

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

PERFIL DA EXPRESSÃO DE microRNAs EM ANIMAIS DA
RAÇA NELORE CONTRASTANTES PARA MEDIDAS DE
ÁREA DE OLHO DE LOMBO

Autor: Edyjoelson Phelipe de Moraes Luna
Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro
Coorientadora: Prof. Dra. Luciana Correia de A. Regitano

GARANHUNS
Estado de Pernambuco
Fevereiro - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

PERFIL DA EXPRESSÃO DE microRNAs EM ANIMAIS DA
RAÇA NELORE CONTRASTANTES PARA MEDIDAS DE
ÁREA DE OLHO DE LOMBO

Autor: Edyjoelson Phelipe de Moraes Luna
Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro
Coorientadora: Prof. Dra. Luciana Correia de A. Regitano

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS, no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Área de Concentração: Produção animal e mudanças climáticas.

GARANHUNS – PE
Estado de Pernambuco
Fevereiro – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

L961p Luna, Edyjoelson Phelipe de Moraes

Perfil da expressão de microRNAs em animais da raça Nelore contrastantes para medidas de área de olho de lombo / Edyjoelson Phelipe de Moraes Luna. - 2018.

f. 60

Orientadora: Kleber Régis Santoro.
Coorientadora: Luciana Correia de A. Regitano
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) -
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós
- Graduação em Ciência Animal e Pastagens, Garanhuns,
BR - PE, 2018.

Inclui referências, anexo e apêndice
113 f.: il.

1. Nelore (Bovino) 2. Ruminante 3. Veterinária - Diagnóstico
I. Santoro, Kleber Régis, orient. II. Regitano, Luciana Correia de
A., coorient. III. Título

CDD 636.2

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

PERFIL DA EXPRESSÃO DE microRNAs EM ANIMAIS DA
RAÇA NELORE CONTRASTANTES PARA MEDIDAS DE
ÁREA DE OLHO DE LOMBO

Autor: Edyjoelson Phelipe de Moraes Luna
Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro
Coorientadora: Prof. Dra. Luciana Correia de A. Regitano

TITULAÇÃO: Mestre em Ciência Animal e Pastagens
Área de Concentração: Produção animal e mudanças climáticas.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Omer Cavalcanti de Almeida – PPGCAP/UAG/UFRPE

Prof. Dr. Claudio Galvao de Souza Junior – UAG/UFRPE

Prof. Dr. Kleber Régis Santoro – PPGCAP/UAG/UFRPE
(Orientador)

Solidão

Vive tua solidão
Não há mais o antes
Tu és testemunha
Do amor que valeu
A fé é um fundamento fraco
No coração, causa fracasso
Forte é o espaço
Já o compasso é aço
A luz do dia alumia
Mas a noite mia
E no teu fulgor
O céu espia
O medo da alma
Encarna a esperança
A menina faz a trança
E sonha em ser feliz.

**Dedico este poema ao amigo Edyjoelson Luna
(Gilberto Fábio “ó livre pensador”)**

À minha mãe Maria de Fátima e meu pai, Antônio Gomes (in memoriam), por todo amor, apoio, ensinamentos e por me conceder participação na F1. À minha irmã Elizangela, meu cunhado Renan e meus sobrinhos Naty e Ryan, sendo meu apoio e base familiar.

À minha namorada Daiane todo amor, dedicação e suporte nas minhas conquistas e em todos os momentos é meu porto seguro.

Ao meu amigo Wellison, por ter sido fonte de conhecimento, motivação, inspiração e apoio. Pelo seu exemplo, profissional e como SER humano e de um carácter admirável. Pivô fundamental deste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Sou enormemente grato á Universidade Federal Rural de Pernambuco, CAPES, juntamente ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, especialmente ao corpo docente, técnico e toda estrutura que possibilitaram essa conquista.

Em especial a professora a Profa. Dra. Dulciene Karla de Andrade Silva encentivadora dos meus trabalhos. Agradecido ao professor Omer e Cláudio, por aceitarem o convite em participar da banca e por todos os ensinamentos e contribuições.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Kleber Régis Santoro, pela oportunidade de participar de sua equipe, pelo seu exemplo como pessoa e profissional. Extremamente grato a flexibilidade da parceria com Embrapa Sudeste.

A Dra. Luciana Regitano pela coorientação, disponibilidade e flexibilidade na parceria com Professor Kléber Régis (UFRPE/PPGCAP – EMBRAPA), todo acolhimento, atenção, conselhos, instruções e sempre dando seu exemplo de profissional que carrega consingo seu lado humano ao conduzir seus orientandos

Ao amigo Chiquinho (Oia a Lua, viu) que em nossas longas conversas de política e entre outros assuntos, sempre com o intuito de ensinar e divertir.

À todos os integrantes do Laboratório de Biologia Molecular da UAG.

Ao amigo Wellison que em todos os momentos, desde a graduação acompanha e me da todo o suporte possível nos trabalhos e na vida. Muito obrigado você foi a ponte para a janela do mundo.

À Kedima e sua família, à Beto e Simone por todo o apoio sempre. Dona Cida e Sr Lira, e em especial a Nadjara, vocês possibilitaram concretizar vários sonhos.

Paulo Henrique, Cibele, Emyliane, Marisa, Rogério, Cristiano, Gilberto (o livre pensador), Everthon, Thyago, Adriano, Tarlei, Fernando (japa) por todo o companheirismo em todos os momentos, pelas risadas, conversas, assumindo o papel de um irmão.

Paula, Claudia Ferraz, Simone, Claudia, Rosana, Cristina, a partir de um ciclo de amizade nos tornamos uma família.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, o Gilbertinho “giba”, Flávia, Andressa, Bruno, Priscila, Carlos “piá”, Marcela, Polyana, Wellison, Juliana, Marina, vocês foram fundamentais.

A todos os meus familiares e amigos.

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

EDYJOELSON PHELIPE DE MORAIS LUNA, filho de Antonio Gomes de Luna e Maria de Fátima de Moraes Luna, nasceu no município de Cupira-Pernambuco, em 23 de setembro 1992. Ingressou em 2007 no ensino médio integral na Escola de Referência em Ensino Médio de Panelas – EREMPA, obtendo a certificação em 2009. Ingressou no curso de Zootecnia no ano de 2010, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE/ UAG, obtendo o diploma de Bacharel em Zootecnia em janeiro de 2016, onde desenvolveu diversas atividades como monitor, projetos de extensão, iniciação científica, publicações, encerrando o curso com o estágio na Embrapa Pecuária Sudeste e entre outros trabalhos. Em março de 2016, ingressou no mestrado em Ciência Animal e Pastagens na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, concentrando seus estudos na linha de pesquisa produção animal e mudanças climáticas, cujo parte do projeto foi desenvolvido em parceria com a Embrapa Pecuária Sudeste, tendo em 28 de fevereiro de 2018, submetido à defesa da dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal e Pastagens.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA	17
CAPÍTULO 1	22
IDENTIFICAÇÃO DE miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO EM MUSCULAR <i>Bos Indicus</i>	22
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Seleção dos animais e fenótipo	25
1.1 Extração de RNA e preparo das bibliotecas.....	26
1.2 Sequenciamento e análise dos dados.....	26
1.3 Identificação dos miRNAs diferencialmente expressos (DE).....	27
1.4 Identificação dos genes alvo e análise de enriquecimento funcional.....	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
2. Animais, grupo fenotípico e controle de qualidade dos dados do sequenciamento ..	27
2.1 Identificação dos miRNAs diferencialmente expressos (DE) e identificação dos genes-alvo	28
2.2 Enriquecimento funcional, processos e vias biológicas	32
CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
ANEXOS.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Volcano Plot do log₂Fold change (eixo x) versus valor de log₋₁₀ (FDR-corrigido, eixo-y) valores de expressão para os grupos de alto e baixo GEBV para área de olho de lombo em novilhos Nelore com FDR 5%. 31
- Figura 2.** Correlações entre os níveis de expressão dos miRNAs e dos genes DE. 34
- Figura 3.** Representação gráfica das interações entre os miRNAs e os genes DE construída no Cytoscape a partir dos dados do enriquecimento. A cor vermelha representa os miRNA Dow-regulated e a cor verde “up-regulated” no grupo baixo em comparação ao alto, as linhas e as cores atribuídas aos genes são meramente ilustrativas. 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Identificação dos animais, valores fenotípicos e valores genômicos estimados (GEBV) para área de olho de lombo (AOL)..... 30
- Tabela 2.** miRNAs diferencialmente expressos com seus valores de *LogFchange*, *p*adj e a quantidade de genes alvos encontrados pelo targetscan, miRNANDA e que são expressos em músculo (FDR 0,05)..... 32
- Tabela 3.** Processos biológicos significativos (FDR<0,05) dos miRNAs diferencialmente expressos da área de olho de lombo e seus respectivos alvos..... 38

RESUMO

LUNA, Edyjoelson Phelipe de Moraes. **PERFIL DA EXPRESSÃO DE microRNAs EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE CONTRASTANTES PARA MEDIDAS DE ÁREA DE OLHO DE LOMBO**. Defesa – 2018. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A qualidade da carne e a produtividade são fatores econômicos importantes na pecuária de corte. Nesse cenário, o entendimento da regulação da expressão gênica relacionada com área de olho de lombo (AOL) contribuirá para o aprimoramento da eficiência produtiva e particularmente, para a compreensão do papel dos miRNAs na regulação da expressão gênica em bovinos. Objetivou-se identificar e verificar a influência dos miRNAs no desenvolvimento muscular em bovinos da raça Nelore. Para tanto, foram selecionados 12 animais extremos para os valores genéticos genômicos preditos (GEBV) para AOL, divididos em dois grupos iguais (alto e baixo GEBV-AOL). A partir do músculo *Longissimus dorsi* (LD) fez-se a extração dos miRNAs a partir do RNA total e o sequenciamento global. Os programas miRDeep2 e Deseq2 foram adotadas para predição e identificação dos miRNAs diferencialmente expressos. Diante da metodologia adotada, foram identificados 20 miRNAs diferencialmente expressos (DE), dos quais três foram classificados com “up-regulated” e 17 como “down-regulated” nos animais do grupo baixo para AOL, obtivemos 47 genes DE alvos desses miRNAs. Dentre as vias biológicas identificadas, destacaram-se, a via de sinalização de insulina, desta forma, disponibilizando mais glicose para o metabolismo proteico, metabolismo do fosfato, catabolismo de moléculas, regulação dos mecanismos celulares pela modificação de macromoléculas. Portanto, contribui para compreensão dos mecanismos biológicos que controlam o desenvolvimento muscular.

Palavras-chave: *Bos indicus*, AOL, RNA, Bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro, UFRPE/UAG. Coorientadora: Prof^ª Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano Embrapa Pecuária Sudeste

LUNA, Edyjoelson Phelipe de Morais. **EXPRESSION PROFILE OF microRNAs IN NELORE BREED ANIMALS CONTRASTANTS FOR ribeye area MEASURES.** Defense - 2018 (Master of Animal Science and Pastures) - Rural Federal University of Pernambuco.

ABSTRACT

Meat quality and productivity are important economic factors in beef cattle. In this scenario, understanding the regulation of gene expression related to ribeye area (REA) will contribute to the improvement of the productive efficiency and particularly to the understanding of the role of miRNAs in the regulation of gene expression in cattle. The objective was to identify and verify the influence of miRNAs on muscle development in Nelore cattle. For this purpose, 12 extreme animals were selected for the predicted genomic genetic values (GEBV) for REA, divided into two equal groups (high and low GEBV-REA). From the *Longissimus dorsi* (LD) muscle the miRNAs were extracted from the total RNA and the global sequencing. The miRDeep2 and Deseq2 programs were adopted for the prediction and identification of differentially expressed miRNAs. In view of the adopted methodology, 20 differentially expressed miRNAs (SD), of which three were classified as up-regulated and 17 as down-regulated in the animals of the low AOL group, obtained 47 SD genes from these miRNAs. Among the identified biological pathways, the insulin signaling pathway was highlighted, thus providing more glucose for protein metabolism, phosphate metabolism, catabolism of molecules, regulation of cellular mechanisms by the modification of macromolecules. Therefore, it contributes to understanding the biological mechanisms that control muscle development.

Keywords: *Bos indicus*, REA, RNA, Bioinformatics

Advisor: Prof. Dr. Kleber Régis Santoro, UFRPE/UAG. Coadvisor: Prof^a Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano Embrapa Pecuária Sudeste

INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte é uma das principais atividades da pecuária nacional, conferindo ao Brasil a posição de maior rebanho comercial e um dos maiores produtores de carne bovina do mundo, com 209,13 milhões de cabeças e produção de 9,56 milhões de toneladas, respectivamente. Desta forma, chegando a representar 14% da produção mundial, a receita da venda interna de carne, em 2015, movimentou mais de R\$ 90 bilhões e as exportações chegaram a R\$ 19,49 bilhões (ABIEC, 2016). Segundo o Ministério da Agricultura, até 2020, a expectativa é que a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado mundial, com o Brasil ocupando posição de destaque no ranking de países exportadores de carne bovina. Cerca de 80% do rebanho bovino nacional é constituído de animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) e seus mestiços, destacando-se a raça Nelore devido à sua adaptabilidade a ambientes tropicais e rusticidade (ABIEC, 2015).

