloproteinase*) de proteínas transmembrana e de secreção que regula importantes funções celulares, como adesão, migração, sinalização e proteólise (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008). Nos testículos a *ADAM11* está presente nas espermatogônias, células de Sertoli e espermátides (GUO *et al.*, 2020), apesar de sua função nesse tecido não estar elucidada. Outros membros da família ADAM, *ADAM1* (α -fertilina) e *ADAM2* (β -fertilina) serem reconhecidamente importantes nos processos de ligação e fusão do espermatozoide ao oócito (EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008).

O gene *NDRG2* (*N-myc downstream-regulated gene 2 protein*) é expresso nas espermatogônias (GUO *et al.*, 2020) onde atua na sua diferenciação, proliferação e apoptose (HOU *et al.*, 2009). O aumento da sua expressão nos animais precoces também deve estar relacionado com a maior espermatogênese nesses animais.

O *AMH* (*Anti-Mullerian hormone*) é expresso em diferentes células testiculares como as células de Sertoli, células endoteliais, macrófagos, células musculares lisas, espermatogônias e células de Leydig, sendo que no indivíduo jovem há maior expressão nas células de Sertoli (GUO *et al.*, 2020). Em touros jovens, possui correlação negativa com a testosterona sérica

sendo que, o pico de testosterona observado na puberdade é acompanhado de um rápido declínio das concentrações de AMH (ROTA *et al.*, 2002). Sugere-se ainda que a sua mensuração possa ser utilizada como biomarcador de precocidade em bovinos (SILVA *et al.*, 2015). Em nosso estudo não observamos diferença na expressão dos transcritos. Isso pode significar que nessas faixas etárias não há realmente diferenças ou ainda que houve modulação pós transcricional (SCHERRER, 2018) e os níveis séricos de AMH possam ser diferentes entre os grupos. Dessa forma, os achados da expressão gênica não desqualificam o AMH sérico como potencial biomarcador.

A síntese de esteroides também foi avaliada através da expressão de dois genes chaves para o início da esteroidogênese, *STAR* (*Steroidogenic acute regulatory protein*) e *HSD3B1* (*3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*). A proteína STAR transporta o colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria e a enzima *HSD3B1* converte o colesterol a pregnenolona, etapa precursora da síntese de testosterona (FLÜCK; PANDEY, 2014). Em nosso estudo, observamos o aumento na expressão de ambos os genes no grupo precoce. Nesse mesmo grupo observamos a diminuição dos níveis séricos de testosterona e DHT. Essa divergência pode estar relacionada a diminuição da esteroidogênese em etapas subsequentes e/ou aumento da metabolização e excreção hormonal (SCHIFFER *et al.*, 2019).

Com relação ao controle gênico do crescimento observamos que a expressão do *MYOD1* e do *MYF5* foram reduzidas no grupo precoce. Esses dois genes participam da diferenciação de células precursoras (pré-fibroblastos) em miócitos e são fundamentais nos processos de hiperplasia muscular (BRYSON-RICHARDSON; CURRIE, 2008). Os maiores níveis de expressão no grupo hiperprecoce podem indicar juntamente com outros parâmetros já discutidos que esse grupo de animais se encontra ainda em fase de crescimento.

A análise da expressão gênica global pela metodologia de RNA-seq possibilitou a identificação de genes diferencialmente expressos entre os animais hiperprecoces e precoces nos tecidos testicular e muscular. Além disso, a alta cobertura utilizada no sequenciamento (300M) possibilitou a identificação de genes de expressão rara (LIU *et al.*, 2013). No tecido testicular destacamos o aumento da expressão dos genes *PODNL1*, *UPK1A* e *TRIM40* e a redução da expressão dos genes *WAP*, *GSK3B*, *ZNF*, *G3N2E2* e *F1MUF2* nos animais do grupo hiperprecoce. No tecido muscular destacamos o aumento da expressão dos genes *EDN1*, *MRC1*, *CDC6* e *CCBE1* e a redução da expressão dos genes *SPATA3*, *TNP2*, *FSCB*, *PRM2*, *IQCF1* e *CDKN1A*.

O gene *PODNL1* (*Podocan Like 1*) pertence à família dos pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP). Ainda não tem função conhecida, mas pode estar associada a processos que

envolvam a matriz extracelular (NOOR *et al.*, 2021). Em humanos, é um marcador de prognóstico de câncer de ovário (TENG; ZHENG, 2017) e glioma (NOOR *et al.*, 2021). É expresso em diversos tecidos, com maiores níveis em placenta e testículos (FAGERBERG *et al.*, 2014). Nos testículos sua maior expressão é nas células de Leydig e células mioides peritubulares (GUO *et al.*, 2020).

O gene *UPK1A* (*Uroplakin-1a*) pertence à família de proteínas transmembrana de quatro domínios (4TM) (YU *et al.*, 1994). Apresenta expressão em diversos tecidos, sendo muito mais abundante na bexiga (FAGERBERG *et al.*, 2014), onde é conhecido por participar da diferenciação das células uroteliais, regulação da permeabilidade da membrana de células uroteliais e estabilizar a membrana apical por interações com o citoesqueleto (DE GRAAF *et al.*, 2017). Nos testículos sua maior expressão é em espermatogônias e espermatócitos (GUO *et al.*, 2020).

O gene *TRIM40* (*Tripartite motif containing 40*) pertence à família de proteínas de motivo tripartites (TRIM), que apresenta atividade catalítica através de ubiquitinação (ZHAO *et al.*, 2017) e nedilação (NOGUCHI *et al.*, 2011). Nedilação é uma via de conjugação proteica com similaridades ao sistema ubiquitina-proteassoma, mas executada por um conjunto de enzimas específicas que não se ligam à ubiquitina, sendo dependente de ATP (KAMSON; KHELA; LATERRA, 2021). Essa enzima está envolvida na resposta imune inata (ZHAO *et al.*, 2017), inflamação em neoplasias gastrointestinais (NOGUCHI *et al.*, 2011) e glioblastoma (KAMSON; KHELA; LATERRA, 2021). Nos testículos sua expressão é exclusivamente identificada em espermatócitos (GUO *et al.*, 2020).

O gene *WAP* (*Whey acidic protein*) pertence a uma família de proteínas com atividade de inibição da serina protease. Entre as variantes de *WAP* descritas, destaca-se a *EPPIN* (*Epididymal peptidase inhibitor*), expressa nos testículos e epidídimos (RICHARDSON *et al.*, 2001). Ela modula a hidrólise da semigelina inibindo a motilidade espermática (SILVA; HAMIL; O'RAND, 2013), e também possui atividade antimicrobiana (YENUGU *et al.*, 2004). Essa proteína já foi estudada como potencial estratégia de contraceptivo masculino (WANG *et al.*, 2007) e marcador de infertilidade masculina (LIU; WANG; ZHANG, 2010). Sua expressão testicular é difusa, mas acentuadamente maior nas células de Sertoli (GUO *et al.*, 2020).

