

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL RELACIONADA AO CONTEÚDO DE
FERRO NO MÚSCULO EM ANIMAIS NELORE**

WELLISON JARLES DA SILVA DINIZ

**São Carlos, São Paulo
Agosto de 2015**

WELLISON JARLES DA SILVA DINIZ

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL RELACIONADA AO CONTEÚDO DE
FERRO NO MÚSCULO EM ANIMAIS NELORE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGev), do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientadora: Dr^a. Luciana Correia de Almeida Regitano

Coorientadora: Dr^a. Polyana Cristine Tizioto

**São Carlos, São Paulo
Agosto de 2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D585e Diniz, Wellison Jarles da Silva
 Expressão gênica diferencial relacionada ao
 conteúdo de ferro no músculo em animais nelore /
 Wellison Jarles da Silva Diniz. -- São Carlos :
 UFSCar, 2015.
 84 p.

 Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
 São Carlos, 2015.

 1. Expressão diferencial. 2. Longissimus. 3.
 Metabolismo de ferro. 4. Transcriptoma. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

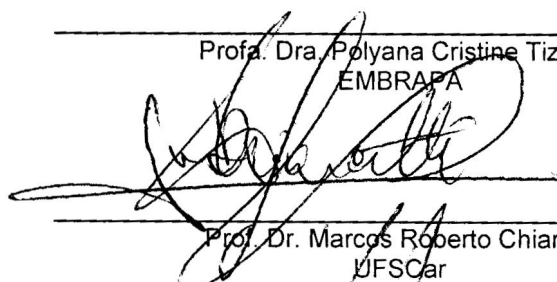
Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Wellison Jarles da Silva Diniz, realizada em 26/08/2015:

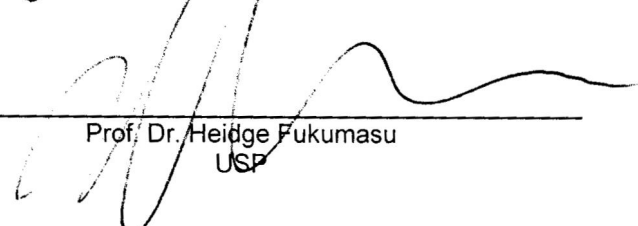


Prof. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano
EMBRAPA

Prof. Dra. Polyana Cristine Tizioto
EMBRAPA



Prof. Dr. Marcos Roberto Chiaratti
UFSCar



Prof. Dr. Heidge Fukumasu
USP

A toda minha família por todo o apoio, afeto, compreensão e estímulo na busca dos meus objetivos.

A Rosangela Almeida por todo amor, dedicação, compreensão e paciência nos momentos de dificuldade, contribuindo de forma significativa no meu crescimento pessoal e profissional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Esta é a minha contribuição a todos aqueles que me ajudaram nessa caminhada.

Sei que não foi tarefa fácil, mas agora vejo o quanto é recompensador o resultado. Foram muitos os que me acompanharam nessa jornada e dela participaram. Alguns mais efetivamente, enquanto outros apenas como coadjuvantes. Entretanto, para não ser injusto agradeço desde já A TODOS que caminharam comigo, destacando:

A Deus pela perseverança, estímulo, oportunidades, pela força de continuar sempre e, por que não, as dificuldades enfrentadas por meio das quais foi possível o aprendizado.

A minha mãe, Maria, pela dedicação, amor, paciência, investimento e exemplo de pessoa que é. Ao meu padrasto, Edir R. Apolinário e ao meu pai Josinaldo, pela confiança, respeito e carinho. Juntos tornamos possível a realização desse sonho.

Aos meus irmãos, Wellington Jairo, Williane Patrícia e Edith B. Oliveira, pelo apoio e amizade, dando força em todos os momentos.

A Rosangela B. de Almeida, minha noiva, pelo amor incondicional, dedicação, companheirismo e paciência nas horas de estresse, tornando meus dias mais felizes, mesmo a distância, e ensinando-me a ser uma pessoa melhor.

Aos velhos amigos, por todo o apoio e incentivo, que apesar da distância se fazem sempre presentes!

A Professora Luciana Regitano minha gratidão pela oportunidade de desenvolver esse trabalho sob sua orientação, atenção e confiança sempre dispensados durante nossos trabalhos. Pelos momentos de aprendizado, divertimento, *happy hours* e convívio sempre produtivos. Apesar das discussões “abilolantes” (da elaboração do projeto à discussão dos resultados) tenho certeza que o saldo é positivo!!!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro (2014/12562-5).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa nos primeiros 14 meses de mestrado.

Ao prof. Luiz Lehmann Coutinho, ao Dr. Maurício Mudadu e a Dra. Aline Cesar pelas contribuições e ensinamentos.

A Polyana Tizioto, minha co-orientadora, fundamental para a execução e desenvolvimento desse trabalho. Minha gratidão pelos ensinamentos compartilhados, orientação, discussões e conversas diárias.

À minha nova família “Laboratório de Biotecnologia” que me recebeu de braços abertos e me proporcionou todo o aprendizado durante esses dois anos. Em especial a Adriana Somavilla, Andressa Lima, Marina Rocha, Marcela de Souza, Polyana Tizioto, Priscila Oliveira, Daniela Dantas, Carlos Buss, Kamila Oliveira, Priscila Reis, Juliana Afonso, Flavia Bressani (*Best friend*), ao piá pançudo (Rafael Matteis), Monalisa Bonfim, Gilbertinho, Wilson Malagó, Luiza Sartori. A todos os piás e “as piás” pelos incontáveis momentos de alegria, tristeza, “aperreio”, aprendizado, enfim saibam que esse texto tem um pouco do ensinamento de cada um de vocês.

Aos amigos Guilherme, Nahrida (Nárnia), Ana Carolina, Leandro Sakamoto (japa), Kauê, Daniella Flávia, Paulo Méo, Amanda, Verônica, pelo convívio, risadas na hora do café e churrascos.

Ah! Se por acaso esqueci-me de alguém, por favor, perdoem-me! Afinal, após dois anos de mestrado a memória não é mais a mesma (a cafeína acaba com os neurônios).

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, seu corpo docente e de técnicos pela excelência de ensino e pelos conhecimentos proporcionados.

A EMBRAPA CPPSE, aos líderes e componentes do Projeto Temático FAPESP (2012/23638-8) e a todos aqueles que a partir dos seus dados contribuíram para a realização desse projeto.