Apesar das vantagens quanto à adaptabilidade e rusticidade, os animais Nelore apresentam menores rendimentos de carcaça e produzem carne de menor qualidade, quando comparados aos animais de origem taurina (*Bos taurus*) (BONIN et al., 2014). Esses são fatores que influenciam a rentabilidade da indústria e têm sido alvo de estudos a fim de beneficiar produtores e consumidores (LU et al., 2013). Dentre os parâmetros adotados para determinar o grau de rendimento da carcaça, a área de olho de lombo (AOL) tem sido amplamente adotada como indicador do grau de musculosidade e de composição de carcaça (MEIRELLES et al., 2011). De herdabilidade moderada ($h^2=0,27$, TIZIOTO et al., 2013), a AOL é uma característica quantitativa de mensuração tardia no ciclo produtivo, resultando em um atraso na identificação de animais superiores antes que eles possam ser amplamente utilizados (LU et al., 2013; NALAILA et al., 2011).

Sabendo-se que fatores genéticos e ambientais afetam as características produtivas e morfológicas do músculo esquelético, os avanços genômicos têm permitido quantificar o potencial genético dos animais precocemente, além de predizer a contribuição do ambiente na determinação fenotípica (MUCHENJE et al., 2009). Utilizando uma população de animais Nelore gerada pelo projeto em rede intitulado “Estratégias genéticas para produção de carne bovina de qualidade” ou Rede de pesquisa BifeQuali, Tizioto et al. (2013) identificaram seis regiões de QTLs que tiveram maior efeito para AOL, dos quais um desses também afeta força de cisalhamento do músculo *Longissimus dorsi*.

Com relação à contribuição genética, é sabido que o desenvolvimento do músculo esquelético é um complexo processo no qual estão envolvidos vários genes responsáveis pelo correto crescimento, proliferação e diferenciação de células musculares (HORAK et al., 2016). Como parte dessa complexa rede de desenvolvimento, os miRNAs têm emergido como uma nova dimensão na regulação pós-transcricional, geralmente reprimindo a tradução de genes alvo (KOVANDA et al., 2014).

Portanto, este estudo busca entender os mecanismos biológicos que contribuem para a regulação do desenvolvimento muscular em bovinos nelore e sua potencial relação com vias associadas aos miRNAs e os genes diferencialmente expressos (DE) alvo, identificando genes, miRNAs e vias metabólicas biologicamente importantes para hipertrofia muscular que atuam efetivamente na regulação da área de olho de lombo (AOL).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo o Ministério da Agricultura, as previsões são de que as exportações brasileiras de carne bovina representem cerca de 60% do comércio mundial nos anos 2018/2019. A carne é caracterizada pela composição comestível da carcaça, composta principalmente de músculo esquelético e de quantidades variáveis de tecido conjuntivo, pequenas quantidades de tecido epitelial e tecido nervoso, responsáveis pelas características qualitativas e quantitativas deste alimento (LUCHIARI FILHO, 2000). O que chega à mesa do consumidor é o rendimento de carcaça na forma dos cortes comerciais, tal rendimento é uma característica importante para os frigoríficos, uma vez que o valor do produto final depende das proporções de músculo, gordura, e ossos dos animais, já os custos com mão-de-obra serão praticamente os mesmos, independentemente se a carcaça tem maior ou menor rendimento (RESTLE ET AL., 2000). A determinação do rendimento de cortes comerciais é tarefa que a indústria considera difícil e interfere nas atividades rotineiras do processamento (SOUZA, 2012). Dentre estas características, a musculosidade associada ao maior rendimento de carcaça, assume uma posição de destaque. Considerada o impacto econômico em consequência do aumento da produtividade (ABIEC, 2016).

Conhecer os fatores genéticos e ambientais afetam as características produtivas e morfológicas do músculo esquelético, auxiliam na compreensão deste fenótipo e com os avanços em genômica têm permitido quantificar o potencial genético dos animais precocemente, além de predizer a contribuição do ambiente na determinação fenotípica (MUCHENJE et al., 2009). Com relação à contribuição genética, é sabido que o desenvolvimento do músculo esquelético é um complexo processo no qual estão envolvidos vários genes responsáveis pelo correto crescimento, proliferação e diferenciação de células musculares (HORAK et al., 2016). Dessa forma, estão sendo realizados estudos do genoma e transcriptoma, particularmente dos microRNAs, com o objetivo de aperfeiçoar o entendimento dos mecanismos genéticos e biológicos envolvidos nessa complexa característica.

Os miRNAs (microRNAs) constituem uma família de RNAs não codificadores pequenos, com ~22 nucleotídeos. Essas moléculas reconhecem e se ligam a sítios parcialmente complementares na região 3' UTR (*untranslated region*) de transcritos alvo, desempenhando um importante papel na regulação gênica pós-transcricional, por meio da degradação ou pela repressão da tradução dos mRNAs em mamíferos. Os microRNAs são altamente conservados,

de nematoides a bovinos e humanos (COUTINHO et al., 2007), e a eles são associados vários importantes processos biológicos, que incluem o desenvolvimento tecidual, apoptose e alterações epigenéticas.

Estudos recentes têm destacado que alguns miRNAs são exclusivos ou preferencialmente expressos no músculo (*myomiRs*) e governam processos chave da miogênese, tais como remodelagem do tipo de fibra muscular, crescimento e atrofia (HORAK et al., 2016; KOVANDA et al., 2014). Em estudos realizados com bovinos de corte, foram verificadas variações no padrão expresso de miRNAs nos animais com diferentes espessuras de gordura subcutânea, desta forma, atribuindo papel regulador aos miRNAs no desenvolvimento do tecido adiposo e metabolismo de gordura (ROMÃO et al., 2014). Corroborando com esse trabalho, estudos realizados por Mia et al., (2016) apontam miRNAs no desenvolvimento muscular em suínos. Do mesmo modo, Lee et al. (2017) identificaram miRNAs associados à formação de fibra muscular e aumento da produção de carne em bovinos.

Envolvidos na regulação de vários processos biológicos os miRNAs participam de processos nos como a proliferação celular, diferenciação, neurogênese, angiogênese e apoptose (BARTEL, 2004). Estudo realizados com animais de produção, demonstram que os microRNAs participam de processos que regulam o desenvolvimento embrionário, funções do músculo esquelético, do tecido adiposo, do tecido mamário e do tecido imune (COUTINHO et al., 2007; CUPP et al., 2009), atuando dessa forma no controle de várias características de elevada importância econômica.

O estudo de genes que são alvejados por microRNAs, localizados em regiões intergênicas ou íntrons de genes codificadores de proteínas são transcritos pela RNA-polimerase como precursores longos, produzindo os microRNAs primários (primicroRNAs) (BARTEL, 2004). Todos esses processos ocorrem no núcleo pela ação do complexo microprocessador Drosha-DGCR8, com a participação da enzima endonuclease tipo III, (Drosha). Desta forma ocorre a formação do primeiro microRNA ainda não maduro, (pré-microRNAs), de aproximadamente 60 a 70 nucleotídeos (nt), os quais apresentam uma estrutura do tipo *hairpin* (LEE et al., 2003; KIM, 2005).

Os miRNAs para concluir sua formação são liberados para o citoplasma por uma Ran-GTP e pelo receptor de exportação Exportina-5 (YI et al., 2003), onde são clivados pela RNase III Dicer para formar RNAs de cadeia dupla (HUTVAGNER et al., 2001). Após isto, uma das cadeias é selecionada e incorporada no complexo proteico RISC (do

inglês, *RNA-induced silencing complex*) tornando-se assim um microRNA maduro que pode exercer a sua função de silenciamento gênico (KHVOROVA et al., 2003).

Os microRNAs podem regular a expressão do seu RNA mensageiro (RNAm) alvo por meio de dois mecanismos pós-transcricionais dependendo do grau de complementariedade com a região 3'UTR do RNAm alvo. Estes dois mecanismos consistem na clivagem do RNAm e na repressão da tradução (BARTEL, 2004). Uma complementariedade imperfeita conduz à repressão da tradução enquanto que uma complementariedade perfeita ou quase perfeita leva à clivagem do mRNA.

Em animais a complementariedade é geralmente imperfeita e assim o principal mecanismo de atuação dos microRNAs é por meio da inibição da tradução (ZENG et al., 2002), interferindo diretamente nos fatores de iniciação da tradução ou perturbando a função da cauda poli-A (GEBAUER; HENTZE, 2004). Uma última maneira de atuação do microRNA para regular a expressão do RNAm é por meio do processo de deadenilação da cauda poli-A do RNAm. Animais como o *Danio rerio* (peixe paulistinha ou zebrafish) são um dos exemplares que apresentam este mecanismo de ação.

Estudos anteriores demonstraram que os microRNAs desempenham um papel importante na miogênese e desenvolvimento muscular, além de ter grande impacto sobre a massa muscular, tipo de fibra muscular e doenças relacionadas com os músculos (SOKOL, 2012; LUO et al., 2013). Muitos microRNAs como o miR-1 e miR-133, são músculo-específicos e estão envolvidos na modulação da proliferação do músculo (CHEN et al., 2006). Encontram-se participando de processos biológicos como a diferenciação, proliferação, apoptose e homeostase (BARTEL, 2004), sugerindo desta maneira, o papel regulatório destas moléculas no desenvolvimento do tecido muscular da carne bovina.

Este trabalho, além de pretender contribuir com a identificação desse conjunto, abrangente de microRNAs, considerando que isto facilitará o nosso entendimento da organização do genoma bovino, sua biologia e evolução (GLAZOV et al., 2009; LEE et al. 2017), procura identificar também quais microRNAs são ativos em um determinado conjunto de condições experimentais de maneira a mudar o padrão no ambiente celular dinâmico e intervir no controle do desenvolvimento muscular, conseqüentemente, interferindo na Área de Olho de Lombo (AOL).

- Hipótese

A hipertrofia muscular em animais é regulada por miRNAs que atuam nas vias biológicas de desenvolvimento muscular.

- Objetivos

***Geral**

Identificar miRNAs diferencialmente expressos entre animais com valores genéticos contrastantes para área de olho de lombo, a fim de compreender os potenciais mecanismos biológicos de regulação do desenvolvimento muscular em bovinos da raça Nelore.

***Específicos**

- Identificar miRNAs diferencialmente expressos entre animais divergentes para AOL;
- Identificar genes-alvo de miRNAs expressos no músculo e potenciais mecanismos regulatórios;
- Verificar o papel de regulação dos miRNAs para vias biológicas associadas a AOL;

CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Exportação da carne bovina em 2014 é recorde com US\$ 7,2 bilhões. 2015. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/boi-gordo/exportacaocarne-bovina-2014-recorde-com-bilhoes-54427>>. Acesso em: 01 out. 2016.

BONIN, T., CHILSON, P., ZIELKE, B. ET AL. **Ciência Rural, Santa Maria** v.44 , n. 10 1860:1866, 2014.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

MCDANELD, T.G. MicroRNA: Mechanism of Gene Regulation and Application to Livestock. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. E21-E28,2009.

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

COUTINHO, L.L.; MATUKUMALLI, L.K.; SONSTEGARD, et al. Discovery and Profiling of Bovine microRNAs from Immune-Related and Embryonic Tissues. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 29, n.1, p. 35-43, 2007.

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

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

GLAZOV, E.A.; KONGSUWAN, K.; ASSAVALAPSAKUL, et al. Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. **PloS one**, London, v. 4, n. 7, p. e6349. 2009.

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

KOVANDA A., REZEN T., ROGELJ B. (2014). **MicroRNA in skeletal muscle development, growth, atrophy, and disease**. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 5, 509–525. 10.1002/wrna.1227.

HORAK FB, KLUZIK J, HLAVACKA F. Velocity-dependence of Vestibular Information for Postural Control on Tilting Surfaces. **Journal of Neurophysiology**. jn.00057.2016. PMID 27486101 DOI: 10.1152/jn.00057.2016.

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

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

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; et al. . The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, London, v.425, n. 6956, p. 415–419, 2003.

LEE, S., PARK, S. J., CHEONG J. K., KO, J. Y., BONG. J. & BAIK, M. 2017. Identification of circulating miRNA involved in meat yield of Korean cattle. **Cell. Biol. Int.** 41(7):761-768.

LU J, ET AL. (2013) Deletion of the major peroxiredoxin Tsa1 alters telomere length homeostasis. **Aging Cell Journal Article**. Research Support, N.I.H., Intramural. 12(4):635-44

LUCHIARI, FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. 1. ed. São Paulo: LinBife. 2000.