O gene *GSK3B* (*Glycogen synthase kinase 3 β*) codifica uma proteína serina-treonina quinase pertencente a subfamília glicogênio sintase quinase. Possui alta expressão em diversos tecidos (FAGERBERG *et al.*, 2014) e nos testículos sua expressão ocorre em todos os tipos celulares (GUO *et al.*, 2020). A sua ativação está inversamente correlacionada à motilidade de

espermatozoides em bovinos (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 1996, 2000), suínos (APARICIO *et al.*, 2007) e humanos (FREITAS *et al.*, 2019).

O gene *ZNF* (*Zinc finger protein*) participa do processamento do pré-mRNA sendo componente do spliceossomo e afetando o processo de transcrição. Recentemente, um membro da família (*ZNF4*) foi correlacionado de forma positiva com o controle da produção de testosterona pelas células de Leydig (YOU *et al.*, 2017). Nos testículos sua expressão é identificada em todos os tipos celulares (GUO *et al.*, 2020).

Por fim, nos testículos destacamos os genes *G3N2E2* e *F1MUF2*. Ambos codificam a galectina, uma proteína pequena, solúvel e com alta afinidade a β -galactosídeos (RAPOPORT; KURMYSHKINA; BOVIN, 2008). A expressão da galectina-3 foi detectada nos testículos de suínos (KIM *et al.*, 2006), bovinos (KIM *et al.*, 2008) e ratos (ÖZBEK *et al.*, 2018). Em camundongos, a exposição dos espermatozoides a galectina-1 modula a reação acrossomal através de uma via dependente de glicanos (VASEN *et al.*, 2015). Em humanos, a galectina-3 conecta os glicanos da zona pelúcida às glicoproteínas da superfície dos espermatozoides, e seus níveis no plasma seminal são positivamente associados aos níveis de fertilidade (MEI *et al.*, 2019). Em camundongos, a galectina-3 está envolvida na regulação do início da espermatogênese e na maturação das células de Sertoli por prevenir a apoptose das células germinativas e regulando a biossíntese de testosterona (LEI *et al.*, 2021).

Em relação aos genes identificados no tecido muscular, o gene *EDN1* (*endothelin 1*) codifica a proteína endotelina 1, a mais abundante da família das endotelinas. É traduzida em pré-endotelina1 e sofre processamento pós-traducional por clivagem para ser ativada, mas a regulação transcricional é considerada como o maior mecanismo de controle da sua biodisponibilidade. Possui ações conhecidas em processos fisiológicos e patológicos em diversos órgãos e sistemas, como cérebro, olhos, sistema cardiovascular, sistema respiratório, rins, fígado, sistema imune, ovários, ossos, durante a embriogênese e na fisiopatologia de diferentes tipos de câncer (STOW *et al.*, 2011). Em bovinos, a endotelina 1 está associada com a contração da musculatura lisa do oviduto (KOBAYASHI *et al.*, 2016; YAMAMOTO *et al.*, 2016). Recentemente, foi identificado como potencial biomarcador precoce de marmoreio em novilhos da raça Hanwoo (DE LAS HERAS-SALDANA *et al.*, 2020). É um gene amplamente expresso em bovinos (ENSBTAG00000008096) tendo sido identificado em 96 tecidos, incluindo tecido adiposo, tecido adiposo subcutâneo e tecido muscular esquelético (BASTIAN *et al.*, 2021). Apesar de estar presente no tecido adiposo e muscular de forma significativa, sua função ainda não é conhecida.

O gene *MRC1* (*Mannose receptor C-type 1*) codifica um receptor de membrana que media a endocitose de glicoproteínas pelos macrófagos. Em humanos atua na modulação de diversos processos da cascata inflamatória (VAN DER ZANDE *et al.*, 2021). Foi identificado como um potencial biomarcador de qualidade de carne em bovinos oriundos do cruzamento entre Angus e Simental, negativamente correlacionado com o marmoreio (CLARK *et al.*, 2011). É também um gene amplamente expresso em bovinos (ENSBTAG00000038048) tendo sido identificado em 96 tecidos, incluindo tecido adiposo e tecido muscular esquelético (BASTIAN *et al.*, 2021). Apesar de estar presente no tecido adiposo e muscular de forma significativa, sua função ainda não é conhecida.

O gene *CDC6* (*Cell division cycle 6*) codifica uma proteína essencial para a iniciação da replicação do DNA (BORLADO; MÉNDEZ, 2008). É um gene amplamente expresso em bovinos (ENSBTAG00000010384) tendo sido identificado em 83 tecidos, incluindo o tecido muscular esquelético (BASTIAN *et al.*, 2021).

O gene *CCBE1* (*Collagen and calcium binding EGF domains 1*) codifica uma proteína secretória que contém os domínios para colágeno e para EGF ligante de cálcio (HOGAN *et al.*, 2009). Participa da angiogênese (HOGAN *et al.*, 2009; BOS *et al.*, 2011) e da linfangiogênese (HOGAN *et al.*, 2009; BOS *et al.*, 2011; ROUKENS *et al.*, 2015). É um gene amplamente expresso em bovinos (ENSBTAG00000008723) tendo sido identificado em 76 tecidos, incluindo tecido adiposo e tecido muscular esquelético (BASTIAN *et al.*, 2021). Apesar de estar presente no tecido adiposo e muscular de forma significativa, sua função ainda não é conhecida.

O gene *SPATA3* (*Spermatogenesis associated 3*) é também denominado de *Spermatogenesis cell apoptosis related gene 1* (*TSARG1*), cuja proteína pode estar envolvida na regulação da espermatogênese por regular o processo de apoptose (ZHOU *et al.*, 2019). De acordo com Fagerberg *et al.* (2014) sua expressão é considerada exclusiva no testículo. Entretanto, uma busca na plataforma Bgee Suite Expression Data in Animals (BASTIAN *et al.*, 2021), que concentra resultados de RNA-seq de 29 espécies diferentes de animais, revela que *SPATA3* em bovinos (ENSBTAG00000030718) foi identificada em 16 tecidos, incluindo tecido muscular esquelético, músculo tríceps braquial, músculo semimembranoso, músculo cardíaco e tecido adiposo subcutâneo, principalmente na fase adulta. Ainda não se conhece a ação desse gene nesses tecidos. É interessante mencionar que esse gene é considerado um potencial preditor da precocidade reprodutiva em suínos (ZHANG *et al.*, 2021) e de fertilidade em bovinos (ÖZBEK *et al.*, 2021).