A todos os funcionários da EMBRAPA pelo convívio, ensinamentos e oportunidades gerados durante o período de desenvolvimento da pesquisa.

Muito obrigado!

“

*All truths are easy to understand
once they are discovered; the
point is to discover them.*

Galileo Galilei

“

*Procurei encontrar inspiração
Num recanto de terra pequenina,
Pra fazer um poema em descrição
Das histórias da vida nordestina
Mas, olhando pra força dessa gente,
Vi que um verso não é suficiente,
Pra mostrar a grandeza que eu vejo
Um poema seria um disparate
Não há verso no mundo que retrate
A grandeza do povo sertanejo.*

Maurício Menezes

RESUMO

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial à homeostase celular. Necessário como componente estrutural de proteínas ou cofator enzimático, o Fe participa de vias metabólicas importantes que incluem metabolismo oxidativo, transporte de oxigênio, proliferação celular e funcionamento do sistema imune. Apesar de essencial, apresenta um potencial tóxico às células quando em excesso. Por isso, é necessário um sofisticado sistema que coordene os processos de absorção, reciclagem, uso e armazenamento. Mutações em genes relacionados à homeostase desse mineral podem potencialmente alterar a sua distribuição e armazenamento celular. Ademais, os níveis de Fe afetam vias biológicas, tais como metabolismo de carboidratos e lipídeos. O conteúdo de Fe no músculo em bovinos tem sido associado a diversos parâmetros sensoriais e tecnológicos de qualidade de carne. Entretanto, até a presente data, são escassos estudos que avaliem como os níveis de ferro no músculo podem alterar a expressão gênica e quais as consequências para o metabolismo em bovinos. Portanto, o presente estudo tem como objetivo principal identificar genes diferencialmente expressos, vias metabólicas, interações gênicas e potenciais mecanismos biológicos que participam de processos fisiológicos relacionados à regulação do ferro e de parâmetros de qualidade da carne. Amostras do músculo *Longissimus dorsi* (LD) foram coletadas no momento do abate para extração de RNA total e determinação do conteúdo de ferro (CFe) por espectrometria de emissão óptica (ICP OES). Oito machos castrados da raça Nelore, representantes dos extremos para Valor Genético Genômico Estimado (GEBV) para CFe foram selecionados a partir de uma população referência de 373 animais. O sequenciamento do mRNA total dos animais extremos foi realizado a partir da tecnologia de nova geração *Illumina*, o qual resultou em média 9,13 milhões de *reads* por amostra após o controle de qualidade. Por meio da análise de dados realizada pelo *Tuxedo Suíte pipeline* foram identificados 49 genes anotados diferencialmente expressos (DE) (FDR <0,05) entre os grupos de extremos para o valor de GEBV para CFe. Dentre os genes DE, 18 genes apresentaram-se *up-regulated* e 31 *down-regulated* para os animais do grupo de baixo GEBV para CFe. Genes candidatos para características de qualidade de carne foram identificados no presente estudo e estão relacionados ao transporte e metabolismo de lipídeos. Outras vias identificadas por meio das análises de enriquecimento funcional incluem crescimento e desenvolvimento celular, função do sistema hematológico, entre outras. Vias canônicas de sinalização (sinalização do interferon, ativação do receptor da tireóide (TR/RXR) e sistema complemento) e metabólicas (biossíntese do estearato, biossíntese de ácidos graxos e biossíntese do palmitato) foram também identificadas. Embora o presente estudo não tenha identificado genes com papel direto na regulação do conteúdo de Fe, nossos resultados apontam rotas biológicas influenciadas por esse mineral e contribui com informações para o entendimento da sua participação em vias que afetem a qualidade da carne. Essas informações serão úteis no desenvolvimento de estratégias que contribuam para a produção de carne de qualidade, saudável e nutricionalmente rica. Além disso, essas informações poderão auxiliar no entendimento de distúrbios metabólicos em outras espécies, inclusive a humana.

Palavras-chave: expressão diferencial, *Longissimus*, metabolismo de ferro, transcriptoma.

ABSTRACT

Iron (Fe) is an essential micronutrient for cellular homeostasis. Structural component of proteins or enzyme cofactor, Fe has participation in important metabolic pathways that include oxidative metabolism, oxygen transport, cell proliferation and immune system function. Despite of its essentiality, Fe has a toxic potential to cells when in excess. So, a sophisticated system is needed to coordinate the process of absorption, recycling, use and storage. Mutations in genes related to homeostasis of this mineral may potentially alter the cellular distribution and storage. Furthermore, the Fe levels affect biological pathways such as carbohydrate and lipid metabolism. Iron content in cattle muscle has been associated with many sensory and technological parameters of meat quality. However, to date, studies that evaluate how the iron levels in the muscle can alter gene expression and the consequences for the metabolism in cattle are still absent. Therefore, this study aims to identify differentially expressed genes, metabolic pathways, gene interactions and potential regulatory biological mechanisms of physiological processes related to meat quality parameters. *Longissimus dorsi* (LD) muscle were collected at slaughter for total RNA extraction and determination of CFe by optical emission spectrometry (ICP OES). Eight Nelore steers, who are representatives of extreme value for Genetic Genomic Estimate (GEBV) for iron content (CFe), were selected from a reference population of 373 animals. The sequencing of the total mRNA of extreme animals was carried out from the next generation *Illumina* technology, which resulted in average 19.13 million of reads per sample after quality control and trimming. Data analysis carried out by Tuxedo Suite pipeline identified 49 annotated and differentially expressed genes (DE) (FDR <0.05) between groups of extremes for GEBV value for CFe. From the DE genes, 18 genes were up-regulated and 31 down-regulated for animals of low GEBV for CFe. Candidate genes for meat quality traits were identified in this study and they are related to transport and lipid metabolism. Other pathways identified through functional enrichment analysis include cell growth and development, function of the hematological system, among others. Canonical signaling pathways (interferon signaling, thyroid receptor activation (TR/RXR) and complement system) and canonical metabolic pathways (biosynthesis of stearate, fatty acid biosynthesis and palmitate biosynthesis) were also identified. Although this study did not identify genes with direct role in the regulation of Fe content, our results suggest biological pathways influenced by this mineral and contribute with information to the understanding of their participation in processes affecting quality of meat. This information will be useful in developing strategies that contribute to the production of better quality meat, healthy and nutritionally rich. In addition, this information may help in understanding of metabolic disorders in other species, including humans.