LUO, W.; NIE, Q.; ZHANG, X. MicroRNAs involved in skeletal muscle differentiation. **Journal of Genetics and Genomics**, Beijing, v. 40, n. 3, p. 107-116, 2013.

MCDANELD, T.G. **MicroRNA: Mechanism of Gene Regulation and Application to Livestock**. *Journal of Animal Science*, Albany, v. 87, p. E21-E28, 2009.

MEIRELLES, S. L., GOUVEIA, G. V., GASPARIN, G., et al. (2011). Candidate gene region for control of rib eye area in Canchim beef cattle. **Genetics and Molecular Research : GMR**, 10(2), 1220–1226. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1175>.

MIA, ET AL. The Spatiotemporal Dynamics of Oscillatory Activity in Humans Across Micro, Meso, and Macro Scales Working paper, **Harvard Medical School** (2016).

MUCHENJE, V. et al. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: **A review. Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 279–289, jan. 2009.

NALAILA SM., STOTHARD P., MOORE SS., WANG Z., & LI C. 2011. Whole genome fine mapping of quantitative trait loci for ultrasound and carcass merit traits in beef cattle. **Can J Anim Sci**. 91:61–73.

NALAILA SM., STOTHARD P., MOORE SS., WANG Z., & LI C. 2011. Whole genome fine mapping of quantitative trait loci for ultrasound and carcass merit traits in beef cattle. **Can J Anim Sci**. 91:61–73.

RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C.; FATURI, C.; et al. Desempenho na fase de crescimento de machos bovinos inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, BRA, v. 29, n. 4, p. 1036-1043, Jul./Ago. 2000.

ROMÃO JM, JIN W, ELE H, MCALLISTER T, GUAN LL: MicroRNAs em adipogênese bovino: contexto genômico, expressão e função. **BMC Genomics** 2014, 15 (1): 137.

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

SOUZA, J. L. F. Estimativa do rendimento da porção comestível em bovinos Nelore utilizando medidas obtidas por análise de imagem na região da quinta costela. 2012. 60 f. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo**, Pirassununga, 2012.

TIZIOTO, P. C.; DECKER, J. E. ; TAYLOR, J. F. ; SCHNABEL, R. D. et al. 2013. A genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. *Physiological Genomics (Print)*, p. 1012-1020.

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

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

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO DE miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ASSOCIADOS
AO DESENVOLVIMENTO EM MUSCULAR *Bos Indicus*

(Artigo Científico)

(Normas da Revista Caatinga)

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO DE miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO EM MUSCULAR *Bos Indicus*

RESUMO

O entendimento da regulação da expressão gênica relacionada com AOL contribuirá para o aprimoramento da eficiência produtiva. Trabalhos publicados vêm atribuindo um importante papel dos miRNAs na regulação da expressão gênica em bovinos. Neste estudo, objetivou-se identificar e verificar a influência dos miRNAs no desenvolvimento muscular. Foram utilizados 12 animais divididos em grupos baixo e alto para GEBV para AOL. A partir do músculo *Longissimus dorsi* (LD) fez-se a extração dos miRNAs do RNA total. Realizado o sequenciamento pelo equipamento MiSeq usando os ciclos MiSeq Reagent Kit V3 150. Realizado o controle de qualidade dos dados, os programas miRDeep2 e Deseq2 utilizando genomas de referência e o genoma do *Bos Taurus* UMD3.1, obteve-se a identificação dos miRNAs diferencialmente expressos totalizando 20 miRNAs DE e seus respectivos genes alvo diferencialmente expressos em músculo. Encontrados 47 genes DE alvos, após as filtragens pelos programas TargetScan e MiRNANDA, foi realizado o enriquecimento funcional pelo programa WebGstalt que possibilitou identificar as vias e os processos que os miRNAs e os genes estão relacionados, os quais estão envolvidos no processo miogênese, turnover protéico, via de sinalização da insulina, fatores de crescimento, diferenciação da fibra muscular. Desta forma, contribui para compreensão dos mecanismos biológicos que atuam no desenvolvimento muscular, consequentemente interferindo no rendimento de carcaça.

Palavras-chave: *Bos indicus*, expressão miRNA, Área de Olho de Lombo

CHAPTER 1

IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED MEMBERS ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT IN MUSCLE *Bos Indicus*

ABSTRACT

Understanding the regulation of gene expression related to AOL will contribute to the improvement of productive efficiency. Published works have attributed an important role of miRNAs in the regulation of gene expression in cattle. In this study, we aimed to identify and verify the influence of miRNAs on muscle development. We used 12 animals divided into low and high groups for GEBV to AOL, muscle the miRNAs were extracted from the total RNA extracted from L. dorsi samples and sequenced by the MiSeq equipment using the MiSeq Reagent Kit V3 150 cycles. The data quality control, the miRDeep2 and Deseq2 programs using reference genomes and the Bos Taurus UMD3.1 genome were obtained by identifying the differentially expressed miRNAs totaling 20 SD miRNAs and their respective target genes differentially expressed in muscle. A total of 47 target genes were screened after TargetScan and MiRNANDA filtering. Functional enrichment was performed by the WebGstalt program to identify the pathways and processes that the miRNAs and genes are related to, which are involved in the myogeny process, protein turnover, insulin signaling pathway, growth factors, muscle fiber differentiation. Therefore, it contributes to the understanding of the biological mechanisms that act on the muscular development, consequently interfering in the carcass yield.

Keywords: *Bos indicus*, *miRNA expression*, *ribeye area*

INTRODUÇÃO

Parâmetro representativo do rendimento de carcaça, a área de olho de lombo (AOL) é a área da secção transversal do músculo *L. dorsi*, entre a 12^a e 13^a costelas, que é amplamente aceita e utilizada como parâmetro de desenvolvimento muscular (LUCHIARI FILHO, 2000). Com relação à regulação genética desta característica, é sabido que o desenvolvimento do músculo esquelético é um complexo que envolve vários genes, responsáveis pelo crescimento, proliferação e diferenciação de células musculares (HORAK et al., 2016). Como parte dessa complexa rede de desenvolvimento, os miRNAs têm emergido como uma nova dimensão na regulação pós-transcricional, geralmente reprimindo a tradução de genes alvos (KOVANDA et al., 2014). Além do complexo papel regulatório dos miRNAs, alguns miRNAs são exclusivos ou preferencialmente expressos no músculo (*myomiRs*) e participam de processos chave da miogênese, desenvolvimento muscular, tais como remodelagem do tipo de fibra muscular, crescimento e atrofia (HORAK et al., 2016; KOVANDA et al., 2014).

Os avanços nos estudos de associação genômica em larga escala por meio de *chips* de alta densidade, conhecidos como *Genome Wide Association Studies* (GWAS), e o surgimento de novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração (NGS), vem permitindo a identificação de regiões genômicas de interesse (SNELLING et al., 2010). Com o NGS, informações mais precisas dos níveis de transcrição, por análise de RNA-Seq são possíveis para a identificação de genes diferencialmente expressos, variações resultantes de *splicing* alternativos e a identificação de novos transcritos (MARIONI et al., 2008), e pelo sequenciamento dos miRNAs o melhor entendimento do seu papel na regulação gênica.

Os miRNAs são moléculas compostas por ~22 nucleotídeos, classificados como pequenos RNAs não codificadores que modulam a expressão gênica. Os miRNAs atuam principalmente na regulação gênica na fase pós-transcricional, degradando ou reprimindo a tradução do mRNAs-alvo (BARTEL, 2004; MCDANELD, 2009). Embora seja esse o principal mecanismo de ação, estudos recentes têm demonstrado outras formas de regulação dos miRNAs sobre os genes alvo, dentre essas, a regulação positiva miRNA-mRNA (ORANG; SAFARALIZADEH; KAZEMZADEH-BAVILI, 2014; CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016). Tal fato pode ser explicado pela competição pelo sítio de ligação do mRNA-miRNA, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados em microRNA (miR-SNPs), sítios de microRNA-alvo (miR-TS-SNPs)

ou em proteínas codificantes de genes envolvidos na biogênese do microRNA, podendo resultar em diferenças fenotípicas que afetam características de produção e susceptibilidade a doenças (GEORGES et al., 2007).

Moléculas de miRNAs podem simultaneamente regular vários genes e afetar um amplo espectro de processos celulares como miogênese e adipogênese (AN et al., 2014; DAVIS; CLARKE, 2013). Em animais domésticos, tem sido demonstrado que os miRNAs são importantes reguladores do desenvolvimento embrionário e do músculo esquelético, tecido adiposo e tecido mamário (CUPP et al., 2009; LAWLESS et al., 2014). Corroborando com esse trabalho, estudos realizados por Mia et al., (2016) apontam que miRNAs estão envolvidos no desenvolvimento muscular em suínos. Do mesmo modo, Lee et al. (2017) identificaram miRNAs associados à formação de fibra muscular e aumento da produção de carne em bovinos.

Embora alguns estudos em bovinos avaliando o perfil global de expressão de myomiRs tenham contribuído para entender parâmetros do desenvolvimento muscular (LEE et al., 2017), tal conhecimento é, ainda, incipiente principalmente para *Bos indicus*. A fim de preencher parte dessa lacuna, o presente estudo buscou identificar os miRNAs diferencialmente expressos (DE) do músculo *Longissimus dorsi* em bovinos, bem como identificar os genes alvo que participam da regulação do desenvolvimento muscular.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos com os animais e análises laboratoriais foram aprovados pelo comitê de ética da Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, São Paulo, Brasil.

1. Seleção dos animais e fenótipo

Foram utilizados trezentos e oitenta e cinco (385) animais da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), São Carlos – SP, produzidos entre 2009 e 2011. A população utilizada é composta por meios-irmãos descendentes de 34 touros registrados da raça Nelore que foram selecionados de forma a representar as principais genealogias do Brasil. Durante o experimento, os animais permaneceram sob as mesmas condições alimentares e de manejo, sendo levados para o confinamento aos 21 meses, como descrito por Tizioto et al. (2012). Os animais foram abatidos com idade média de 25 meses em um frigorífico comercial na cidade de Bariri (SP) e após o abate, foram realizadas coletadas de

amostras do músculo *Longissimus dorsi* (LD), na porção entre a 12^a e 13^a costelas, para avaliação do rendimento de carcaça. Todo o processo de abate foi supervisionado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e dentro dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

As amostras do músculo LD foram coletadas da meia carcaça direita, colocadas em nitrogênio líquido para o transporte e armazenadas em freezer -80°C até o processamento. As amostras coletadas da meia carcaça esquerda, foram utilizadas para obtenção das medidas da área de olho de lombo (AOL/cm²), obtidas por meio de papel milimetrado (*grid*) (RIBEIRO et al., 2002; PINHEIRO, 2007).

Foram utilizados 385 animais para as estimativas do GEBV para AOL. Os animais foram ranqueados a partir do GEBV. Os animais extremos foram escolhidos (seis de cada extremo- GEBV alto e baixo) e foram sequenciados. Além disso, esses mesmos animais foram utilizados em um estudo prévio de mRNA diferencialmente expressos (VIGNATO et al., 2017).

1.1 Extração de RNA e preparo das bibliotecas

Para extração do RNA total, foi utilizado 100 mg do tecido que foram pulverizados em nitrogênio líquido e destinados à extração com Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A quantificação do material extraído foi realizada por espectrofotometria, utilizando o equipamento *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific Wilmington Delaware E.U.A.*) e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

1.2 Sequenciamento e análise dos dados

As bibliotecas de sequenciamento foram geradas utilizando o *Kit TruSeq SmallRNA* (*Illumina* – San Diego, EUA). A concentração das bibliotecas de cDNA foi determinada com o *KAPA Library Quantification Kit* (*KAPA Biosystems*). Os adaptadores específicos ligam-se às amostras por hibridização, de acordo com o protocolo descrito pela *Illumina*. As amostras foram submetidas ao sequenciamento, no equipamento *Illumina MiSeq*, utilizando o *MiSeq Reagent Kit v3*, 150 ciclos. O controle de qualidade, remoção das sequências de baixa qualidade e dos adaptadores da *Illumina*, foram realizadas por meio do

software *FastQC* (ANDREWS, 2010) e *Cutadapt* (MARTIN, 2011), das quais as *Reads* de qualidade inferior a 30 na escala *Phred* foram removidas.

1.3 Identificação dos miRNAs diferencialmente expressos (DE)

O programa *miRDeep2* identificou e quantificou novos e conhecidos miRNAs por meio do mapeamento contra o genoma de referência bovino (*Bos taurus UMD 3.1*) (FRIEDLÄNDER et al., 2012). Os miRNAs diferencialmente expressos (DE, FDR <0,05) entre os grupos alto e baixo GEBV foram determinados pelo pacote DESeq2 do programa R. O programa remove as variações provenientes da preparação das bibliotecas e normaliza os dados de expressão pelo tamanho da biblioteca (LOVE et al., 2014). O método de Benjamini-Hochberg (BH) foi utilizado para controlar a taxa de falsas descobertas (FDR < 0,05).