O gene *TNP2* (*Transition protein 2*) codifica uma proteína localizada no nucleossomo que participa do processo de empacotamento da cromatina, importante etapa da

espermatogênese (REINHART *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 2001, 2004; MEISTRICH *et al.*, 2003; WYKES; KRAWETZ, 2003). Está associado a redução da fertilidade em camundongos (ZHAO *et al.*, 2001) e humanos (MIYAGAWA *et al.*, 2005; GHADIRKHOMI *et al.*, 2022; OMOLAOYE *et al.*, 2022), tendo sido relacionado a azoospermia em humanos (AMJAD *et al.*, 2021) e teratozoospermia em camundongos (ADHAM *et al.*, 2001). Em bovinos, a literatura é controversa. Com relação à identificação de SNPs, é relatado que não há correlação com a motilidade espermática (HIRENALLUR MAHESHWARAPPA *et al.*, 2019), não há correlação com a qualidade seminal (NIKITKINA *et al.*, 2021), e ainda que, dependendo do SNP avaliado, há correlações com a qualidade seminal (GAO *et al.*, 2014). Com relação aos níveis de expressão dos transcritos, a maior expressão é correlacionada com pior qualidade seminal e/ou infertilidade (PRAKASH *et al.*, 2021) e a menor expressão tem correlação positiva com a fertilidade (PRAKASH *et al.*, 2021). Percebe-se que apesar de ser um gene amplamente estudado e considerado como marcador de espermatogênese, não há consenso sobre qual tipo de analito (DNA, RNA ou proteína) deve ser utilizado nas correlações e nem qual parâmetro funcional espermático é melhor correlacionado. Mais uma vez, temos um gene considerado de expressão exclusiva no testículo (FAGERBERG *et al.*, 2014), mas que os recursos da plataforma Bgee Suite Expression Data in Animals (BASTIAN *et al.*, 2021) revelam que *TNP2* em bovinos (ENSBTAG00000032884) foi identificado em 34 diferentes tecidos, incluindo tecido muscular esquelético, músculo cardíaco e tecido adiposo subcutâneo. O papel desse gene no músculo também não é conhecido.

O gene *FSCB* (*Fibrous sheath CABYR binding protein*) codifica uma proteína que modula a formação da bainha fibrosa durante a espermatogênese desde espermátides alongadas até sua incorporação na cauda do espermatozoide (LI *et al.*, 2007). Níveis reduzidos de *FSCB* foram associados com defeitos na bainha fibrosa que reveste a cauda espermática e à redução da motilidade espermática (FIEDLER *et al.*, 2013). Também favorece o processo de capacitação espermática (LIU *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2016b). Todas essas informações foram obtidas de estudos em camundongos. Também é considerado como de expressão exclusiva das células da linhagem espermatogênica (LI *et al.*, 2007). Entretanto, estudos realizados em humanos indicam sua importância em diferentes condições patológicas em outros sistemas, como por exemplo estar associado ao desenvolvimento de miopia (CHEN *et al.*, 2016), de paralisia cerebral (MCMICHAEL *et al.*, 2014), e apresentar mutações no osteossarcoma (CHOY *et al.*, 2012). Em bovinos (ENSBTAG00000031934), foi identificado por RNA-seq em 7 tecidos (BASTIAN *et al.*, 2021), incluindo o tecido muscular esquelético. Sua função no músculo não é conhecida.

O gene *PRM2* (*Protamine 2*) codifica a proteína protamina 2, que substitui as histonas na cromatina da célula espermática durante a espermatogênese, sendo a principal ligante de DNA em vários vertebrados [revisado por (HAO; NI; YANG, 2019)]. É bastante estudada no contexto espermático em várias espécies animais, sendo considerada um biomarcador adequado para se estimar a qualidade espermática [revisado por (STEGER; BALHORN, 2018)]. Em bovinos, o primeiro relato da detecção dessa proteína nos testículos e no sêmen é recente (HAMILTON *et al.*, 2019). Desde então, foi correlacionada como biomarcador de fertilidade e precocidade em bovinos. Ressalta-se que enquanto a protamina 1 apresenta correlação positiva com melhores parâmetros de qualidade espermática, a correlação da protamina 2 varia com a raça, podendo ser positiva, negativa ou ainda nem existir (PARDEDE *et al.*, 2021). Com relação ao mRNA, é associada com a maturação sexual e espermatogênese em touros (LIU *et al.*, 2021). É outro gene considerado de expressão exclusiva no testículo (FAGERBERG *et al.*, 2014), mas que em bovinos (ENSBTAG00000032880) foi identificado em 18 diferentes tecidos (BASTIAN *et al.*, 2021), incluindo tecido muscular esquelético, músculo cardíaco e tecido adiposo subcutâneo. O papel desse gene no músculo também não é conhecido.

O gene *IQCF1* (*IQ motif containing F1*) codifica a proteína que interage com a calmodulina e participa da fosforilação de proteínas chave para a capacitação espermática (FANG *et al.*, 2015). É outro gene considerado de expressão exclusiva no testículo (FAGERBERG *et al.*, 2014), mas que em bovinos (ENSBTAG00000000805) foi identificado em 15 diferentes tecidos (BASTIAN *et al.*, 2021), incluindo tecido muscular esquelético, tecido adiposo subcutâneo e músculo cardíaco. O papel desse gene no músculo também não é conhecido. Percebe-se pela rede de interação que apesar de não ser um hub destacado, cinco proteínas terminam suas vias de ação no círculo correspondente ao *IQCF1*. Por essa razão, também incluímos esse gene na discussão, pela suposta importância desse gene na regulação de processos fisiológicos do tecido muscular esquelético.

Por fim no tecido muscular, o gene *CDKN1A* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) codifica um potente inibidor do complexo de ciclina dependente de quinase, atuando na modulação do ciclo de divisão celular. Pode modular a ação da miostatina em cultura de células de bovinos (LANGLEY *et al.*, 2002; DAI *et al.*, 2016). É um gene amplamente expresso em bovinos (ENSBTAG00000008353) tendo sido identificado em 97 tecidos, incluindo tecido adiposo e tecido muscular esquelético (BASTIAN *et al.*, 2021). Apesar de não formar um hub importante, destacamos esse gene por fazer interação com o gene de expressão aumentada *CDC6*, já anteriormente descrito. De fato, a diminuição da expressão de *CDKN1A* simultaneamente ao aumento da expressão de *CDC6* corrobora para o aumento do ciclo celular.