Keywords: differential expression, Longissimus, iron metabolism, transcriptome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Mecanismos de absorção do ferro.	22
Figura 2 – Representação esquemática do ciclo da transferrina.	25
Figura 3 – Controle celular do metabolismo de ferro pelo sistema regulatório IRE/IRP.	29
Figura 4 – Controle sistêmico do metabolismo de ferro pela hepcidina.	30
Figura 5 – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do <i>Gene Ontology</i> (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados em animais Nelore com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro no músculo <i>L. dorsi</i>	53
Figura 6 – Rede de genes diferencialmente expressos com funções no metabolismo de lipídeos.	56
Figura 7 – Rede de genes diferencialmente expressos com funções de desenvolvimento e diferenciação celular.	56
Figura 8 – Rede mecanística mostrando regulador <i>upstream</i> da insulina 1 (Ins1) predita a partir dos genes diferencialmente expressos em <i>L. dorsi</i> , comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.	58
Figura 9 – Rede mecanística dos genes diferencialmente expressos regulados pelo gene <i>PPARG</i> em <i>L. dorsi</i> , comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.	66

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Conteúdo de ferro no músculo (CFe), valor genético genômico estimado (GEBV), número de <i>reads</i> após limpeza, número e percentual de <i>reads</i> mapeados para todos os animais.....	48
Tabela 2 – Característica de composição e qualidade carne para os animais selecionados.....	48
Tabela 3 – Genes identificados como significativamente <i>up-regulated</i> no músculo <i>L. dorsi</i> de animais Nelore de baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro comparados a animais com alto valor genético genômico.....	50
Tabela 4 – Genes identificados como significativamente <i>down-regulated</i> no músculo <i>L. dorsi</i> de animais Nelore de baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro comparados a animais com alto valor genético genômico.....	51
Tabela 5 – Processos biológicos significativamente enriquecidos pelo WebGestalt para os genes diferencialmente expressos no músculo <i>L. dorsi</i> , comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.....	54
Tabela 6 – Cinco principais funções biológicas significativamente identificadas pelo IPA [®] para os genes diferencialmente expressos no músculo <i>L. dorsi</i> , comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.....	57

LISTA DE ANEXOS

	Página
Figura Suplementar S1 – Transcritos classificados pelo <i>Cuffmerge</i>	78
Figura Suplementar S2 – Boxplot do \log_{10} dos valores de FPKM sobre as condições de alto (ACFe) e baixo (BCFe) conteúdo de ferro no músculo.	78
Figura Suplementar S3 – Clusterização hierárquica do perfil transcricional para os genes diferencialmente expressos entre replicatas biológicas com alto (ACFe) e baixo (BCFe) GEBV para conteúdo de ferro no músculo. Cada linha representa um gene e cada coluna um animal.	79
Figura Suplementar S4 – Análise de Componentes Principais (PCA) entre as condições de alto (ACFe) e baixo (BCFe) GEBV para conteúdo de ferro no músculo.	80
Tabela Suplementar S1 – <i>Functional annotation cluster</i> para os genes diferencialmente expressos no músculo <i>L. dorsi</i> , comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.....	81

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACFe	–	Alto GEBV para conteúdo de ferro
BCFe	–	Baixo GEBV para conteúdo de ferro
CFe	–	Conteúdo de ferro
C3	–	Componente complemento 3
DE	–	Diferencialmente expresso
Dcytb	–	Duodenal cytochrome b reductase
DMT-1	–	Divalent Metal Transporter 1
FABP4	–	Fatty acid binding protein 4, adipocyte
FASN	–	Fatty acid synthase
Fe²⁺	–	Ferro ferroso
Fe³⁺	–	Ferro férrico
FPKM	–	Fragmento por kilobase por milhão de fragmentos mapeados
FPTN	–	Ferroportina
GEBV	–	Valor Genético Genômico Estimado
GO	–	<i>Gene Ontology</i>
HAMP	–	Hepcidina
HFE	–	Hemocromatose
HJV	–	Hemojuvelina
HCP-1	–	Heme Carrier Protein 1
IRP	–	Iron regulatory proteins
IRES	–	Iron-responsive elements
KERA	–	Keratocan
LD	–	Músculo <i>Longissimus dorsi</i>
LDT	–	Músculo <i>Longissimus dorsi thoracis</i>
LL	–	Músculo <i>Longissimus lumborum</i>
MEC	–	Matriz extracelular
PLIN5	–	Perilipin 5
RCANI	–	Regulator of calcineurin 1
SLC27A6	–	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6
sTFR	–	Receptor de transferrina solúvel
TB	–	Músculo <i>Triceps brachii</i>
TF	–	Transferrina
TFR	–	Receptor de transferrina
TFR1	–	Receptor 1 da transferrina
TFR2	–	Receptor 2 da transferrina
TH	–	Hormônio da tireoide
THRSP	–	Thyroid hormone responsive
TNC	–	Tenascin C
UTR	–	<i>Untranslated region</i>
VCAN	–	Versican

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Ferro: funções fisiológicas e saúde	17
2.2 Propriedades químicas do ferro e distribuição no corpo.....	18
2.3 Metabolismo do ferro.....	19
2.3.1 Exigências, digestão e absorção	20
2.3.2 Transporte.....	23
2.3.3 Armazenamento.....	26
2.3.4 Excreção e perda de sangue.....	27
2.3.5 Regulação da homeostase.....	28
2.3.5.1 Regulação celular da homeostase do ferro	28
2.3.5.2 Regulação sistêmica da homeostase do ferro	30
2.4 Metabolismo do ferro no músculo	31
2.5 Fatores que afetam o conteúdo de ferro na carne.....	32
2.5.1 Fatores ambientais e fisiológicos.....	32
2.5.1.1 Idade	32
2.5.1.2 Sexo	33
2.5.1.3 Tipo de músculo	33
2.5.1.4 Dieta.....	34
2.5.1.5 Interação entre os minerais	34
2.5.2 Fatores genéticos	35
2.6 Ferro e qualidade de carne	36
2.7 Transcriptômica e quantificação da expressão gênica	39
2.8 HIPÓTESE	42
2.9 OBJETIVOS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Animais, amostras e fenótipos	43