1.4 Identificação dos genes alvo e análise de enriquecimento funcional

A predição dos genes-alvo dos miRNAs DE foi realizada por meio dos programas TargetScan v.7.1 (AGARWAL et al. 2015) (<http://www.targetscan.org/>) e do miRNANDA data base (www.microrna.org/), sendo filtrados para os alvos comuns a ambos. Estudos de RNA-Seq com AOL utilizando os mesmos animais foram realizados previamente (VIGNATO et al., 2017) o que permitiu verificar se os genes-alvo estavam expressos em músculo, bem como, se os genes DE previamente identificados eram alvos dos miRNAs identificados no presente trabalho.

A anotação funcional dos genes-alvo foi realizada pelo programa *WebGestalt* que integra vários bancos de dados, tem ampla cobertura de categorias funcionais em vários contextos biológicos, incluindo a ontologia de genes, processos e vias biológicas (WANG et al., 2013). Esta ferramenta permitiu identificar os processos biológicos e vias metabólicas que os genes-alvo estão envolvidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. Animais, grupo fenotípico e controle de qualidade dos dados do sequenciamento

Os miRNAs têm importante papel regulatório na expressão gênica, podendo regular cerca de 60% dos genes do animal (CATALANOTTO; COGONI; ZARDO, 2016). Como

visto na literatura, os miRNAs participam de diversos processos biológicos relacionados ao desenvolvimento muscular. No presente trabalho foram identificadas variações na expressão de miRNAs associados ao desenvolvimento muscular em novilhos Nelore.

As médias referentes aos valores de GEBV para AOL e medida direta da AOL para os grupos alto e baixo foram, respectivamente, 3,47 e 71,87 (cm²) e -3,42 e 49,58 (cm²) como publicado anteriormente por Tizioto et. (2012). As leituras do sequenciamento por amostra, foram altas, desta forma comprovando a qualidade do sequenciamento dos dados (Tabela 1).

Tabela 1 Identificação dos animais, valores fenotípicos e valores genômicos estimados (GEBV) para área de olho de lombo (AOL).

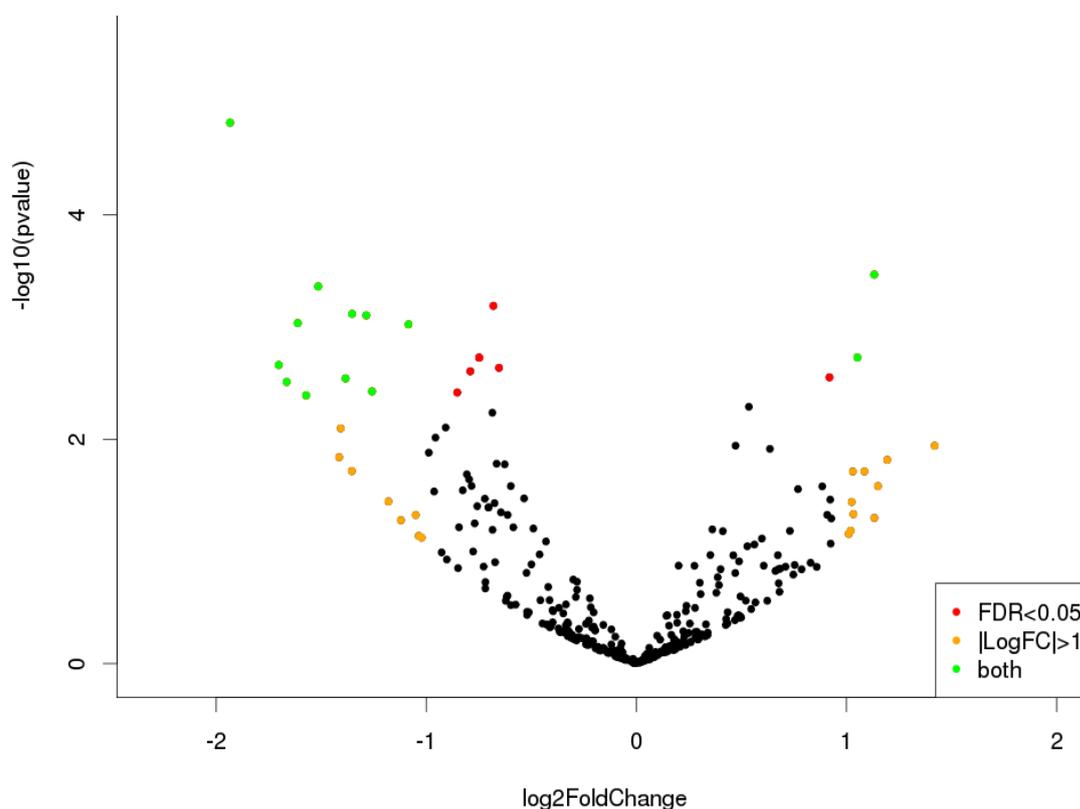
Animal	Categoria B _{AOL}	Medida de AOL	GEBV	Leitura sequenciamento
1	Alto	73,25	3,22	88,5
2	Alto	79,75	3,47	78,2
3	Alto	72,00	4,71	85,8
4	Alto	73,25	2,92	79,7
5	Alto	66,20	3,22	85,7
6	Alto	66,75	3,26	85,8
Média – B _{AOL}		71,87	3,47	
7	Baixo	48,50	3,54	86,6
8	Baixo	52,00	2,92	94,1
9	Baixo	50,75	3,88	79,1
10	Baixo	42,50	3,45	73,8
11	Baixo	51,25	2,79	93,5
12	Baixo	52,50	3,95	86,2
Média – A _{AOL}	A _{AOL}	49,58	3,42	

2.1 Identificação dos miRNAs diferencialmente expressos (DE) e identificação dos genes-alvo

Os softwares miRdeep2 e DESeq2, respectivamente, foram adotados para a identificação dos miRNAs e determinação daqueles DE. A partir da análise de 421 miRNAs conhecidos e mantidos após os parâmetros de qualidade do DESeq2, foram identificados 20 miRNAs DE, dos quais 17 miRNAs DE como “down-regulated” e três “up-regulated” para os animais do grupo baixo GEBV (Tabela 2). Valores negativos e positivos de *fold change* indicam, respectivamente, uma menor e maior expressão dos miRNAs nos animais

do grupo baixo GEBV. Os pontos a esquerda (Figura 1) são os miRNAs “up-regulated” e a direita os “dow-regulated” para o GEBV do grupo baixo para AOL (Figura 1).

Figura 1. Volcano Plot do log₂Fold change (eixo x) versus valor de log₋₁₀ (FDR-corrigido, eixo-y) valores de expressão para os grupos de alto e baixo GEBV para área de olho de lombo em novilhos Nelore com FDR 5%.



Os genes-alvo dos miRNAs DE foram preditos utilizando os softwares TargetScan v.7.1 e miRNANDA, obtendo inicialmente, para todos os miRNAs, 24.685 genes alvo (Tabela 2), filtraram-se os genes comuns para ambos os bancos de dados. Posteriormente, a partir dos dados de RNA-Seq previamente obtidos pelo trabalho de Vignato et al., (2017), que utilizou os mesmos animais, foram filtrados os genes alvo expressos em músculos. Após os filtros obtivemos um total de 16.345 genes alvo. Considerando a lista de alvos preditos para os miRNAs DE e também os genes DE identificados previamente por Vignato et al. (2017), verificamos que 47 genes DE para AOL são alvos dos miRNAs DE (Tabela 2).

Tabela 2. miRNAs diferencialmente expressos com seus valores de LogFchange, padj e a quantidade de genes alvos encontrados pelo targetscan, miRNANDA e que são expressos em músculo (FDR 0,05).

miRNA	log2 FoldChange	padj	Genes Alvo Targetscan	Genes Alvo miRNANDA	Expressos Músculo
Up-regulated					
bta-miR-338	1,2324	0,0264	360	269	240
bta-miR-374b	1,1637	0,0367	609	464	409
bta-miR-361	0,9956	0,0433	233	173	154
Down-regulated					
bta-miR-411 ^a	-3,2762	0,0000	114	85	80
bta-miR-126-5p	-2,3685	0,0017	3555	2699	2420
bta-miR-101	-1,1893	0,0291	788	596	548
bta-miR-136	-1,5815	0,0291	268	194	169
bta-miR-22-3p	-1,4694	0,0291	494	372	336
bta-miR-331-3p	-1,8212	0,0291	195	146	130
bta-miR-660	-0,702	0,0291	1724	1316	1142
bta-miR-193a-3p	-2,1224	0,0367	228	162	152
bta-miR-2284x	-0,7838	0,0367	4266	3210	2768
bta-miR-2284y	-0,7838	0,0367	3476	2606	2286
bta-miR-21-5p	-0,6781	0,0414	318	241	229
bta-miR-532	-0,8352	0,0416	190	132	125
bta-miR-497	-1,74	0,0449	1199	904	823
bta-miR-126-3p	-0,9169	0,0526	28	19	19
bta-miR-210	-2,8871	0,0544	2201	1673	1460
bta-miR-99a-3p	-1,5192	0,0544	1091	841	725
bta-miR-142-3p	-2,8371	0,0549	3348	2496	2130

Estudos realizados por Sun et al. (2014) identificaram que as concentrações do mir-2284x que está associado ao crescimento e desenvolvimento muscular, foram maiores no estágio fetal. Neste trabalho identificamos este miRNA com “down-regulated” no grupo baixo GEBV, ou seja, possivelmente pode estar reprimindo a expressão dos seus genes alvo relacionados com o desenvolvimento muscular.

Segundo Goel, Manning e Kumar (2015) a proteína NEDD4L, o gene referente à esta proteína em nossos achados é alvejado pelo bta-2284x, que tem a função de se ligar e regular várias proteínas da membrana celular para ajudar na sua internalização e turnover protéico. Somando-se a função de internalização de proteínas, a NEDD4L faz parte do complexo de regulação e sinalização do IGF-1R (factor de crescimento semelhante à insulina, tipo 1) (CAO et al., 2008; MONAMI; EMILIOZZI; MORRIONE, 2008).

Os genes MAX e EYA2 atuam na sinalização da via MAPK (p valor < 0,1) para a via de sinalização REA: MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (bta04010) e via de endocitose (bta04144). Na análise de enriquecimento realizada pelo WebGestalt para o gene MAX, três processos biológicos significativos (FDR 5%) foram identificados para AOL: resposta ao estresse do retículo endoplasmático (GO: 0034976), processo de modificação de proteína celular (GO: 0006464) e modificação da macromolécula (GO: 0043412). Já o gene EYA2 participa na via MAPK, tal via é responsável pela transdução de sinais extracelulares para seus alvos intracelulares em várias células, incluindo células do músculo esquelético. Este caminho funciona no controle de processos celulares fundamentais, como proliferação, crescimento, migração, diferenciação, apoptose e, mais especificamente, células musculares, hipertrofia (MARTINEAU, 1985; CHAKRABORTY, 2016). De acordo com Noordman, Jansen e Hendriks (2006) a via MAPK é o principal mecanismo utilizado por fatores de crescimento em processos como a proliferação celular e diferenciação.

Embora a interação prevista miRNA-alvo seja a repressão do alvo, estudos recentes têm demonstrado que interações positivas são mais comuns que o esperado. Estudos realizados por Lopez-Gomollon et al., (2012) apontam que outros mecanismos podem interferir nesta relação e estão atuando sobre a regulação desses miRNA-Alvo. Além disso, Orang et al. (2014) destacam que mecanismos diretos e indiretos podem atuar no aumento da expressão dos genes alvo mediada por miRNA.

Verificamos, em sua maioria, os resultados das correlações foram positivos entre as expressões dos miRNAs e genes alvos. O UBE4A (célula precursora neural regulada pelo desenvolvimento proteína ubiquitina ligase) origina proteínas ubiquitina-ligases, dentre as funções desta proteína está a de auxiliar na internalização de outras proteínas nas células (CAO et al., 2008; GOEL; MANNING; KUMAR, 2015; MONAMI; EMILIOZZI; MORRIONE, 2008).) Os genes UBE4A e NEDD4 são um dos genes DE alvo dos btas-mir-2284y, mir-497, mir-126-3 (via de sinalização MAPK, processo de modificação de

proteínas, regulação positiva da importação de glicose em resposta ao estímulo de insulina). Os quais há relação positiva (Tabela 4) com o gene USP38 (ubiquitina peptidase 38) que é um gene de codificação de proteínas presente no músculo. Entre suas vias relacionadas, estão a proteólise dependente de proteínas de ubiquitina que é alvejado pelos bta-mir-2284x e 2284y, tais miRNAs atuam no processo de modificação da proteína e via de sinalização MAPK. Encontramos também relações negativas, como FBXO32 gene que codifica um membro da família da proteína F-box das proteínas que constituem uma das quatro subunidades do complexo da proteína ligase (regulação do processo biosintético das macromoléculas), bta-mir-338 relacionado com regulação do processo de biosintético das macromoléculas, mir-331-3p via de sinalização MAPK.