6. CONCLUSÕES

As variações observadas na idade de abate dos animais avaliados podem estar relacionadas ao período de desenvolvimento que os mesmos se encontram. Assim, sugerimos que os animais do grupo hiperprecoce se encontram ainda em crescimento e peripuberdade, enquanto os animais do grupo precoce já atingiram a fase adulta e de maturação sexual.

Alguns genes, como *EDN1*, *MRC1*, *CDC6*, *CCBE1*, *SPATA3*, *TNP2*, *FSCB*, *PRM2*, *IQCF1* e *CDKN1A* foram considerados como potenciais candidatos relacionados a características de desenvolvimento muscular precoce. Da mesma forma, os genes *PODNL1*, *UPK1A*, *TRIM40*, *WAP*, *GSK3B*, *ZNF*, *G3N2E2* e *F1MUF2* no tecido testicular foram identificados como possíveis marcadores de precocidade reprodutiva.

Em conjunto, esses dados retratam a complexidade dos mecanismos moleculares relacionados à precocidade reprodutiva e ao crescimento muscular precoce em bovinos. A investigação dos genes revelados neste estudo pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para a seleção e o melhoramento genético de animais visando uma maior precocidade reprodutiva e produtiva com biomarcadores simultâneos.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Beef Report Perfil da Pecuária no Brasil 2021**. Disponível em: <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>>. Acesso em 25 set. 2021.
- ADHAM, I. M. *et al.* Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 6, p. 513–520, 2001.
- AFONSO, J. *et al.* Genetic regulators of mineral amount in Nelore cattle muscle predicted by a new co-expression and regulatory impact factor approach. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020.
- AIELLO, D.; PATEL, K.; LASAGNA, E. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. **Animal Genetics**, v. 49, n. 6, p. 505–519, 2018.
- AMARAL, S.; AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. Aging and male reproductive function: A mitochondrial perspective. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 181–197, 2013.
- AMJAD, S. *et al.* Spermatozoa retrieval in azoospermia and expression profile of JMJD1A, TNP2, and PRM2 in a subset of the Karachi population. **Andrology**, v. 9, n. 6, p. 1934–1942, nov. 2021.
- AMTHOR, H. *et al.* The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. **Developmental Biology**, v. 251, n. 2, p. 241–257, 2002.
- APARICIO, I. M. *et al.* Porcine sperm motility is regulated by serine phosphorylation of the glycogen synthase kinase-3alpha. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 134, n. 3, p. 435–444, set. 2007.
- ARAVINDAKSHAN, J. P. *et al.* Pattern of gonadotropin secretion an ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. **Theriogenology**, v. 54, p. 339–354, 1999.
- AVENDAÑO, M. S.; VAZQUEZ, M. J.; TENA-SEMPERE, M. Disentangling puberty: Novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 6, p. 737–763, 2017.
- BARBULOVIC-NAD, I. *et al.* Bio-Microarray Fabrication Techniques — A Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, p. 237–259, 2008.
- BARTH, A. D.; BRITO, L. F. C.; KASTELIC, J. P. The effect of nutrition on sexual development of bulls. **Theriogenology**, v. 70, p. 485–494, 2008.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. **Iowa State University Press**, v. 69, n. 1, p. 285, 1989.
- BASTIAN, F. B. *et al.* The Bgee suite: integrated curated expression atlas and comparative transcriptomics in animals. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D831–D847, jan. 2021.

BEERMANN, D. H.; CASSENS, R. G.; HAUSMAN, G. J. A second look at fiber type differentiation in porcine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 1, p. 125–132, 1978.

BENNETT, G. L. Experimental selection for calving ease and postnatal growth in seven cattle populations. I. Changes in estimated breeding values. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 2093–2102, 2008.

BENTO, J.; FERRAZ, S.; DE FELÍCIO, P. E. Production systems-An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238–243, 2010.

BERRY, D. P.; CROMIE, A. R.; JUDGE, M. M. Rapid Communication : Large exploitable genetic variability exists to shorten age at slaughter in cattle 1. **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 4526–4532, 2017.

BEYER, T. A. *et al.* The TGF β superfamily in stem cell biology and early mammalian embryonic development. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 2, p. 2268–2279, 2013.

BIANCHINI, W. *et al.* Crescimento e características de carcaça de bovinos superprecoces Nelore, Simental e mestiços. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 554–564, 2008.

BIANCO, A. C.; DA CONCEIÇÃO, R. R. The deiodinase trio and thyroid hormone signaling. **Methods in Molecular Biology**, v. 1801, p. 67–83, 2018.

BLASCO, A.; ANGEL, M. A short critical history of the application of genomics to. **Livestock Science**, p. 1–6, 2014.

BLOM, E. [The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram (author's transl)]. **Nordisk veterinær medicin**, v. 25, n. 7, p. 383–391, 1973.

BORLADO, L. R.; MÉNDEZ, J. CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 2, p. 237–243, fev. 2008.

BOS, F. L. *et al.* CCBE1 is essential for mammalian lymphatic vascular development and enhances the lymphangiogenic effect of vascular endothelial growth factor-C in vivo. **Circulation Research**, v. 109, n. 5, p. 486–491, ago. 2011.

BOURGON, S. L. *et al.* Sexual development, productivity and reproductive abnormalities in yearling beef bulls S.L. Bourgon,. **Clinical Theriogenology**, v. 9, n. 3, p. 2017, 2017.

BREIER, B. H.; GLUCKMAN, P. D. The regulation of postnatal growth: nutritional influences on endocrine pathways and function of the somatotrophic axis. **Livestock Production Science**, v. 27, n. 1, p. 77–94, 1991.

BRIDI, A. M. Crescimento e desenvolvimento do tecido muscular. **Departamento De Zootecnia Da UEL**, 2010.

BRYSON-RICHARDSON, R. J.; CURRIE, P. D. The genetics of vertebrate myogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 8, p. 632–646, 2008.

BURTONT, J. L. *et al.* A review of bovine growth hormone. **Journal of Animal Science**, v. 1, 1994.

CBRA. **Manual Para Exame Andrológico E Avaliação De Sêmen Animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

CESAR, A. S. M. *et al.* Putative regulatory factors associated with intramuscular fat content. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–21, 2015.

CESAR, A. S. M. *et al.* Differences in the skeletal muscle transcriptome profile associated with extreme values of fatty acids content. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2016..

CHEN, F. *et al.* Variation in PTCHD2, CRISP3, NAP1L4, FSCB, and AP3B2 associated with spherical equivalent. **Molecular Vision**, v. 22, p. 783, jul. 2016.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 581–585, 2006.