3.2	Extração do RNA, preparo das bibliotecas e sequenciamento.....	44
3.3	Controle de qualidade e mapeamento dos <i>reads</i>	45
3.4	Montagem dos transcritos e estimação da abundância.....	45
3.5	Identificação de genes diferencialmente expressos.....	45
3.6	Classificação funcional dos genes, análise de vias canônicas e redes gênicas	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Grupo fenotípico, mapeamento e montagem dos transcritos	47
4.2	Identificação dos genes diferencialmente expressos	49
4.3	Enriquecimento funcional e vias metabólicas	53
5	DISCUSSÃO	59
5.1	Metabolismo de lipídeos	60
5.2	Desenvolvimento e crescimento celular.....	63
5.3	Integrando os genes do GWAS para ferro aos genes DE.....	65
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS	68
8	ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

A percepção da relação entre alimentação e saúde tem modificado o comportamento dos consumidores nas últimas décadas (HIGGS, 2000; MATEESCU, 2014), os quais buscam alimentos nutricionalmente seguros, funcionais e saudáveis (MATEESCU et al., 2013a). A carne bovina é amplamente consumida em todo o mundo. Porém, a associação negativa entre o conteúdo de gordura e a ocorrência de doenças cardiovasculares, apesar de inconclusiva, tem maculado a imagem da carne vermelha e promovido à redução do seu consumo (HIGGS, 2000). Ainda assim, é indiscutível a sua importância como fonte de proteínas, ácidos graxos, vitaminas, aminoácidos essenciais e minerais para o crescimento, desenvolvimento e funcionamento do corpo humano (MATEESCU, 2014).

Apesar da importância do ferro (Fe) para o perfeito funcionamento das atividades metabólicas, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2015) apontam que a anemia por deficiência de ferro é ainda o principal problema de saúde pública e acomete mais de 30% da população mundial. A carne vermelha é uma excelente fonte de ferro, tanto com relação à quantidade como à biodisponibilidade (DUAN et al., 2012), haja vista que 100 g de carne podem atender até 18% das exigências diárias de Fe (MATEESCU, 2014). Esse mineral está presente predominantemente como ferro heme (50 a 60%) contido na mioglobina, hemoglobina, certas catalases e citocromos, ao passo que uma pequena proporção, componente de metaloproteínas, está presente como ferro não-heme (HIGGS, 2000; PUROHIT et al., 2015).

Dentre os minerais, o ferro é o micronutriente mais abundante do corpo (SUTTLE, 2010) e sua importância na saúde e na doença é reconhecida desde as civilizações egípcias (MCDOWELL, 2003). A capacidade de o ferro formar uma variedade de complexos com ligantes orgânicos de modo dinâmico e flexível o torna útil em uma variedade de funções biológicas (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). O ferro é essencial para o funcionamento de vários processos metabólicos como, por exemplo, ligação e transporte de oxigênio, transferência de elétrons e desenvolvimento do sistema cognitivo (BEARD, 2001), onde atua como componente estrutural de proteínas ou cofator enzimático (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Porém, seu potencial tóxico requer um sofisticado sincronismo na absorção, uso e armazenamento, de modo que não haja falta ou excesso desse mineral (BEARD, 2001; GROTTO, 2008).

Apesar de presentes em pequenas quantidades, os minerais e micronutrientes desempenham funções na regulação de processos biológicos importantes (DORUP, 2004).

Eles atuam na síntese e metabolismo de muitos hormônios, os quais por meio de interações complexas estão envolvidos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo (DAUNCEY; KATSUMATA; WHITE, 2004). Muitos desses, tais como o hormônio da tireoide (TH), hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), dentre outros, têm efeito direto sobre o desenvolvimento, funcionamento muscular (DAUNCEY; KATSUMATA; WHITE, 2004) e na determinação dos tipos de miofibras (CHOI; KIM, 2009). O TH, por exemplo, é um regulador chave dos processos supracitados, onde atua como regulador de fatores miogênicos e de enzimas metabólicas (DAUNCEY; KATSUMATA; WHITE, 2004). A complexa interação entre esses hormônios, o componente genético individual e os fatores ambientais afetam diretamente a composição nutricional e os parâmetros de qualidade da carne (MUCHENJE et al., 2009; WARNER et al., 2010).

Influenciado principalmente pelo balanço entre suplementação e excreção, assim como fatores fisiológicos e ambientais, estudos recentes têm destacado que o conteúdo de ferro no músculo bovino é, em parte, determinado geneticamente, e a herdabilidade da característica é considerada moderada a alta (MATEESCU et al., 2013b; TIZIOTO et al., 2015a). Em bovinos, *Quantitative trait loci* (QTLs), com efeitos significativos ou sugestivos, influenciando o conteúdo de ferro no músculo foram identificados nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 14, 15, 16, 25, 27, 28 e 29 (AHLBERG et al., 2014; CASAS et al., 2014; DUAN et al., 2012; MATEESCU et al., 2013a; TIZIOTO et al., 2015a). Porém, ainda são limitadas as informações referentes aos efeitos genéticos e ambientais sobre o conteúdo e a variação natural dos nutrientes presentes na carne (MATEESCU et al., 2013b). Além disso, a crescente exigência do mercado consumidor por produtos de qualidade tem destacado a necessidade de entender como esses nutrientes interagem e qual a extensão da sua influência sobre os parâmetros sensoriais e tecnológicos da carne (GARMYN et al., 2011).

Com o avanço de tecnologias genômicas de genotipagem, sequenciamento de DNA e RNA, bem como o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para o processamento desses dados tem sido possível entender melhor a fisiologia e a influência de fatores genéticos e ambientais sobre os fenótipos de interesse na produção animal (HOCQUETTE et al., 2007). Polimorfismos em genes relacionados à homeostase do ferro, tais como receptor 2 da transferrina e ferroportina, foram associados a alterações no conteúdo do mineral no músculo de bovinos da raça Angus (DUAN et al., 2012). Também, estudos de associação têm verificado que genes candidatos que afetam a maciez (micro-calpaína e calpastatina) (CASAS et al., 2014) e a musculatura dupla (miostatina) em bovinos cruzados (Jersey x Limousin) afetam os níveis de ferro (MORRIS et al., 2013).

Apesar dos estudos supramencionados, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que influenciam a homeostase do ferro em bovinos, principalmente no músculo esquelético. Por outro lado, o uso de análises de expressão para avaliar o efeito do ferro sobre a expressão gênica e o funcionamento de vias metabólicas é comum em camundongos, ratos e humanos (CHOI et al., 2013; POLONIFI et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2007). Esses estudos têm verificado que desbalanços na homeostase do ferro afetam não apenas genes relacionados ao metabolismo do mineral, mas também aqueles envolvidos em processos como metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos, estresse celular, crescimento e proliferação celular (KAMEI et al., 2010; OEXLE; GNAIGER; WEISS, 1999; RODRIGUEZ et al., 2007).