2.2 Enriquecimento funcional, processos e vias biológicas

Os 16.345 genes-alvo dos miRNAs DE identificados possibilitou identificar processos biológicos e vias metabólicas relacionados ao desenvolvimento muscular. Obtivemos após o enriquecimento, uma grande quantidade de informações desta interação miRNA-Alvo, ressaltando algumas, foram significativamente enriquecidas, as vias regulação da expressão gênica, processo de modificação da proteína celular, regulação positiva do processo metabólico do RNA, importação de glicose em resposta ao estímulo de insulina, via sinalização MAPK e insulina.

Dos 20 miRNAs identificados apenas três não foram enriquecidos, bta-mir-411a, bta-mir-331-3p e bta-mir-361. Desta forma 17 miRNAs, três up-regulated e 14 down-regulated, foram associados a 47 genes DE expressos em músculo. De acordo com os genes DE identificados por Vignato et al. (2017) em no presente trabalho foi encontrado como gene DE o MSH2 como alvo dos bta-mir-361, bta-mir-660, bta-mir-21-5p e bta-mir-210. Os miRNAs tem relação na regulação dos genes diferencialmente expressos, onde em muitos casos os genes DE são alvejados por vários miRNAs, como é o caso do gene UBE4 que está ligado com o processo de ubiquitinação, fosforilação, desfosforilação na síntese proteica e é alvejado por quatro miRNAs, como também verificamos que o mesmo miRNA, pode alvejar diversos genes como o caso do bta-mir-142-3p que alveja mais de 14 genes DE (Figura 3).

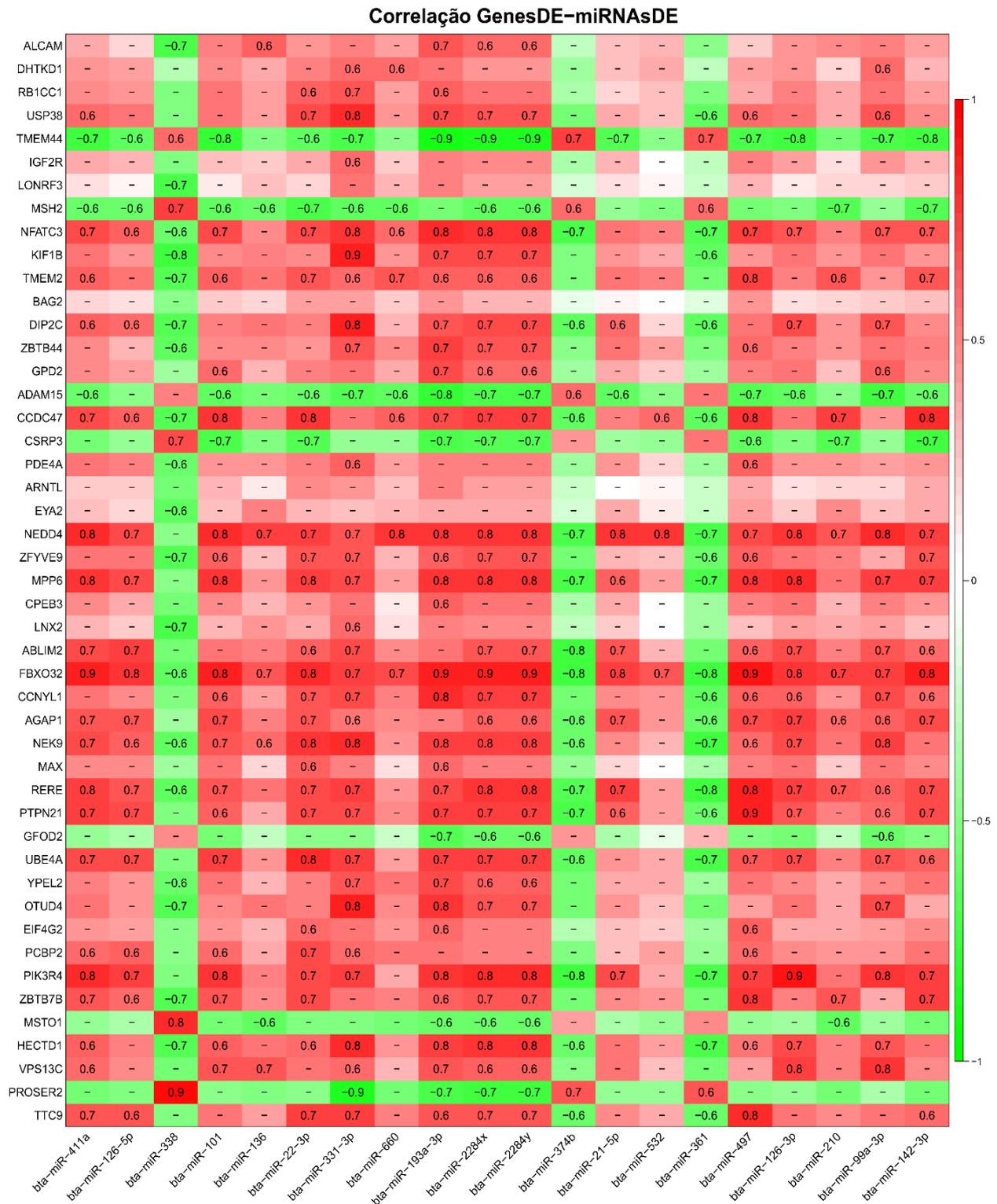
O miRNA bta-mir-338 que está “up-regulated” no grupo baixo para AOL, alveja o gene UBE4A (ubiquitina factor de conjugação E4 A) que está “down-reguled” para o mesmo grupo, regulando negativamente a expressão no grupo baixo, este gene é importante

nos processos de ubiquitinação. Após realizada filtragem para identificação dos genes diferencialmente expressos alvejados por miRNAs, possivelmente estão regulando a expressão gênica, foram encontrados 20 genes diferencialmente expressos, dos quais foram associados sua participação no desenvolvimento muscular e com FDR=0,05. Alguns dos genes DE alvos obtidos foram USP38, GPD2, EYA2, NEDD4, LNX2, NEK9, MAX e PTPN21. Com base na anotação funcional, em destaque os genes NEDD4, MAX e EYA2 desempenham função em processos biológicos e KEGG que estão mais envolvidos com o desenvolvimento muscular.

Na análise de correlação verificamos que a maioria dos pares (miRNA-gene-alvo DE) apresentaram correlação positiva (Figura 2). Embora outros mecanismos possam estar atuando sobre a regulação desses genes alvo, estudos recentes têm demonstrado que correlações positivas são mais comuns que o esperado (LOPEZ-GOMOLLON et al., 2012). De acordo com Lopez-Gomollon et al. (2012), a interação miRNA-alvo pode ser modificada temporalmente e de acordo com o alvo. Além disso, Orang et al. (2014) destacam que mecanismos diretos e indiretos podem atuar na regulação dos genes-alvo mediada por miRNAs. Embora a forma clássica de interação miRNA-mRNA (gene), seja nos sentidos opostos de expressão (negativo), encontramos a maioria das correlações positivas (diretamente proporcional) entre níveis de expressão dos miRNA e dos genes, verificamos que dos 17 miRNAs DE tem relação positiva e 3 miRNAs tem correlação negativa com os genes DE.

Dentre os miRNAs encontrados e suas respectivas vias biológicas, tais miRNAs se destacaram por participarem de processos diretamente ligados ao desenvolvimento muscular (Tabela 3), o bta-mir-210 (processo de modificação de proteínas), mir-374b (regulação positiva do processo metabólico celular), mir-2284y (regulação da expressão gênica), mir-497 (regulação positiva dos processos metabólicos), mir-126-3 (importação de glicose em resposta ao estímulo de insulina), mir-338 (regulação do processo biossintético das macromoléculas) e mir-142-3p (regulação do processo de desenvolvimento celular).

Figura 2. Correlações entre os níveis de expressão dos miRNAs e dos genes DE.



*As células, coloridas com base na intensidade da correlação de acordo com a cor da legenda, contêm o valor de correlação correspondente, sendo representadas apenas aquelas cujo p-valor é significativo ($p < 0.05$).

Figura 3. Representação gráfica das interações entre os miRNAs e os genes DE construída no Cytoscape a partir dos dados do enriquecimento. A cor vermelha representa os miRNA Down-regulated e a cor verde “up-regulated” no grupo baixo em comparação ao alto, as linhas e as cores atribuídas aos genes são meramente ilustrativas.

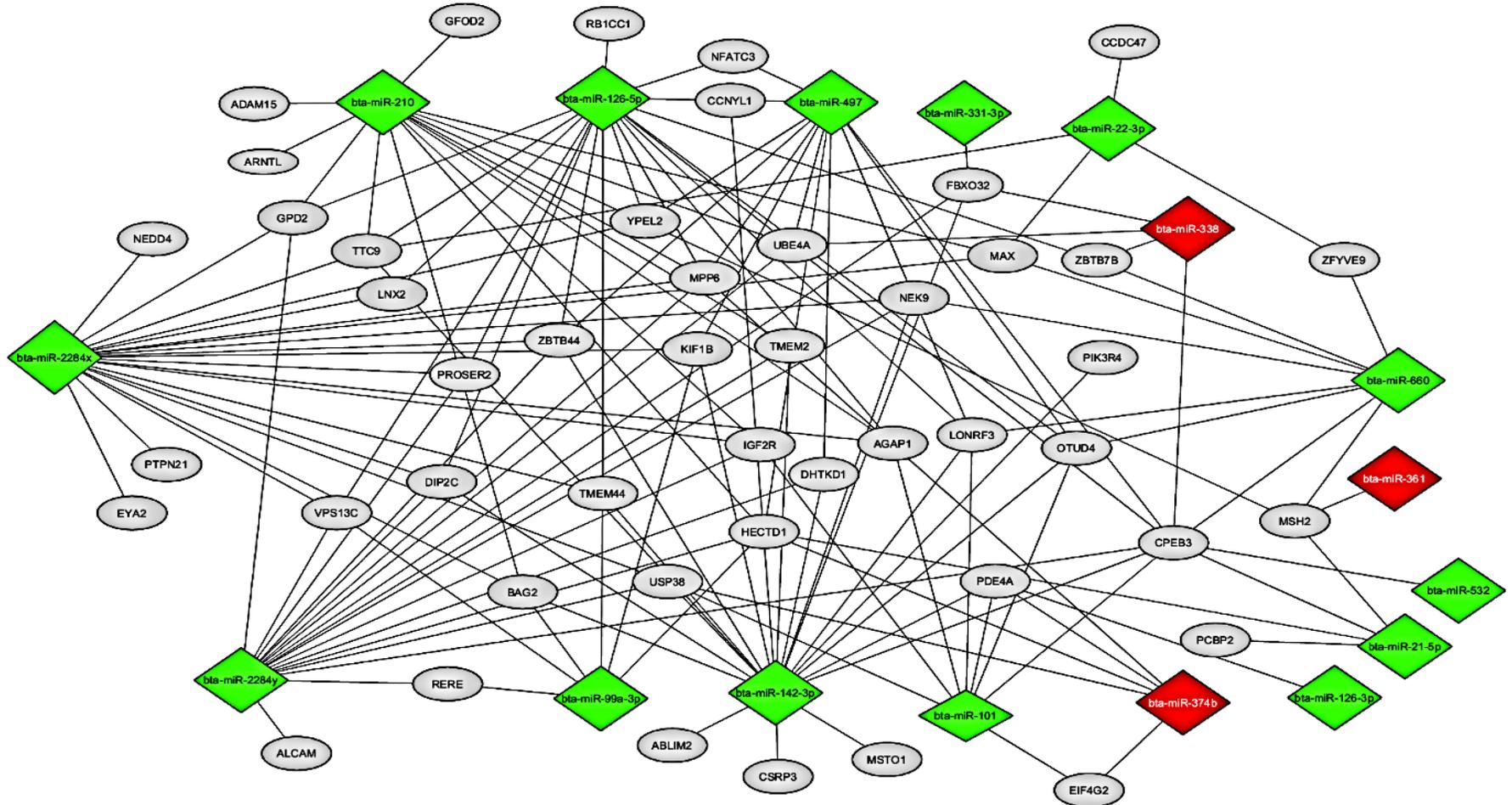


Tabela 3. Processos biológicos significativos (FDR<0,05) dos miRNAs diferencialmente expressos para AOL e seus respectivos alvos.