CHOY, E. *et al.* High-throughput genotyping in osteosarcoma identifies multiple mutations in phosphoinositide-3-kinase and other oncogenes. **Cancer**, v. 118, n. 11, p. 2905–2914, jun. 2012.

CLARK, D. L. *et al.* Muscle gene expression associated with increased marbling in beef cattle. **Animal Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 51–63, abr. 2011.

COLLE, M. J. *et al.* Influence of extended aging on beef quality characteristics and sensory perception of steaks from the gluteus medius and longissimus lumborum. **Meat**, v. 110, p. 32–39, 2015.

COSTA, T. C. *et al.* Skeletal Muscle Development in Postnatal Beef Cattle. **Animals**, v. 11, p. 860, 2021.

DA SILVA NETO, J. B. *et al.* Genetic correlation estimates between age at puberty and growth, reproductive, and carcass traits in young Nelore bulls. **Livestock Science**, v. 241, n. October 2019, p. 1–6, 2020..

DAI, Y. *et al.* MicroRNA-128 regulates the proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by repressing Sp1. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 414, n. 1–2, p. 37–46, mar. 2016.

DAIX, M. *et al.* Relationship between leptin content, metabolic hormones and fat deposition in three beef cattle breeds. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 273–278, 2008.

DE GRAAF, P. *et al.* Systematic review to compare urothelium differentiation with urethral epithelium differentiation in fetal development, as a basis for tissue engineering of the male urethra. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 23, n. 3, p. 257–267, jun. 2017.

DE LAS HERAS-SALDANA, S. *et al.* Differential Gene Expression in Longissimus Dorsi Muscle of Hanwoo Steers-New Insight in Genes Involved in Marbling Development at Younger Ages. **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1–17, nov. 2020.

DE LIMA, A. O. *et al.* Network Analyses Predict Small RNAs That Might Modulate Gene Expression in the Testis and Epididymis of Bos indicus Bulls. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. April, p. 1–14, 2021.

DE OLIVEIRA, P. S. N. *et al.* An integrative transcriptome analysis indicates regulatory mRNA-miRNA networks for residual feed intake in Nelore cattle. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

DELGADO, E. F. *et al.* BRAZILIAN CONSUMERS ' PERCEPTION OF TENDERNESS OF BEEF STEAKS CLASSIFIED BY SHEAR FORCE AND TASTE. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 232–239, 2006.

DESTEFANIS, G. *et al.* MEAT Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner – Bratzler shear force. **Meat Science**, v. 78, p. 153–156, 2008.

DINIZ, W. J. S. *et al.* Detection of co-expressed pathway modules associated with mineral concentration and meat quality in nelore cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. MAR, p. 1–12, 2019.

DOBIN, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

DU, M. *et al.* Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. **Journal Of Animal Science**, v. 88, n. 13 Suppl, 2010.

DU, M. *et al.* Meat science and muscle Biology Symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1419–1427, 2013.

DU, M. *et al.* Fetal programming in meat production. **Meat Science**, v. 109, p. 40–47, 2015.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 258–289, out. 2008.

FAGERBERG, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics : MCP**, v. 13, n. 2, p. 397–406, fev. 2014.

FANG, P. *et al.* A novel acrosomal protein, IQCF1, involved in sperm capacitation and the acrosome reaction. **Andrology**, v. 3, n. 2, p. 332–344, mar. 2015.

FELD, S.; HIRSCHBERG, R. Growth Hormone , the Insulin-Like Growth Factor. **Endocrine**, v. 17, n. 5, p. 423–480, 1996.

FELTON-TAYLOR, J. *et al.* Effect of breed, age, season and region on sperm morphology in 11,387 bulls submitted to breeding soundness evaluation in Australia. **Theriogenology**, v. 142,

p. 1–7, 2020.

FERNÁNDEZ, M. E. *et al.* Association of a region of bovine chromosome 1 (BTA1) with age at puberty in Angus bulls. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 10, p. 1618–1621, 2016.

FIEDLER, S. E. *et al.* Loss of R2D2 proteins ROPN1 and ROPN1L causes defects in murine sperm motility, phosphorylation, and fibrous sheath integrity. **Biology Of Reproduction**, v. 88, n. 2, fev. 2013.

FLÜCK, C. E.; PANDEY, A. V. Steroidogenesis of the testis – new genes and pathways. **Annales d'Endocrinologie**, v. 75, n. 2, p. 40–47, maio 2014.

FONSECA, L. F. S. *et al.* Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.

FORTES, M. R. S. *et al.* Candidate Genes Associated with Testicular Development, Sperm Quality, and Hormone Levels of Inhibin, Luteinizing Hormone, and Insulin-Like Growth Factor 1 in Brahman Bulls. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 3, p. 1–8, 2012.

FREITAS, M. J. *et al.* Isoform-specific GSK3A activity is negatively correlated with human sperm motility. **Molecular Human Reproduction**, v. 25, n. 4, p. 171, fev. 2019.

GAO, Q. *et al.* Association of TNP2 gene polymorphisms of the bta-miR-154 target site with the semen quality traits of Chinese Holstein bulls. **Plos One**, v. 9, n. 1, jan. 2014.

GHADIRKHOMI, E. *et al.* Correlation of Novel Single Nucleotide Polymorphisms of USP26, TEX15, and TNP2 Genes with Male Infertility in North West of Iran. **International Journal Of Fertility & Sterility**, v. 16, n. 1, p. 10–16, dez. 2022.

GOMES, R. da C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. **Embrapa**, p. 4, 2017.

GOMEZ-H, L. *et al.* The PSMA8 Subunit Of The Spermatoproteasome Is Essential For Proper Meiotic Exit And Mouse Fertility. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 8, p. 1-31, 2019.

GONÇALVES, T. M. *et al.* Gene co-expression analysis indicates potential pathways and regulators of beef tenderness in Nellore cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. OCT, p. 1–18, 2018.

GONZALEZ, J. M.; PHELPS, K. J. United States beef quality as chronicled by the National Beef Quality Audits , Beef Consumer Satisfaction Projects , and National Beef Tenderness Surveys — A review. **Asian-Australas Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 7, p. 1036–1042, 2018.

GRUNERT, K. G.; MADALENA, M.; AGUIAR, M. Consumers ' quality perception of national branded , national store branded , and imported store branded beef. **Meat Science**, v. 84, p. 54–65, 2010.

GUO, J. *et al.* The Dynamic Transcriptional Cell Atlas of Testis Development during Human

Puberty. **Cell Stem Cell**, v. 26, n. 2, p. 262- 276.e4, jan. 2020.

GUO, X. *et al.* Bovine TMEM95 gene: Polymorphisms detecting in five Chinese indigenous cattle breeds and their association with growth traits. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 58–66, 2021.