O sequenciamento de RNA (RNAseq) permite o mapeamento e a quantificação dos transcritos na célula de acordo com o estágio de desenvolvimento e as condições fisiológicas específicas (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009), possibilitando compreender a complexidade do transcriptoma a partir da identificação dos genes diferencialmente expressos, isoformas e novos transcritos (HE; LIU, 2013; MONTGOMERY et al., 2010). Assim, estabelecer os perfis globais de expressão gênica e identificar variações nesses perfis de modo a compreender os mecanismos biológicos que contribuem para a variação fenotípica de características complexas, tais como regulação do conteúdo de ferro no músculo e qualidade de carne, expande a quantidade de conhecimento disponível. Além disso, permite identificar genes e vias biologicamente importantes que atuam efetivamente sobre tais características.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ferro: funções fisiológicas e saúde

O ferro exibe papel central em uma gama de processos bioquímicos nos quais atua como componente estrutural de proteínas, enzimas ou como cofator enzimático (CAMMACK; WRIGGLESWORTH; BAUM, 1990; MCDOWELL, 2003). Isso o torna um micronutriente essencial em diversas reações, dentre as quais se incluem: transporte e armazenamento de oxigênio, biossíntese do grupo heme, respiração celular, síntese de DNA e RNA, regulação da expressão gênica, proliferação e diferenciação celular, formação do colágeno e funcionamento do sistema imune (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008; LIEU et al., 2001).

A quantidade de ferro disponível também está envolvida na produção normal do hormônio da tireoide (TH) (MCDOWELL, 2003). De acordo com Cunningham et al. (1998), a síntese de TH é prejudicada nos casos de menor disponibilidade de ferro, com ou sem anemia, em virtude da redução na atividade da tireoide peroxidase, a qual é heme-dependente. O desenvolvimento cognitivo e de aprendizado é também afetado pelo conteúdo de Fe (MCDOWELL, 2003), necessário para a mielinização da medula espinhal e cofator de enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores, incluindo triptofano hidroxilase (serotonina) e tirosina hidroxilase (norepinefrina e dopamina) (BEARD, 2001).

O Fe é também componente chave de várias enzimas celulares, tais como catalases, peroxidases, citocromos, ribonucleotídeo redutase, aconitases. Estas são críticas não só para o desempenho de atividades fisiológicas vitais como também alterações no seu funcionamento contribuem para o desenvolvimento de uma gama de doenças (LIEU et al., 2001). A importância desse mineral em processos celulares é ressaltada por Mccown e Specht (2011). De acordo com esses pesquisadores, quase metade das enzimas do Ciclo do Ácido Cítrico contém ou necessita do ferro como cofator. Nesse contexto, são crescentes as evidências que sugerem o potencial papel do ferro, quando em excesso, na etiopatogênese de doenças como resistência a insulina, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (OEXLE; GNAIGER; WEISS, 1999; RAJPATHAK et al., 2009).

Das manifestações resultantes do desbalanço na homeostase do ferro, a anemia é o principal problema de saúde pública em todo o mundo (ANDREWS, 2008) e afeta cerca de 30% da população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Ainda de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a deficiência de ferro ao comprometer

funções relacionadas ao desenvolvimento cognitivo, resistência a infecções, redução da capacidade de trabalho, gestação e crescimento, também influencia negativamente no desenvolvimento econômico e social do país. Diante desse cenário, dentre as medidas sanitárias implementadas pela OMS para reduzir os casos de anemia, destacam-se o tratamento e prevenção de doenças que levam a deficiência de Fe, o aumento da ingestão de dietas ricas em Fe e sua suplementação, e a prevenção de outras deficiências minerais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Em relação à dieta, a carne vermelha é uma excelente fonte de ferro, pois possui entre 50 a 60% de Fe na forma heme e aproximadamente 15 a 25% desse total é absorvido, em comparação com 1 a 7% em fontes vegetais (HIGGS, 2000). Além disso, a carne melhora a absorção do ferro não-heme, fornece aminoácidos essenciais, ácidos graxos, vitaminas (lipossolúveis e do complexo B), componentes bioativos e outros minerais (MATEESCU, 2014). Embora as exigências nutricionais de Fe sejam influenciadas por diversos fatores, como será discutido a seguir, estima-se que, em média, 100 g de carne vermelha atendam de 8% a 18% das necessidades diárias (MATEESCU, 2014).

Apesar de o ferro possuir papel significativo em processos celulares chave, os mecanismos moleculares pelos quais ele afeta esses processos ainda permanecem pouco compreendidos (LIEU et al., 2001). Entretanto, o conhecimento disponível até aqui permite concluir que o metabolismo do ferro é complexo e composto por uma rede coordenada de moléculas, descritas nas próximas seções, que desempenham funções de absorção, transporte e armazenamento do ferro de modo a atender as necessidades do organismo e simultaneamente evitar sobrecarga (PONKA, 2004; RODRIGUEZ et al., 2007).

2.2 Propriedades químicas do ferro e distribuição no corpo

Principal constituinte da crosta terrestre e também o micronutriente mais abundante do corpo, o ferro é classificado como um metal de transição (*bloco d*), de peso atômico 56, cujas propriedades químicas o torna útil em uma diversidade de processos metabólicos (BEARD, 2001; EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008; MCDOWELL, 2003). Os estados de oxidação do ferro podem variar de -2 a +6, contudo em sistemas biológicos os estados +2 (ferro ferroso, Fe^{2+}) e +3 (ferro férrico, Fe^{3+}) são as formas mais estáveis (BEARD, 2001). A região orbital *d* do ferro não é preenchida e nessa apresentam ligação preferencial oxigênio, nitrogênio e enxofre. Em virtude dessa capacidade o ferro participa de

reações em vários processos biológicos, tais como oxidação-redução (redox), transporte e armazenamento de oxigênio e da transferência de elétrons (BEARD, 2001).