GO	Descrição	p-ajust. ³	Genes
bta-miR-126-5p	Processo de modificação da proteína celular Via de sinalização da insulina	0,00000002	<i>ALCAM, RB1CC1, TMEM44, LONRF3, NFATC3, DIP2C, ZBTB44, GPD2, PDE4A, MPP6, CPEB3, LNX2, CCNYL1, AGAP1, YPEL2, OTUD4 e ZBTB7B</i>
bta-miR-338	Modificação de proteína por conjugação ou remoção de pequenas proteínas	0,00033979	<i>CPEB3, FBXO32, UBE4A e ZBTB7B</i>
bta-miR-101	Regulação negativa do processo metabólico das macromoléculas Via de sinalização PI3K-Akt	0,00094933	<i>USP38, IGF2R, LONRF, PDE4A, CPEB3, AGAP1, OTUD4 e EIF4G2</i>
bta-miR-2284x	Via de sinalização da MAPK	0,00189166	<i>USP38, TMEM44, IGF2R, KIF1B, BAG2, DIP2C, ZBTB44, GPD2, EYA2, NEDD4, MPP6, LNX2, AGAP1, NEK9, MAX, PTPN21, YPEL2, VPS13C, PROSER2 e TTC9</i>
bta-miR-2284y	Regulação da expressão gênica Resistência à insulina	0,00189166	<i>ALCAM, DHTKD1, USP38, TMEM2, IGF2R, DIP2C, ZBTB44, GPD2, FBXO32, CPEB3 e MPP6, NEK9 RERE UBE4A HECTD1 VPS13C PROSER2</i>
bta-miR-497	Regulação positiva do processo metabólico das macromoléculas via de sinalização FoxO via de sinalização de insulina	0,00308622	<i>DHTKD1, LONRF3, NFATC3, KIF1B, ZBTB44, MPP6, CPEB3, CCNYL1, NEK9, UBE4A, YPEL2, OTUD4 e HECTD1</i>
bta-miR-210	Via de sinalização de esfingolipídios	0,00443558	<i>IGF2R, MSH2, TMEM2, BAG2, GPD2, ADAM15, ARNTL, MPP6, AGAP1, MAX, GFOD2, UBE4A, HECTD1 e TTC9</i>
bta-miR-142-3p	Regulação da atividade transferase Via de sinalização de hormônios da tireoide	0,00471582	<i>DHTKD1, USP38, TMEM44, LONRF3, KIF1B, TMEM2, BAG2, DIP2C, ZBTB44, CSRP3, PDE4A, CPEB3, ABLIM2, FBXO32, CCNYL1, NEK9, OTUD4, PIK3R4, MSTO1 e TTC9</i>

*Identificação do termo Gene Ontology (GO); ²p-valor ajustado a uma taxa de falsos positivos de 5% (FDR). Análise realizada WebGestalt.

CONCLUSÕES

A variação da expressão gênica no músculo está associada à mudanças na expressão dos seus respectivos genes, assim como aqueles relacionados ao crescimento, desenvolvimento e proliferação celular. O estudo aponta mais um mecanismo de regulação da expressão gênica, os microRNAs, que podem modular a expressão dos genes ligados à área de olho de lombo.

REFERÊNCIAS

AGARWAL M, et al., 2015. Role of Ctf3 and COMA subcomplexes in meiosis: Implication in maintaining Cse4 at the centromere and numeric spindle poles. **Biochim Biophys Acta** 1853(3):671-84.

ANDREWS, S, 2010: FastQC: A quality control tool for High Throughput Sequence Data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

AN, J. H. et al. Changes of microRNA profile and microRNA-mRNA regulatory network in bones of ovariectomized mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 3, p. 644–656, 2014.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell, Cambridge**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

CAO XR, LILL NL, BOASE N, SHI PP, CROUCHER DR, SHAN H, et al. Nedd4 controls animal growth by regulating IGF-1 signaling. **Sci Signal**. 2008;1(38).

CATALANOTTO, C.; COGONI, C.; ZARDO, G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1712, 13 out. 2016.

CHAKRABORTY C, SHARMA AR, PATRA BC, BHATTACHARYA M, SHARMA G, LEE SS. MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronicmyeloid leukemia. **Oncotarget**. 2016;7(27):42683–97.

CUPP, A.S. et al. Cell Biology Symposium: The role of miRNA in cell function. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 14, p. E19-E20, 2009.

DAVIS, M.; CLARKE, S. Influence of microRNA on the maintenance of human iron metabolism. **Nutrients**, v. 5, p. 2611–2628, 2013.

FRIEDLÄNDER, MR; Chen, W; Adamidi, C; Maaskola, J; Einspanier, R; Knespel, S; Rajewsky, N, 2008. Discovering microRNAs from Deep Sequencing Data Using miRDeep. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 4, p. 407–415.

GEORGES, M. et al. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.17, p.166–176, 2007.

Goel P, Manning JA, Kumar S. NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. **Gene**. 2015;557(1):1–10.

HORAK FB, KLUZIK J, HLAVACKA F. **Velocity-dependence of Vestibular Information for Postural Control on Tilting Surfaces**. Journal of Neurophysiology. jn.00057.2016. PMID 27486101 DOI: 10.1152/jn.00057.2016.

KOVANDA A., REZEN T., ROGELJ B. (2014). MicroRNA in skeletal muscle development, growth, atrophy, and disease. **Wiley Interdiscip. Rev. RNA** 5, 509–525. 10.1002/wrna.1227.

LAWLESS, N. et al. The Role of miRNAs in Bovine Infection and Immunity. **Front Immunol.**, v. 27, n.5, p.611, 2014.

LEE, S., PARK, S. J., CHEONG J. K., KO, J. Y., BONG. J. & BAIK, M. 2017. Identification of circulating miRNA involved in meat yield of Korean cattle. **Cell. Biol. Int.** 41(7):761-768 .

LOPEZ-GOMOLLON S, MOHORIANU I, SZITTYA G, MOULTON V, DALMAY T, 2012. Diverse correlation patterns between microRNAs and their targets during tomato fruit development indicates different modes of microRNA actions. *Planta*.;236:1875–1887.

LOVE MI, HUBER W AND ANDERS S (2014). “Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.” **Genome Biology**, 15, pp. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

LUCHIARI, FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. 1. ed. São Paulo: LinBife. 2000.

MARTIN M, 2011. **Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads**. EMBnet Journal 17:10–12.

- MARTINEAU LC, GARDINER PF. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. **J Appl Physiol** (1985). 2001;91(2):693–702.
- MARIONI, J.C. et al. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, v. 18, n. 9, p. 1509-1517, 2008.
- MCDANELD, T.G. MicroRNA: Mechanism of Gene Regulation and Application to Livestock. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. E21-E28,2009.
- MEIRELLES, S. L. et al. Candidate gene region for control of rib eye area in Canchim beef cattle. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 2, p. 1220–1226, 2011.
- MCDANELD, T.G. MicroRNA: Mechanism of Gene Regulation and Application to Livestock. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, p. E21-E28,2009.
- MIA, ET AL. The Spatiotemporal Dynamics of Oscillatory Activity in Humans Across Micro, Meso, and Macro Scales Working paper, **Harvard Medical School** (2016).
- MONAMI G, EMILIOZZI V, MORRIONE A. Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. **J Cell Physiol**. 2008;216(2):426–37.
- MUCHENJE, V. et al. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: **A review. Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 279–289, jan. 2009.
- NOORDMAN YE, JANSEN PA, HENDRIKS WJ, 2006. Tyrosine-specific MAPK phosphatases and the control of ERK signaling in PC12 cells. **J Mol Signal**.;1:4.
- ORANG, A. V.; SAFARALIZADEH, R.; KAZEMZADEH-BAVILI, M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation **International Journal of Genomics** Hindawi Publishing Corporation, 2014.
- PINHEIRO, M.S.; POUHEY, J.L.O.F.; DEWANTIER, L.R.; GARCIA, C.A.N.; et al. Avaliação de carcaça de fêmeas e machos inteiros de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) criados em sistema semi-intensivo. **Archivos Latinoamericanos de Production Animal**, v. 15, n. 2, p. 52-57, 2007.

RESTLE, J.; ALVES FILHO, D. C.; FATURI, C.; ROSA, J. R. P.; PASCOAL, L. L.; BERNARDES, R. A. C.; KUSS, F. Desempenho na fase de crescimento de machos bovinos inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, BRA, v. 29, n. 4, p. 1036-1043, Jul./Ago. 2000.

SNELLING, W.M. et al. How SNP chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement females. **Journal Animal Science.**, v.90, p.1152-1165. 2012.

SUN J, ZHOU Y, CAI H, LAN X, LEI C, ZHAO X, et al. Discovery of novel and differentially expressed MicroRNAs between fetal and adult Backfat in cattle. **PLoS One**. 2014.

RIBEIRO, F.G.; LEME, P.R.; BULLE, M.L.; et al. Características da carcaça e qualidade da carne de tourinhos alimentados com dietas de alta energia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 749-756, 2002.

TIZIOTO, PC, MEIRELLES, SL, VENERONI, GB, et al, 2012. A SNP in ASAP1 gene is associated with meat quality and production traits in Nelore breed. **Meat Science**, 92 (4): 855-857.

VIGNATO, B.S., COUTINHO, LL, CESAR, ASM, et al, 2017. Comparative muscle transcriptome associated with carcass traits of Nellore cattle. **BMC Genomics**, 18(1), 506.

WANG, J., DUNCAN, D., SHI, Z., ZHANG, B, 2013. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt). **Nucleic Acids Res**, 41 (Web Server issue), W77-83.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo tentou alcançar a melhor compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na variação do fenótipo área de olho de lombo apontados pelos estudos de análise de associação e RNA-Seq. Para tanto, estudos mais detalhados das vias metabólicas e como esses miRNAs atuam na regulação faz-se necessário para complementariedade desse estudo. Portanto, com a identificação de miRNAs em tecido muscular com potencial efeito na regulação da expressão de genes que influenciam a característica de AOL contribui para o melhor entendimento dos mecanismos que controlam essa característica.

ANEXOS

1. Material Suplementar
2. Normas da Revista Caatinga

Análise miRNA extremos

1. Rodar FASTQC:

2. Cutadapt or FASTX quality filter: arquivos.result

```
cutadapt -m 14 -M 25 --max-n 0 -o ${file}/fastq/filtered.fq} $file
```

3. mapear e criar os arquivos reads_collapsed.fa e reads_vs_genome.arf

```
mapper.pl config.txt -d -e -h -j -l 18 -m -p ../../databases/bovine/GENOME/Bos_taurus -s  
reads_collapsed20.fa -t reads_vs_genome20.arf -v -n
```

4. rodar miRDeep2

```
miRDeep2.pl  
reads_collapsed20.fa ../../databases/bovine/GENOME/Bos_taurus reads_vs_genome20.ar  
f ../../databases/bovine/miRNA/Bos_taurismature.fa  
../../databases/bovine/miRNA/Closespeciesmature.fa ../../databases/bovine/miRNA/Bos_t  
aurusHairpin.fa -t bta 2 > report.log
```

Exemplo de config.txt

```
{identificador de três letras} {nome ou caminho do arquivo fastq}
```

```
H01 NE000123.filtered.fq  
H02 NE000124.filtered.fq  
H03 NE000125.filtered.fq  
H04 NE000126.filtered.fq  
L01 NE000127.filtered.fq  
L02 NE000128.filtered.fq
```

```
L03 NE000129.filtered.fq
L04 NE000130.filtered.fq
```

```
## Running DESeq2
#####Aline Cesar ##### Feb/2015
##### Adapted October/2017 # Coppini
```

```
## Install DESeq2
```

```
# source("http://bioconductor.org/biocLite.R")
# biocLite("DESeq2")
```

```
## Set your working directory
setwd("miRNA/Seqs/DESeq2")
```

```
## load DeSeq package
library("DESeq2")
```

```
## read count table
cnt<-read.table("Expression.csv", head=T, row.names="miRNA") #your expression
matrix file in place of `Expression.csv`
```

```
head(cnt)
```

```
dim(cnt)
```

```
## total counts per gene
Totalcounts<-rowSums(cnt)
```

```
## histogram of total counts (log-scale)
png("HistogramTotalCounts.png", 1200, 1000, pointsize=20)
hist(log(Totalcounts, 10), main="", xlab="Total Counts log10 scale", col="lightblue")
dev.off()
hist(log(Totalcounts, 10), main="", xlab="Total Counts log10 scale", col="lightblue")
```

```
## genes with zero count?
table(Totalcounts==0)
```

```
## filter genes with 0 counts
rm<-rowMeans(cnt)==0
cnt<-cnt[!rm,]
dim(cnt)
```

```
## filter genes that don't have counts for at least 20% of samples, meaning that more than
20% of the samples have 0 counts. In order to do this, the maximum number of 0s in the
row can't be more than one fifth (20%) of the total number of samples.
```

```
dim(cnt)
zeroCutoff <- ceiling(ncol(cnt)/5)
numZeros <- mapply(1:nrow(cnt), FUN = Vectorize( function(j) length(which(cnt[j,] ==
0 )) ))
```

```

nzIndex <- which(numZeros>zeroCutoff)
length(nzIndex)
if(length(nzIndex) > 0) {
  cnt.number.zeros.filtered <- cnt[-nzIndex,]
} else {cnt.number.zeros.filtered <- cnt; print( "NO samples to remove!")}

dim(cnt.number.zeros.filtered) #now cnt.number.zero filters is the previous nvc filtered
for number of samples with zero counts for a gene

cnt <- cnt.number.zeros.filtered
dim(cnt)

## histogram of filtered counts (log-scale)
FilteredCounts<-rowSums(cnt)
png("HistogramFilteredCounts.png", 1200, 1000, pointsize=20)
hist(log(FilteredCounts, 10), main="", xlab="Filtered Counts log10 scale",
col="lightblue")
dev.off()
hist(log(FilteredCounts, 10), main="", xlab="Filtered Counts log10 scale",
col="lightblue")

## read phenotype file with description of samples
colData<-read.csv("list.txt", head=T) #your phenotype file in the place of `list.txt`.
colData

## Reading the phenotypic data and defining the model

colData$Group <- factor(colData$Group)
dds<-DESeqDataSetFromMatrix(countData=cnt, colData=colData, design=~Group)

### Differential expression analysis

## run standard differential analysis: 1) estimate size factors, 2) estimate dispersions, 3)
run Wald tests
dds<-DESeq(dds)

dds <- DESeq(dds, betaPrior=FALSE)

## access results
res<-results(dds)
mcols(res, use.names=TRUE)
res<-res[order(res$padj),]
head(res, 10)

## Merge with normalized count data
resdata <- merge(as.data.frame(res), as.data.frame(counts(dds, normalized=TRUE)),
by="row.names", sort=FALSE)
names(resdata)[1] <- "miRNA"
head(resdata)
## Write results