HAMILTON, T. R. S. *et al.* Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. **Andrology**, v. 7, n. 3, p. 373–381, maio 2019.

HAO, S. L.; NI, F. Da; YANG, W. X. The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. **Gene**, v. 706, p. 201–210, jul. 2019.

HARRIS, D. L. Breeding for efficiency in livestock production: defining the economic objectives. **Journal of Animal Science**, v. 30, n. 6, p. 860–865, 1970.

HAUSMAN, G. J. *et al.* Board-invited review: The biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 4, p. 1218–1246, 2009.

HERRINGTON, J.; CARTER-SU, C.; CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. **TRENDS in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 6, p. 252–257, 2001.

HIRENALLUR MAHESHWARAPPA, Y. *et al.* Identification of sperm motility markers in bovine transition protein genes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 2, p. 365–372, fev. 2019.

HOGAN, B. M. *et al.* Ccbe1 is required for embryonic lymphangiogenesis and venous sprouting. **Nature Genetics**, v. 41, n. 4, p. 396–398, abr. 2009.

HOU, W. G. *et al.* Differential expression of N-Myc downstream regulated gene 2 (NDRG2) in the rat testis during postnatal development. **Cell and Tissue Research**, v. 337, n. 2, p. 257–267, ago. 2009.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, p. 809–828, 1987.

HUANG, W.; KHATIB, H. Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. **BMC Genomics**, v. 11, n. 711, p. 1–10, 2010.

HUSZENICZA, G.; KULCSAR, M.; RUDAS, P. Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. **Veterinarni Medicina**, v. 47, n. 7, p. 199–210, 2002.

IBGE. **Pesquisa Trimestral do Abate de Animais 2020**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>> . Acesso em: 12 jan. 2021.

KADOKAWA, H. Discovery of new receptors regulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by bovine gonadotrophs to explore a new paradigm for mechanisms regulating reproduction. **Journal of Reproduction and Development**, v. 66, n. 4, p. 291–297, 2020.

KAMSON, D. O.; KHELA, H. S.; LATERRA, J. Investigational new drugs against glioblastoma. **Glioblastoma Resistance to Chemotherapy: Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies**, p. 31–77, jan. 2021.

KELSO, K. A. *et al.* Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 1–6, 1997.

KHATIB, N.; GAIDHANE, S.; GAIDHANE, A. M. Ghrelin : Ghrelin as a Regulatory Peptide in Growth Hormone Secretion. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 8, p. 13–18, 2014.

KIM, H. *et al.* Immunohistochemical localization of galectin-3 in boar testis and epididymis. **Acta Histochemica**, v. 108, n. 6, p. 481–485, dez. 2006.

KIM, H. *et al.* Immunohistochemical study of galectin-3 in mature and immature bull testis and epididymis. **Journal Of Veterinary Science**, v. 9, n. 4, p. 339–344, 2008.

KITAHARA, G. *et al.* Changes in peripheral anti-Müllerian hormone concentration and their relationship with testicular structure in beef bull calves. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 57, p. 127–132, 2016.

KOBAYASHI, Y. *et al.* Roles of EDNs in regulating oviductal NO synthesis and smooth muscle motility in cows. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 151, n. 6, p. 615–622, jun. 2016.

KOPUZLU, S. *et al.* Effects of slaughter age and muscle type on meat quality characteristics of Eastern Anatolian Red bulls. **Archives Animal Breeding**, v. 61, p. 497–504, 2018.

LANGLEY, B. *et al.* Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49831–49840, dez. 2002.

LASH, A. E. *et al.* SAGEmap : A Public Gene Expression Resource. **Genome Research**, v. 10, p. 1051–1060, 2000.

LEI, T. *et al.* Targeted disruption of galectin 3 in mice delays the first wave of spermatogenesis and increases germ cell apoptosis. **Cellular And Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 78, n. 7, p. 3621–3635, abr. 2021.

LI, P. *et al.* Comparing the normalization methods for the differential analysis of Illumina high-throughput RNA-Seq data. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2015.

LI, Y. F. *et al.* FSCB, a novel protein kinase A-phosphorylated calcium-binding protein, is a CABYR-binding partner involved in late steps of fibrous sheath biogenesis. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 47, p. 34104–34119, nov. 2007.

LIU, B.; WANG, Z.; ZHANG, W. Eppin, a novel marker to differentially diagnose azoospermia? **Medical Hypotheses**, v. 75, n. 6, p. 681, dez. 2010.

LIU, H. *et al.* Integrated Analysis of Long Non-Coding RNA and mRNA Expression Profiles

in Testes of Calves and Sexually Mature Wandong Bulls (*Bos taurus*). **Animals : An Open Access Journal From MDPI**, v. 11, n. 7, jul. 2021.

LIU, S. L. *et al.* FSCB phosphorylation in mouse spermatozoa capacitation. **BMB Reports**, v. 44, n. 8, p. 541–546, ago. 2011.

LIU, Y. *et al.* Evaluating the Impact of Sequencing Depth on Transcriptome Profiling in Human Adipose. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, jun. 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPES, F. B. *et al.* Multivariate approach for young bull selection from a performance test using multiple traits of economic importance. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 6, p. 1375–1381, 2013.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1–21, 2014.

LOWE, R. *et al.* Transcriptomics technologies. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 5, p. 1–23, 2017.

LUCHIARI, A. **Pecuária da Carne Bovina**. 1. ed. São Paulo: R Vieira, 2000.

MACNEIL, M. D. Genetic evaluation of an index of birth weight and yearling weight to improve efficiency of beef production. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 10, p. 2425–2433, 2003.

MALONE, J. H.; OLIVER, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC Biology**, v. 9, n. 34, p. 1–9, 2009.

MALTIN, C. A. *et al.* Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 359–374, 2001.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 9, de 4 de maio de 2004**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

MARTIN, I.; GROTEWIEL, M. S. Oxidative damage and age-related functional declines. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 5, p. 411–423, 2006.

MCMICHAEL, G. *et al.* Rare copy number variation in cerebral palsy. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 1, p. 40, 2014.

MEDRANO, J. F.; RINCON, G.; ISLAS-TREJO, A. Comparative Analysis Of Bovine Milk And Mammary Gland Transcriptome Using RNA-Seq. **Animal Production Science**, v. 55, n. 9, p. 1172–1178, 2010.

MEI, S. *et al.* The role of galectin-3 in spermatozoa-zona pellucida binding and its association with fertilization in vitro. **Molecular human reproduction**, v. 25, n. 8, p. 458–470, jul. 2019.

MEISTRICH, M. L. *et al.* Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483–488, 2003.