Apesar da importância biológica das reações redox, essas podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS - do inglês *Reactive Oxygen Species*), tais como Hidroxil (OH⁻) e superóxido (O₂), que são altamente tóxicas pela sua capacidade de reagir com alta afinidade com quase todas as moléculas presentes na célula (LIEU et al., 2001). McCown e Specht (2011) destacam que as ROS podem danificar o DNA, prejudicar a síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos, alterar a proliferação celular, reagir com ácidos graxos insaturados e induzir a peroxidação de lipídeos, comprometendo a integridade celular e, por último causando a apoptose. Portanto, em virtude da potencial toxicidade do ferro, mecanismos altamente sofisticados e moléculas especializadas são necessários à homeostase desse mineral (LIEU et al., 2001).

O conteúdo de ferro no corpo varia do nascimento à maturidade (MCDOWELL, 2003). Animais têm aproximadamente de 9-22 mg de Fe/kg de peso vivo (PV) (MCCOWN; SPECHT, 2011). Em bezerros, essas estimativas variam de 18 a 34 mg de Fe/kg de PV (NRC, 2001) e em humanos variam de 45 a 55 mg de Fe/kg de PV em mulheres e homens adultos, respectivamente (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). Componente de diversas proteínas ou cofator enzimático em diversos processos, o ferro é encontrado, em sua grande maioria, presente na hemoglobina, variando de 60% a 70%, enquanto cerca de 20% a 30% é armazenado como ferritina ou hemosiderina. O restante está presente na mioglobina (6% a 7%), em enzimas (1%) e ligado a transferrina no plasma (0,1%) (HARVEY, 2008).

2.3 Metabolismo do ferro

Nas últimas décadas houve um rápido avanço no conhecimento dos processos relacionados ao metabolismo do ferro, os quais têm sido extensivamente revisados (ANDREWS, 2008; TESTA, 2001). O progresso em técnicas de biologia molecular e bioquímica tem aberto novos horizontes no entendimento desses processos, principalmente a identificação e caracterização de proteínas relacionadas à homeostase (ANDREWS, 2008; EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Entretanto, diversos mecanismos importantes ainda estão sendo entendidos (PANTOPOULOS, 2004).

O ferro é obtido da dieta e, principalmente, da reciclagem de hemácias senescentes (GROTTO, 2008). Contudo, não há mecanismos fisiológicos específicos para

excreção do seu excesso, o qual ocorre em quantidades mínimas (1 a 2 mg/dia em humanos) (BEARD, 2001). Em virtude disso e do seu duplo papel no metabolismo celular, os mecanismos homeostáticos que mantêm os níveis adequados de ferro contam com uma complexa rede de moléculas e processos químicos que regulam a absorção, transporte, armazenamento, utilização e mobilização do ferro na célula, os quais devem ser fortemente controlados (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008; RECALCATI; MINOTTI; CAIRO, 2010). Portanto, distúrbios em quaisquer dos processos citados anteriormente, que levem à deficiência ou ao excesso, têm como consequência diversas anormalidades clínicas (MCCOWN; SPECHT, 2011).

2.3.1 Exigências, digestão e absorção

O ferro absorvido pelo animal provém da dieta cujas exigências diárias, estimadas com base na matéria seca (MS), são de 100 mg de Fe/kg de MS para bezerros em crescimento e 50 mg de Fe/kg de MS para as demais categorias (MCDOWELL, 2003; NRC, 2001). Contudo, essas estimativas podem ser afetadas por diversos fatores como os descritos a seguir. Em bovinos são raros os casos de deficiência de ferro, sendo mais provável sua ocorrência em animais jovens (MCDOWELL, 2003). Tal fato se deve tanto a baixa exigência de ferro em bovinos quanto a sua abundância nas forragens, que atende as necessidades do animal adulto (NRC, 2001).

Animais adultos e saudáveis geralmente absorvem entre 0,2% e 4,5% de ferro da quantidade total ingerida (HARVEY, 2008). Entretanto, a eficiência de absorção em animais ruminantes é consideravelmente baixa, correspondendo a menos de 2% em bovinos adultos (NRC, 2001). Ainda segundo o *National Research Council* (NRC, 2001), esta baixa eficiência é, em parte, devido às forragens suprirem mais do que as quantidades necessárias em virtude da contaminação pelo solo. Por isso, os mecanismos de absorção tendem a ser negativamente regulados para proteger o animal da toxicidade do ferro. Um segundo fator destacado pelo NRC é que a forma do ferro nas forragens é o óxido férrico (Fe_2O_3) que é menos solúvel e pobremente absorvido.

Além dos fatores já mencionados, a absorção do ferro é afetada pela idade, *status* de ferro corpóreo, estado de saúde do animal, condições do trato gastrointestinal, quantidade e forma química do ferro ingerido, quantidade e proporções de vários outros componentes da dieta, mudanças na taxa eritropoiética, inflamação, hipóxia e gestação (HARVEY, 2008; MCDOWELL, 2003).

A absorção do ferro ocorre na superfície apical dos enterócitos do duodeno e jejuno (MCCOWN; SPECHT, 2011), representada na [Figura 1](#). Entretanto, o ácido clorídrico presente no abomaso (estômago) auxilia na remoção do ferro ligado a proteína por meio da desnaturação proteica, assim como ajuda na solubilização do Fe^{3+} e sua redução para o estado Fe^{2+} (BEARD; DAWSON, 1997). O ferro da dieta é absorvido na forma ferrosa (Fe^{2+}) (presente principalmente como ferro heme), ao passo que o Fe^{3+} (denominado ferro não-heme ou férrico) precisa ser reduzido ou quelatado antes de ser transportado para os enterócitos (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008; MCDOWELL, 2003). A presença de ácido ascórbico ou cisteína na dieta ajuda nesse processo de redução do ferro e aumenta a sua absorção (MCDOWELL, 2003). Ambas as formas (heme e não-heme) são absorvidas não competitivamente pelos enterócitos (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008).