```

```

write.table(resdata, file="diffexpr-results.csv", sep="\t")

## individual steps of normalization
dds <- estimateSizeFactors(dds)
dds <- estimateDispersions(dds)
dds <- nbinomWaldTest(dds)

counts(dds, normalized=T)

write.table(counts(dds,normalized=T),file="normalized_counts.tsv",sep="\t")

## MA plot
plotMA(dds)

plotMA(dds, main="DESeq2", ylim=c(-2,2))

## Plot sample graphics
library("RColorBrewer")
library("gplots")
library("calibrate")

## MA plot
plotMA(dds)

plotMA(dds, main="DESeq2", ylim=c(-2,2))
png(filename="MA.png")
plotMA(dds, main="DESeq2", ylim=c(-2,2))
dev.off()

## Plot sample graphics
# library("RColorBrewer")
# library("gplots")
select<- order(rowMeans(counts(dds, normalized=TRUE)), decreasing=TRUE)[1:30]
hmcol<-colorRampPalette(brewer.pal(9, "GnBu"))(100)

plotDispEsts( dds, ylim = c(1e-6, 1e1) )

hist( res$pvalue, breaks=20, col="grey" )

ddsBlind<-dds #criando novo objeto
design(ddsBlind)<-formula(~Group)
ddsBlind<-estimateDispersions(ddsBlind)
rld<-rlogTransformation(ddsBlind)
vsd<-varianceStabilizingTransformation(ddsBlind)

par( mfrow = c( 1, 2 ) )
plot( log2( 1+counts(dds, normalized=TRUE)[, 1:2] ), col="#00000020", pch=20,
cex=0.3 )
plot( assay(rld)[, 1:2], col="#00000020", pch=20, cex=0.3 )

```

```

png(filename="PlotSample.png")
plot( assay(rld)[, 1:2], col="#00000020", pch=20, cex=0.3 )
dev.off()

```

```

## Heatmap (sample distance)
sampleDists <- dist( t( assay(rld) ) )
sampleDistMatrix <- as.matrix( sampleDists )
rownames(sampleDistMatrix) <- paste(rld$Group, sep="-" )
colnames(sampleDistMatrix) <- NULL
library( "gplots" )
library( "RColorBrewer" )
colours = colorRampPalette( rev(brewer.pal(9, "Blues")) )(255)
heatmap.2( sampleDistMatrix, trace="none", col=colours)
png(filename="Heatmap_sample_distance.png")
heatmap.2( sampleDistMatrix, trace="none", col=colours)
dev.off()

```

```

## Heatmap
heatmap.2(counts(dds, normalized=TRUE) [select, ], col=hmcol, Rowv=FALSE,
Colv=FALSE, scale="none", dendrogram="none", trace="none", margin=c(10, 6))
heatmap.2(assay(rld) [select, ], col=hmcol, Rowv=FALSE, Colv=FALSE, scale="none",
dendrogram="none", trace="none", margin=c(10, 6))
heatmap.2(assay(vsd) [select, ], col=hmcol, Rowv=FALSE, Colv=FALSE, scale="none",
dendrogram="none", trace="none", margin=c(10, 6))
png(filename="Heatmap.png")
heatmap.2(assay(vsd) [select, ], col=hmcol, Rowv=FALSE, Colv=FALSE, scale="none",
dendrogram="none", trace="none", margin=c(10, 6))
dev.off()

```

```

## PCA
# library("gplots")
print(plotPCA(vsd, intgroup=c("Group")))
png(filename="PCA.png")
print(plotPCA(vsd, intgroup=c("Group")))
dev.off()

```

```

## Volcano plot with "significant" genes labeled
# library("gplots")
# library("calibrate")
volcanoplot <- function (res, lfcthresh=2, sigthresh=0.10, main="Volcano Plot",
legendpos="bottomright", labelsig=TRUE, textcx=1, ...) {
  with(res, plot(log2FoldChange, -log10(pvalue), pch=20, main=main, ...))
  with(subset(res, padj<sigthresh ), points(log2FoldChange, -log10(pvalue), pch=20,
col="red", ...))
  with(subset(res, abs(log2FoldChange)>lfcthresh), points(log2FoldChange, -
log10(pvalue), pch=20, col="orange", ...))
  with(subset(res, padj<sigthresh & abs(log2FoldChange)>lfcthresh),
points(log2FoldChange, -log10(pvalue), pch=20, col="green", ...))
  if (labelsig) {

```

```

require(calibrate)
with(subset(res, padj<sigthresh & abs(log2FoldChange)>lfcthresh),
textxy(log2FoldChange, -log10(pvalue), labs=miRNA, cex=textcx, ...))
}
legend(legendpos, xjust=1, yjust=1, legend=c(paste("FDR<",sigthresh,sep=""),
paste("|LogFC|>",lfcthresh,sep=""), "both"), pch=20, col=c("red","orange","green"))
}
png("VolcanoPlot.png", 1200, 1000, pointsize=20)
volcanoplot(resdata, lfcthresh=1, sigthresh=0.10, textcx=.8, xlim=c(-2.3, 2))
dev.off()
volcanoplot(resdata, lfcthresh=1, sigthresh=0.10, textcx=.8, xlim=c(-2.3, 2))

```

Tabela 1. Genes alvo DE de miRNAs diferencialmente expressos em animais divergentes para AOL que haviam sido descritos como DE para o mesmo fenótipo por Vignato et al. (2017), log2FC seus respectivos mirRNA alvos e os sentidos de regulação "Upregulated /Dowregulated".

ID	Gene	DE log2FC ²	miRNA	Alvos log2FC ²	Up/Dow DE
ENSBTAG00000000088	<i>ALCAM</i>	-0.78	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
ENSBTAG00000000291	<i>DHTKDI</i>	-0.46	bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000000878	<i>RBICC1</i>	-0.32	bta-miR-126-5p	D	D
ENSBTAG00000001356	<i>USP38</i>	-0.43	bta-miR-101	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-374b	UP	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000002394	<i>TMEM44</i>	0,6	bta-miR-126-5p	D	UP
			bta-miR-2284x	D	UP
			bta-miR-99a-3p	D	UP
			bta-miR-142-3p	D	UP
ENSBTAG00000002402	<i>IGF2R</i>	-0.48	bta-miR-101	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-210	D	D
ENSBTAG00000002615	<i>LONRF3</i>	-0.54	bta-miR-126-5p	D	UP
			bta-miR-101	D	UP
			bta-miR-660	D	UP
			bta-miR-497	D	UP
			bta-miR-142-3p	D	UP

ENSBTAG00000002742	<i>MSH2</i>	0,58	bta-miR-660	D	UP
			bta-miR-21-5p	D	UP
			bta-miR-361	UP	UP
			bta-miR-210	D	UP
ENSBTAG00000004368	<i>NFATC3</i>	-0.60	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-497	D	D
ENSBTAG00000004966	<i>KIF1B</i>	-0.46	bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-99a-3p	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000005090	<i>TMEM2</i>	-0.56	bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-210	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000005355	<i>BAG2</i>	-0.56	bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-210	D	D
			bta-miR-99a-3p	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000006531	<i>DIP2C</i>	-0.40	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000009210	<i>ZBTB44</i>	-0.50	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000009770	<i>GPD2</i>	-0.57	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-210	D	D
ENSBTAG00000010663	<i>ADAM15</i>	0,46	bta-miR-210	D	UP
ENSBTAG00000011834	<i>CCDC47</i>	-0.33	bta-miR-22-3p	D	D
ENSBTAG00000011869	<i>CSRP3</i>	0,71	bta-miR-142-3p	D	UP
ENSBTAG00000012032	<i>PDE4A</i>	-0.44	bta-miR-101	D	D
			bta-miR-374b	UP	D
			bta-miR-126-3p	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000013029	<i>ARNTL</i>	-0.51	bta-miR-210	D	D
ENSBTAG00000013336	<i>EYA2</i>	-0.66	bta-miR-2284x	D	D
ENSBTAG00000013793	<i>NEDD4</i>	-0.54	bta-miR-2284x	D	D
ENSBTAG00000014289	<i>ZFYVE9</i>	-0.39	bta-miR-22-3p	D	D

			bta-miR-660	D	D
ENSBTAG00000015303	<i>MPP6</i>	-0.61	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-374b	UP	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-210	D	D
ENSBTAG00000015450	<i>CPEB3</i>	-0.49	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-338	UP	D
			bta-miR-101	D	D
			bta-miR-660	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-21-5p	D	D
			bta-miR-532	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000015614	<i>LNX2</i>	-0.60	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
ENSBTAG00000015926	<i>ABLIM2</i>	-0.34	bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000016194	<i>FBXO32</i>	-0.75	bta-miR-338	UP	D
			bta-miR-331-3p	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000016297	<i>CCNYL1</i>	-0.52	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000016504	<i>AGAPI</i>	-0.50	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-101	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-210	D	D
ENSBTAG00000016612	<i>NEK9</i>	-0.33	bta-miR-660	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000017994	<i>MAX</i>	-0.52	bta-miR-22-3p	D	D
			bta-miR-660	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-210	D	D
ENSBTAG00000018272	<i>RERE</i>	-0.47	bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-99a-3p	D	D
ENSBTAG00000018596	<i>PTPN21</i>	-0.52	bta-miR-2284x	D	D

ENSBTAG00000018908	<i>GFOD2</i>	0,49	bta-miR-210	D	UP
ENSBTAG00000019725	<i>UBE4A</i>	-0.44	bta-miR-338	UP	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-210	D	D
ENSBTAG00000019806	<i>YPEL2</i>	-0.49	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-497	D	D
ENSBTAG00000019857	<i>OTUD4</i>	-0.37	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-101	D	D
			bta-miR-660	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000020308	EIF4G2	-0.37	bta-miR-101	D	D
			bta-miR-374b	UP	D
ENSBTAG00000020757	<i>PCBP2</i>	-0.32	bta-miR-21-5p	D	D
ENSBTAG00000020787	<i>PIK3R4</i>	-0.36	bta-miR-142-3p	D	D
ENSBTAG00000021512	<i>ZBTB7B</i>	-0.50	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-338	UP	D
			bta-miR-660	D	D
ENSBTAG00000026613	<i>MSTO1</i>	0,48	bta-miR-142-3p	D	UP
ENSBTAG00000032477	<i>HECTD1</i>	-0.40	bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-374b	UP	D
			bta-miR-21-5p	D	D
			bta-miR-497	D	D
			bta-miR-210	D	D
			bta-miR-99a-3p	D	D
ENSBTAG00000038920	<i>VPS13C</i>	-0.57	bta-miR-126-5p	D	D
			bta-miR-2284x	D	D
			bta-miR-2284y	D	D
			bta-miR-99a-3p	D	D
ENSBTAG00000039571	<i>PROSER2</i>	0,63	bta-miR-126-5p	D	UP
			bta-miR-2284x	D	UP
			bta-miR-2284y	D	UP
ENSBTAG00000045604	<i>TTC9</i>	-0.50	bta-miR-126-5p	D	UP
			bta-miR-22-3p	D	UP
			bta-miR-2284x	D	UP
			bta-miR-210	D	UP
			bta-miR-142-3p	D	UP