MENEGASSI, S. R. O. *et al.* Evaluation and prediction of scrotal circumference in beef bulls. **Theriogenology**, v. 140, p. 25–32, 2019.

MIYAGAWA, Y. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 779–786, nov. 2005.

NICHI, M. *et al.* Evaluation of epididymis storage temperature and cryopreservation conditions for improved mitochondrial membrane potential, membrane integrity, sperm motility and in vitro fertilization in bovine epididymal sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 2, p. 257–263, 2017.

NIKITKINA, E. *et al.* Search for Associations of FSHR, INHA, INHAB, PRL, TNP2 and SPEF2 Genes Polymorphisms with Semen Quality in Russian Holstein Bulls (Pilot Study). **Animals : an open access journal from MDPI**, v. 11, n. 10, out. 2021.

NOGUCHI, K. *et al.* TRIM40 promotes neddylation of IKK γ and is downregulated in gastrointestinal cancers. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 7, p. 995–1004, jul. 2011.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006.

NOOR, H. *et al.* PODNL1 Methylation Serves as a Prognostic Biomarker and Associates with Immune Cell Infiltration and Immune Checkpoint Blockade Response in Lower-Grade Glioma. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, nov. 2021.

NUNES, M. T. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 639–643, 2003.

NUNES, M. T. Crescimento e desenvolvimento. In: **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Koogan, Guanabara, 2018. p. 1740–1751.

OKSBJERG, N.; GONDRET, F.; VESTERGAARD, M. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, n. 3 SPEC. ISS., p. 219–240, 2004.

OMOLAOYE, T. S. *et al.* Omics and Male Infertility: Highlighting the Application of Transcriptomic Data. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 2, fev. 2022.

OPIO, C. *et al.* **Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains – A global life cycle assessment**, 2023. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 10 out. 2021.

OWENS, F. N.; DUBESKI, P.; HANSON, C. F. Factors that alter the growth and development of ruminants. **Journal of animal science**, v. 71, n. 11, p. 3138–3150, 1993.

ÖZBEK, M. *et al.* Expression pattern of galectin-1 and galectin-3 in rat testes and epididymis during postnatal development. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 8, p. 814–827, nov. 2018.

ÖZBEK, M. *et al.* Sperm Functional Genome Associated With Bull Fertility. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 571, jun. 2021.

PAPALEO MAZZUCCO, J. *et al.* Growth, carcass and meat quality traits in beef from Angus, Hereford and cross-breed grazing steers, and their association with SNPs in genes related to fat deposition metabolism. **Meat Science**, v. 114, p. 121–129, 2016.

PARADIS, F. *et al.* Maternal nutrient restriction in mid-to-late gestation influences fetal mRNA expression in muscle tissues in beef cattle. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Resolução nº 70 de 11 de julho de 2006**. Dispõe sobre a padronização e tipificação das carcaças de bovídeos jovens comercializados no Estado do Paraná. Diário Oficial Paraná. Curitiba, 18 de julho de 2006. Disponível em: <<https://www.documentos.dioe.pr.gov.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2020

PARDEDE, B. P. *et al.* The potential of sperm bovine protamine as a protein marker of semen production and quality at the National Artificial Insemination Center of Indonesia. **Veterinary World**, v. 14, n. 9, p. 2473–2481, set. 2021.

PAUSCH, H. *et al.* A Nonsense Mutation in TMEM95 Encoding a Nondescript Transmembrane Protein Causes Idiopathic Male Subfertility in Cattle. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, 2014.

PENITENTE-FILHO, J. M. *et al.* Can scrotal circumference-based selection discard bulls with good productive and reproductive potential? **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–14, 2018.

PÉREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 1–6, 2008.

PLOUZEK, C. A.; TRENKLE, A. Growth hormone parameters at four ages in intact and castrated male and female cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 63–72, 1991.

POPE, C. E. *et al.* A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa Reviewed work (s): A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87–95, 1991.

PRAKASH, M. A. *et al.* Comparative Transcriptomic Analysis of Spermatozoa From High- and Low-Fertile Crossbred Bulls: Implications for Fertility Prediction. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. May, p. 1–14, 2021.

RAMASWAMY, S.; WEINBAUER, G. F. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. 1–15, 2014.

R CORE TEAM (2021) R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAPOPORT, E. M.; KURMYSHKINA, O. V.; BOVIN, N. V. Mammalian galectins: structure,

carbohydrate specificity, and functions. **Biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 393–405, 2008.

RAWLINGS, N. *et al.* Sexual Maturation in the Bull. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.2, p. 295–301, 2008.

REHFELDT, C. *et al.* Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science**, v. 66, n. 2, p. 177–188, 2000.

REINHART, N. *et al.* Characterization of a gene encoding a basic protein of the spermatid nucleus, TNP2, and its close linkage to the protamine genes in the bull. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 372, n. 6, p. 431–436, 1991.

RICHARDSON, R. T. *et al.* Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. **Gene**, v. 270, n. 1–2, p. 93–102, maio 2001.

ROBINSON, T. L.; SUTHERLAND, I. A.; SUTHERLAND, J. Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1–2, p. 160–165, 2007.

ROSICKÁ, M. *et al.* Ghrelin - a New Endogenous Growth Hormone Secretagogue. **Physiological Research**, v. 51, p. 435–441, 2002.

ROTA, A. *et al.* Age dependent changes in plasma anti-Müllerian hormone concentrations in the bovine male, female, and freemartin from birth to puberty: relationship between testosterone production and influence on sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, n. 1, p. 39–44, out. 2002.

ROUKENS, M. G. *et al.* Functional Dissection of the CCBE1 Protein: A Crucial Requirement for the Collagen Repeat Domain. **Circulation Research**, v. 116, n. 10, p. 1660–1669, maio 2015.

ROYER, A. M. *et al.* Single nucleotide polymorphisms associated with carcass traits in a population of Brahman and Brahman-influenced steers. v. 15, n. 2, p. 1–6, 2015.

RUSSELL, C. A.; POLLAK, E. J.; SPANGLER, M. L. Genetic parameter estimates for bull prolificacy and its relationship with scrotal circumference in a commercial beef cattle population. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 3, p. 1–6, 2021.

SANTOS SILVA, D. B. dos *et al.* Transcriptome profiling of muscle in Nelore cattle phenotypically divergent for the ribeye muscle area. **Genomics**, v. 112, n. 2, p. 1257–1263, 2020.

SCHERRER, K. Primary transcripts: From the discovery of RNA processing to current concepts of gene expression - Review. **Experimental Cell Research**, v. 373, n. 1–2, p. 1–33, 2018.

SCHIFFER, L. *et al.* Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 194, n. July, p. 1–25, 2019.