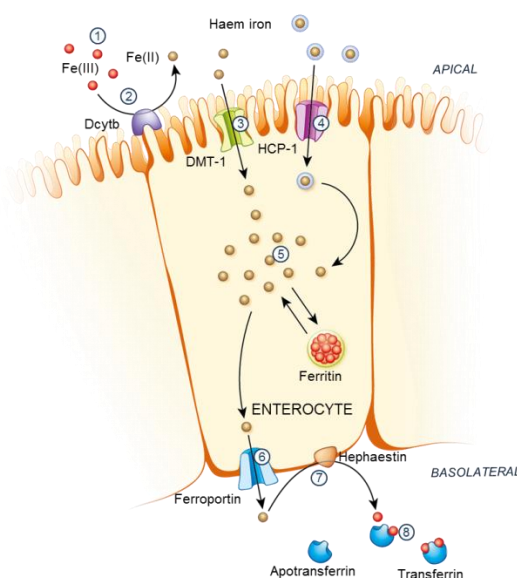
O ferro na forma heme provém da digestão enzimática da hemoglobina ou mioglobina presente na dieta, é mais biodisponível do que o ferro não-heme e uma fonte nutricional importante para carnívoros e omnívoros (HARVEY, 2008). A proteína de membrana transportadora do heme 1 (HCP-1, *Heme Carrier Protein 1*) medeia a entrada intacta do complexo ferro-protoporfirina nos enterócitos. Uma vez dentro da célula, o heme é então separado enzimaticamente pela heme oxigenase e o ferro liberado (MCCOWN; SPECHT, 2011; TESTA, 2001).

O ferro não-heme é insolúvel em pH inferior a três, por isso a sua biodisponibilidade depende de outros componentes da dieta que podem promover ou inibir sua absorção (BEARD; DAWSON, 1997). De acordo com Mcdowell (2003), componentes tais como fitato, tanino e fosfato presentes na dieta podem se ligar ao ferro em complexos insolúveis, impedindo a absorção. Neste contexto, o Fe^{3+} quando solubilizado pelo ácido clorídrico no estômago liga-se a mucinas ou outras pequenas moléculas que o mantém solúvel no ambiente alcalino do intestino delgado e disponível para absorção (HARVEY, 2008).

O processo de redução do ferro não-heme é realizado pela redutase citocromo b duodenal (Dcytb, *Duodenal cytochrome b reductase*), que é substancialmente expressa na borda em escova dos enterócitos no duodeno (MCCOWN; SPECHT, 2011). O transporte transmembrana do Fe^{2+} é realizado pela proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT-1, *Divalent Metal Transporter 1*, também conhecida como Nramp2 - *Natural resistance-associated macrophage protein 2*), por um processo de cotransporte dependente de prótons (MCCOWN; SPECHT, 2011). A DMT-1 não é específica para o ferro e serve também como mecanismo de transporte importante para outros metais divalentes, tais como manganês, cobalto, cobre e zinco (GROTTO, 2008; TESTA, 2001). Embora a principal via de absorção

do ferro não-heme seja pela DMT-1, outros mecanismos têm sido propostos como, por exemplo, mediado pela proteína mobilferrina (CONRAD; UMBREIT, 2002). Contudo, ainda são necessários mais estudos para compreender o funcionamento dessa via (HARVEY, 2008).

Figura 1 – Mecanismos de absorção do ferro.



O ferro é absorvido a partir da dieta no lúmen intestinal pelos enterócitos no duodeno (1). A DMT-1 transporta o ferro não-heme (Fe II e Fe III), entretanto os íons Fe (III) são antes reduzidos pela *Dcytb* a Fe (II) (2). Os íons Fe (II) são transportados para dentro dos enterócitos diretamente via DMT-1 (3). A proteína transportadora do heme 1 (HCP-1) realiza o transporte do heme, o qual dentro da célula por meio de reação da heme oxigenase libera o Fe II do complexo Fe-protoporfirina (4). O *pool* de ferro disponível (5) pode ser armazenado como ferritina ou exportado para a corrente sanguínea. Os íons Fe (II) são exportados usando a ferroportina (6) e são oxidados a Fe (III) pela hephaestina (7) seguido pela ligação da apotransferrina para formar a transferrina monoférrica e diférrica (8).

Fonte: VIFOR PHARMA (2014).

Uma vez no interior da célula tanto o ferro heme quanto o não-heme estão agora na forma ferrosa (Fe^{2+}) e compõem o mesmo *pool* (GROTTO, 2008) disponível para utilização, armazenamento ou transporte (*pool* de ferro disponível). Entretanto, para manter o ferro solúvel dentro da célula e simultaneamente evitar a formação de reações oxidativas acredita-se que o mesmo ligue-se a moléculas chaperonas (HARVEY, 2008). O enterócito retém uma pequena parte do ferro e a armazena como ferritina, enquanto que o remanescente é transportado via proteína transportadora ferroportina (FPTN, *Ferroportin*, também conhecida como IREG1) (MCCOWN; SPECHT, 2011). Os mecanismos pelos quais o Fe^{2+}

alcança a membrana basolateral e quais fatores determinam se ele será armazenado ou transportado na corrente sanguínea, embora ainda não claros, estão sendo compreendidos (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008).

A exportação do ferro é promovida pela proteína FPTN, localizada na superfície basolateral dos enterócitos, que requer uma ferroxidase como proteína acessória (PANTOPOULOS, 2004). Essa pode ser a hephaestina, ou menos comumente, a ceruloplasmina. Após a FPTN liberar o Fe^{2+} esse é oxidado a Fe^{3+} , para o qual os sítios de ligação da transferrina têm maior afinidade (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008; HENTZE et al., 2010). A distribuição de ferro no corpo é realizada pela transferrina plasmática que une os vários ciclos do metabolismo do ferro (MCDOWELL, 2003).

2.3.2 Transporte

A transferrina (TF) é uma glicoproteína com aproximadamente 80 kDa, composta por dois domínios homólogos, os quais apresentam sítios de ligação com alta afinidade, mas reversível, pelo Fe^{3+} , mantendo-o em uma forma não reativa na circulação, em um processo dependente de pH e um ânion carbonato (HARVEY, 2008; PONKA, 1999). Segundo McCown e Specht (2011), a TF existe em três formas: apotransferrina (livre de Fe); transferrina monoférrica (ligada a uma molécula de Fe); transferrina diférrica ou holotransferrina (ligada a duas moléculas de Fe).

Com função de transporte de ferro entre os sítios de absorção, armazenamento e uso, a maior parte do Fe ligado a TF provém do catabolismo da hemoglobina no sistema reticuloendotelial (PONKA, 1999). Por outro lado, apenas cerca de 3% resulta da absorção intestinal (HARVEY, 2008). Apesar do Fe ligado a TF compreender menos de 0,1% (~3 mg) do total de ferro corpóreo, representa o *pool* de ferro mais importante, haja vista que exibe alta taxa de *turnover* (30 mg/dia) e cerca de 80% desse Fe é transportado para a medula óssea a fim de sintetizar hemoglobina (PONKA; LOK, 1999).