2. Normas da Revista Caatinga

APRESENTAÇÃO E PREPARO DOS MANUSCRITOS

Os artigos submetidos à Revista Caatinga devem ser originais, ainda não relatados ou submetidos à publicação em outro periódico ou veículo de divulgação. **A Revista Caatinga publica ARTIGO, NOTA TÉCNICA E REVISÃO DE LITERATURA.**

FORMAS DE ENVIO

Os artigos são submetidos, apenas eletronicamente, na página da Revista Caatinga. Podem ser ENVIADOS em Português, Inglês ou Espanhol. Porém, após a aprovação do manuscrito pelo Comitê Editorial, o autor será contactado para traduzir o artigo para a língua inglesa. Caso o trabalho seja submetido em inglês, após a aprovação desse pelo comitê editorial, o autor será comunicado para que realize a revisão do idioma inglês. **A publicação será exclusivamente em Inglês.** Fica a critério do autor a escolha da empresa ou pessoa física que irá realizar a tradução do manuscrito. Porém, é **obrigatória** a realização da **REVISÃO do idioma inglês** por umas das empresas indicadas pela Revista Caatinga. Abaixo seguem as indicações:

<http://www.proof-reading-service.com> [http://www.academic-editing-](http://www.academic-editing-services.com/)

[services.com/ http://www.publicase.com.br/formulario.asp](http://www.publicase.com.br/formulario.asp)

<http://www.editage.com.br/manuscriptediting/index.html>

<http://www.journalexperts.com>

<http://www.webshop.elsevier.com/languageservices> [\[ops.com\]\(http://wsr-ops.com\)](http://wsr-</p></div><div data-bbox=)

<http://www.journaleditorsusa.com>

<http://www.queensenglishediting.com/>

<http://www.canalpage.com>

<http://www.stta.com.br/servicos.php>

<http://americanmanuscripteditors.com/> **PREPARO DO MANUSCRITO**

- **Digitação:** o texto deve ser composto em programa Word (DOC) ou compatível e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). Deve ter no máximo 20 páginas, tamanho A4, digitado com espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, estilo normal, tamanho 12 e parágrafo recuado por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. Páginas e linhas devem ser numeradas; os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita e as linhas numeradas de forma contínua. Se forem necessárias outras orientações, entre em contato com o Comitê Editorial. As Notas Técnicas devem apresentar até 12 páginas, incluindo tabelas e figuras.
- **Tamanho:** o manuscrito não deverá ultrapassar 2,0 MB.
- **Organização:** o artigo científico deverá ser organizado em título, nome do(s) autor(es), resumo, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos (opcional), e referências.

Título: deve ser escrito em maiúsculo, negrito, centralizado na página, no **máximo com 15 palavras**, não deve ter subtítulo e abreviações. O nome científico deve ser indicado no título apenas se a espécie for desconhecida. Os títulos das demais seções da estrutura (resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências) deverão ser escritos em letra maiúscula, negrito e justificado à esquerda.

Autores(es): nomes completos, sem abreviaturas, em letra maiúscula, um após o outro, separados por vírgula e centralizados. Essas informações deverão constar apenas na versão final do artigo. **Na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé com os endereços deverão ser omitidos.**

Para a inclusão do(s) nome(s) do(s) autor(es) e do(s) endereço(s) na **versão final do artigo** deve-se, como nota de rodapé na primeira página, indicar, para cada autor, afiliação completa (Unidade/Setor, Instituição, Cidade, Estado, País), endereço completo e e-mail de todos os autores. O autor correspondente deverá ser indicado por um “*”.

No rodapé devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências às instituições colaboradoras. Exemplo:

*Autor para correspondência

1

Recebido para publicação em xx/xx/xxxx ; aceito em xx/xx/xxxx.

Especificação (natureza) do trabalho (ex.: Pesquisa apoiada pela FAPESP e pelo CNPq; Trabalho de Mestrado,...)

2

Unidade/Setor (por extenso), Instituição (por extenso e sem siglas), Cidade, Estado(sigla), País; E-mail (s).

OBS.: Caso dois ou mais autores tenham as mesmas especificações, não precisa repetir as informações, basta acrescentar, apenas, o e-mail ao final.

Só serão aceitos, no máximo, 5(cinco) autores por artigo submetido: ressaltamos que, salvo algumas condições especiais, poderá ser incluído um sexto autor (não mais que isso) mediante apresentação de justificativas. A justificativa deverá ser anexada, no ato da submissão, em “Documentos Suplementares”, para que o Comitê Editorial proceda com a devida análise. Caso isso não ocorra, a submissão de artigo com número superior a 5 (cinco) autores não será aceita.

** Não serão permitidas mudanças nos nomes de autores *a posteriori*.

** Todos os autores deverão, OBRIGATORIAMENTE, cadastrarem-se no sistema.

Resumo e Abstract: no mínimo 100 e no máximo 250 palavras.

Palavras-chave e Keywords: a primeira letra maiúscula. Devem ter, no mínimo, três e, no máximo, cinco palavras, não constantes no Título/Title e separadas por ponto (consultar modelo de artigo).

Obs.: Em se tratando de artigo escrito em idioma estrangeiro (Inglês ou Espanhol), o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar em Português, mas com a sequência alterada, vindo primeiro no idioma estrangeiro.

Introdução: no máximo, **550 palavras**, contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa.

Conclusão: deve ser em texto corrido, sem tópicos.

Agradecimentos: logo após as conclusões, poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, indicando, de forma clara, as razões pelas quais os faz.

- **Tabelas:** sempre **com orientação em “retrato”**. Serão numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. **Não usar linhas verticais**. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho. Recomenda-se que **as tabelas apresentem 8,2 cm de largura, não ultrapassando 17 cm**.

- **Figuras:** sempre **com orientação em “retrato”**. Gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows”. A resolução deve ter qualidade máxima com pelo menos 300 dpi. **As figuras devem apresentar 8,5 cm de largura, não ultrapassando 17 cm**. A fonte empregada deve ser a Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. As linhas dos eixos devem apresentar uma espessura de 1,5 mm de cor preta. A Revista Caatinga reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com **ORIENTAÇÃO** na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. **Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após a sua primeira citação.**

- **Equações:** devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. As equações devem apresentar o seguinte padrão de tamanho:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

Estas definições são encontradas no editor de equação no Word.

REFERÊNCIAS

Devem ser digitadas em espaço 1,5 cm e separadas entre si pelo mesmo espaço (1,5 cm). Precisam ser apresentadas em ordem alfabética de autores; justificar (Ctrl + J). Este periódico

utiliza a **NBR 6023 de agosto/2002 da ABNT. UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.**

O título do periódico não deve ser abreviado e recomenda-se um total de 20 a 30 referências. **EVITE CITAR RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS E SIMILARES.**

Citações de autores no texto: devem ser observadas as normas da ABNT, NBR 10520 de agosto/2002.

Ex: Com 1(um) autor, usar Torres (2008) ou (TORRES, 2008); com 2 (dois) autores, usar Torres e Marcos Filho (2002) ou (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); com 3 (três) autores, usar França, Del Grossi e Marques (2009) ou (FRANÇA; DEL GROSSI; MARQUES, 2009); com mais de três, usar Torres et al. (2002) ou (TORRES et al., 2002).

REGRAS DE CITAÇÕES DE AUTORES

**** Até 3 (três) autores**

Mencionam-se todos os nomes, na ordem em que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula.

Ex: TORRES, S. B.; PAIVA, E. P. PEDRO, A. R. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de jiló. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 0, n. 0, p. 00-00, 2010.

**** Acima de 3 (três) autores**

Menciona-se apenas o primeiro nome, acrescentando-se a expressão **et al.**

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora*(Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, 2006.

**** Grau de parentesco**

HOLANDA NETO, J. P. **Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN**. 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

COSTA SOBRINHO, João da Silva. Cultura do melão. **Cuiabá**: Prefeitura de Cuiabá, 2005.

MODELOS DE REFERÊNCIAS

a) Artigos de Periódicos: Elementos essenciais:

AUTOR. Título do artigo. **Título do periódico**, Local de publicação (cidade), n.º do volume, n.º do fascículo, páginas inicial-final, ano.

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora*(Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 3, p. 261-267, 2006.

b) Livros ou Folhetos, no todo: Devem ser referenciados da seguinte forma:

AUTOR. **Título:** subtítulo. Edição. Local (cidade) de publicação: Editora, data. Número de páginas ou volumes.(nome e número da série)

Ex: RESENDE, M. et al. **Pedologia:** base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa, MG: NEPUT, 1997. 367 p.

OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. **Geologia do Brasil.** 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

c) Livros ou Folhetos, em parte (Capítulo de Livro):

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título:** subtítulo do livro. Número de edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. Indicação de volume, capítulo ou páginas inicial-final da parte.

Ex: BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.

P. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap.

14, p. 595-634.

d) Dissertações e Teses: (somente serão permitidas citações recentes, PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS TRÊS ANOS QUE ANTECEDEM A REDAÇÃO DO ARTIGO).Referenciam-se

da seguinte maneira:

AUTOR. **Título:** subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas ou volumes. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, local.

Ex: OLIVEIRA, F. N. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol**

(*Helianthus annuus* L.).2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de Concentração em Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

e) Artigos de Anais ou Resumos: (DEVEM SER EVITADOS)

NOME DO CONGRESSO, n.º., ano, local de realização (cidade). Título... subtítulo. Local de publicação (cidade): Editora, data de publicação. Número de páginas ou volumes.

Ex: BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3., 1978, Manaus. **Anais...** Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

f) Literatura não publicada, mimeografada, datilografada etc.:

Ex: GURGEL, J. J. S. **Relatório anual de pesca e piscicultura do DNOCS**. Fortaleza: DNOCS, 1989. 27 p. Datilografado.

g) Literatura cuja autoria é uma ou mais pessoas jurídicas:

Ex: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

h) Literatura sem autoria expressa:

Ex: NOVAS Técnicas – Revestimento de sementes facilita o plantio. **Globo Rural**, São Paulo, v. 9, n. 107, p. 7-9, jun. 1994.

i) Documento cartográfico:

Ex: INSTITUTO GEOGRÁFICO E CARTOGRÁFICO (São Paulo, SP). **Regiões de governo**

do Estado de São Paulo. São Paulo, 1994. 1 atlas. Escala 1:2.000.

J) Em meio eletrônico (CD e Internet): Os documentos /informações de **acesso exclusivo por computador** (online) compõem-se dos seguintes elementos essenciais para sua referência:

AUTOR. Denominação ou título e subtítulo (se houver) do serviço ou produto, indicação de responsabilidade, endereço eletrônico entre os sinais <> precedido da expressão – Disponível em: – e a data de acesso precedida da expressão – Acesso em:.

Ex: BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. **SNPC – Lista de Cultivares protegidas**. Disponível em:<<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, 10., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.

UNIDADES E SÍMBOLOS DO SISTEMA INTERNACIONAL ADOTADOS PELA REVISTA CAATINGA

Grandezas básicas	Unidades	Símbolos	Exemplos
Comprimento	metro	m	
Massa quilograma	quilograma	kg	
Tempo	segundo	s	
Corrente elétrica	amper	A	
Temperatura termodinâmica	Kelvin	K	
Quantidade de substância	mol	mol	
Unidades derivadas			
Velocidade	---	m s ⁻¹	343 m s ⁻¹
Aceleração	---	m s ⁻²	9,8 m s ⁻²

Volume	Metro litro	cúbico, M ³ , L*	1 m ³ , 1 000 L*
Frequência	Hertz	Hz	10 Hz
Massa específica	---	Kg m ⁻³	1.000 kg m ⁻³
Força	newton	N	15 N
Pressão	pascal	pa	1,013.10 ⁵ Pa
Energia	joule	J	4 J
Potência	watt	W	500 W
Calor específico	---	J (kg °C) ⁻¹	4186 J (kg °C) ⁻¹
Calor latente	---	J kg ⁻¹	2,26.10 ⁶ J kg ⁻¹
Carga elétrica	coulomb	C	1 C
Potencial elétrico	volt	V	25 V
Resistência elétrica	ohm	Ω	29Ω
Intensidade de energia	Watts/metros quadrado	W m ⁻²	1.372 W m ⁻²
Concentração	Mol/metro cúbico	Mol m ⁻³	500 mol m ⁻³
Condutância elétrica	siemens	S	300 S
Condutividade elétrica		dS m ⁻¹	5 dS m ⁻¹
	desiemens/metro		
Temperatura	Grau Celsius	°C	25 °C
Ângulo	Grau	°	30°
Porcentagem	---	%	45%

Números mencionados em sequência devem ser separados por **ponto e vírgula (;)**. Ex: 2,5; 4,8; 5,3