SCHURCH, N. J. *et al.* How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? **Rna**, v. 22, n. 6, p. 839–851, 2016.

SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. **Genome Research**, v. 13, n. 22, p. 2498–2504, 2003.

SHENG, H. *et al.* Proteomic Studies on the Mechanism of Myostatin Regulating Cattle Skeletal Muscle Development. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. November, p. 1–18, 2021.

SIDDIQUI, M. A. R. *et al.* Crossbred bull selection for bigger scrotum and shorter age at puberty with potentials for better quality semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 1, p. 74–79, 2008.

SILVA-VIGNATO, B. *et al.* Gene co-expression networks associated with carcass traits reveal new pathways for muscle and fat deposition in Nelore cattle. **BMC Genomics**, v. 20, n. 32, p. 1–13, 2019.

SILVA, D. B. S. *et al.* Spliced genes in muscle from Nelore Cattle and their association with carcass and meat quality. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

SILVA, E. J. R.; HAMIL, K. G.; O’RAND, M. G. Interacting proteins on human spermatozoa: adaptive evolution of the binding of semenogelin I to EPPIN. **Plos One**, v. 8, n. 12, dez. 2013.

SILVA, E. V. C. e *et al.* Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 22–31, 2015.

SQUIRES, E. J. **Applied animal endocrinology**. Massachusetts: CABI publishing USA, 2003.

STAFUZZA, N. B. *et al.* Genome-wide association study for age at puberty in young Nelore bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 137, n. 2, p. 234–244, 2020.

STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 631–656, 2019.

STEGER, K.; BALHORN, R. Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 47, n. 4, p. 273–279, ago. 2018.

STOW, L. R. *et al.* Endothelin-1 gene regulation. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 16–28, jan. 2011.

SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. 362–368, 2017.

TENG, C.; ZHENG, H. Low expression of microRNA-1908 predicts a poor prognosis for patients with ovarian cancer. **Oncology Letters**, v. 14, n. 4, p. 4277, 2017.

THOMAS, M. G. *et al.* Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance-tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 3, p. 757–767, 2002.

VAN DER ZANDE, H. J. P. *et al.* The Mannose Receptor: From Endocytic Receptor and Biomarker to Regulator of (Meta)Inflammation. **Frontiers In Immunology**, v. 12, out. 2021.

VASEN, G. *et al.* The galectin-1-glycan axis controls sperm fertilizing capacity by regulating sperm motility and membrane hyperpolarization. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 29, n. 10, p. 4189–4200, out. 2015.

VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 557–568, 2008.

VIJAYARAGHAVAN, S. *et al.* Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 3, p. 709–718, mar. 1996.

VIJAYARAGHAVAN, S. *et al.* A role for phosphorylation of glycogen synthase kinase-3alpha in bovine sperm motility regulation. **Biology Of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1647–1654, 2000.

WANG, X. *et al.* A novel 12-bp indel polymorphism within the GDF9 gene is significantly associated with litter size and growth traits in goats. **Animal Genetics**, v. 48, n. 6, p. 735–736, 2017.

WANG, Z. *et al.* Eppin: a molecular strategy for male contraception. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 535-542, 2007.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2010.

WEGNER, J. *et al.* Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle 1. **Journal Of Animal Science**, v. 78, n. May, p. 1485–1496, 2000.

WEN, Y.; ALIMOV, A. P.; MCCARTHY, J. J. Ribosome Biogenesis is Necessary for Skeletal Muscle Hypertrophy. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 44, n. 3, p. 1–12, 2017.

WICKRAMASINGHE, S. *et al.* RNA-Sequencing : A tool to explore new frontiers in animal genetics \$. **Livestock Science**, v. 166, p. 206–216, 2014.

WOLF, F. R.; ALMQUIST, J. O.; HALE, E. B. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**, v. 24, n. 3, p. 761–765, 1965.

WYKES, S. M.; KRAWETZ, S. A. The Structural Organization of Sperm Chromatin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 29471–29477, ago. 2003.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Endothelin as a local regulating factor in the bovine oviduct. **Reproduction, Fertility, And Development**, v. 28, n. 6, p. 673–681, 2016.

YANG, S. *et al.* Parallel comparative proteomics and phosphoproteomics reveal that cattle myostatin regulates phosphorylation of key enzymes in glycogen metabolism and glycolysis pathway. **Oncotarget**, v. 9, n. 13, p. 11352–11370, 2018.

YENUGU, S. *et al.* Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1484–1490, nov. 2004.

YOU, X. *et al.* Expression pattern of Zinc finger protein 185 in mouse testis and its role in regulation of testosterone secretion. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 2, p. 2101–2106, ago. 2017.

YU, J. *et al.* Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. **The Journal of cell biology**, v. 125, n. 1, p. 171–182, 1994.

ZHANG, B. *et al.* Identification and Characterization of lncRNA and mRNA in Testes of Landrace and Hezuo Boars. **Animals : an open access journal from MDPI**, v. 11, n. 8, ago. 2021.

ZHANG, S. *et al.* Tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (T-ARMS-PCR) rapidly identified a critical missense mutation (P236T) of bovine ACADVL gene affecting growth traits. **Gene**, v. 559, n. 2, p. 184–188, 2015.

ZHANG, S. *et al.* Identification of novel alternative splicing transcript and expression analysis of bovine TMEM95 gene. **Gene**, v. 575, n. 2, p. 531–536, 2016a.

ZHANG, S. *et al.* animals Two Insertion / Deletion Variants within SPAG17 Gene. **Animals**, v. 9, n. 379, p. 1–14, 2019.

ZHANG, X. *et al.* FSCB phosphorylation regulates mouse spermatozoa capacitation through suppressing SUMOylation of ROPN1/ROPN1L. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 6, p. 2776, 2016b.

ZHANG, Z. H. *et al.* A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-seq data. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–11, 2014.

ZHAO, C. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase TRIM40 Attenuates Antiviral Immune Responses by Targeting MDA5 and RIG-I. **Cell Reports**, v. 21, n. 6, p. 1613–1623, nov. 2017.

ZHAO, M. *et al.* Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. **Molecular And Cellular Biology**, v. 21, n. 21, p. 7243–7255, nov. 2001.

ZHAO, M. *et al.* Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 3, p. 1016–1025, set. 2004.

ZHOU, B. *et al.* Characterization and molecular cloning of novel isoforms of human spermatogenesis associated gene SPATA3. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 4, p. 3827–3834, ago. 2019.

ZHOU, Z. K. *et al.* Effect of castration on carcass quality and differential gene expression of longissimus muscle between steer and bull. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 8, p. 5307–

5312, 2011.