Sob condições saudáveis, normalmente 25% a 50% da TF plasmática se encontra saturada (mono ou diférrica) (HARVEY, 2008). Embora a concentração da TF-diférrica no plasma seja menor quando comparada a TF-monoférrica, ela é a principal fornecedora de Fe às células, uma vez que se liga com oito a dez vezes mais afinidade ao receptor 1 da transferrina (TFR1) que a TF-monoférrica (HARVEY, 2008).

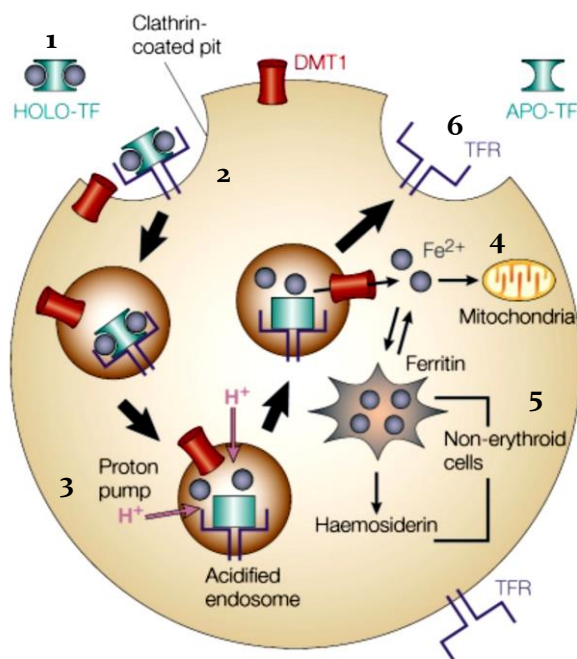
A captação do ferro ligado a transferrina é realizada pelos receptores de transferrina (TFR), localizados na membrana celular (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008),

os quais regulam a aquisição de Fe na maioria dos tipos celulares (PONKA, 1999). Há dois tipos de receptores de transferrina: o TFR1 e o TFR2 (TESTA, 2001). O TFR1 é expresso em todas as células, principalmente em precursores eritróides, células em proliferação, linfócitos ativos e hepatócitos, sendo que na maioria dos tecidos exibe baixos níveis de expressão (ANDREWS, 2008). Também foi identificado o receptor 2 da transferrina (TFR2) que, apesar da homologia (66%) do seu domínio extracelular com o TFR1, apresenta diferenças funcionais importantes, assim como na regulação da sua expressão (TESTA, 2001). Dentre as diferenças, o TFR2 não capta eficientemente a TF-diférrica (ANDREWS, 2008) e sua distribuição nos tecidos é restrita aos hepatócitos e células eritróides (TESTA, 2001).

O mecanismo predominante, e atualmente aceito, de captação de Fe pelas células resulta da ligação transferrina-receptor 1 da transferrina (TF-TFR1) e internalização do complexo TF-TFR1 (PONKA; LOK, 1999), denominado como ciclo da transferrina e representado esquematicamente na [Figura 2](#). O Fe^{2+} exportado da célula pela FPTN é oxidado a Fe^{3+} pela ferroxidase hephaestina e liga-se a apotransferrina, formando a transferrina monoférrica ou diférrica, as quais, via plasma, alcançam os tecidos alvo (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). O TFR1 seletivamente se liga a TF-diférrica circulante. Essa interação desencadeia a invaginação da membrana celular mediada por clatrin, formando uma vesícula endocítica (endossomo) que contém o complexo TF-TFR1, o qual é internalizado pela célula (ANDREWS, 2000; PONKA; LOK, 1999).

A liberação do Fe ligado à TF no endossomo ocorre por um processo dependente de energia e temperatura que envolve a acidificação do endossomo a partir do bombeamento de íons hidrogênio por uma H-ATPase, ainda não identificada (PONKA; LOK, 1999). A redução do pH induz à mudança conformacional da TF e do seu receptor, resultando na liberação do Fe (HARVEY, 2008; PONKA; LOK, 1999). O ferro liberado pela TF (Fe^{3+}) é reduzido a Fe^{2+} pela metaloredutase STEAP3 (*Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*) e transportado do endossomo para o citoplasma (HARVEY, 2008), onde pode ser utilizado em funções metabólicas ou armazenado como ferritina/hemosiderina (PONKA, 1999). Embora pouco entendido como o Fe é transportado pela membrana endossomal, acredita-se que a proteína DMT-1 (*Divalent Metal Transporter 1*), também envolvida na absorção do ferro intestinal, seja a responsável por esse transporte (PONKA, 1999). O complexo apotransferrina-TFR1 retorna à superfície celular, onde a apotransferrina é liberada para captação de Fe e início de um novo ciclo (MCCOWN; SPECHT, 2011).

Figura 2 – Representação esquemática do ciclo da transferrina.



A transferrina diférrica (HOLO-TF) (1) liga-se aos receptores de transferrina (TFR1) localizados na superfície celular, formando um complexo TF-TFR1 que é internalizado por endocitose mediada por clatrina (2). A acidificação do endossomo leva a mudanças conformacionais que permitem a liberação do Fe (3), o qual é reduzido a Fe^{2+} e transportado para o citoplasma onde é utilizado em funções (4) ou armazenado como ferritina ou hemosiderina (5). O complexo apotransferrina (APO-TF)-TFR1 retorna a superfície onde a APO-TF é liberada (6).

Fonte: Adaptado de Andrews (2000).

Alguns outros mecanismos de transporte e captação de ferro têm sido propostos (BEGUIN, 2003; RAWAT et al., 2012). O receptor de transferrina solúvel (sTFR) identificado no soro de humanos e animais, corresponde a um monômero de 85 kDa, clivado do TFR, que circula ligado a transferrina (TF) (BEGUIN, 2003; SKIKNE, 2008). Estudos recentes apontam que células eritróides contém um alto número de sTFR, os quais são liberados dos reticulócitos durante a maturação dos eritrócitos (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Beguin (2003) destaca que os valores de sTFR representam uma medida quantitativa da eritropoiese e um marcador da deficiência de ferro. Segundo Testa (2001), os níveis de sTFR são determinados pelo *status* de ferro corpóreo, nos quais a deficiência de Fe geralmente está associada a níveis elevados desse receptor.

A ferritina é a principal proteína de armazenamento do ferro. Entretanto, estudos *in vitro* têm demonstrado a sua presença, em pequenas quantidades, no plasma (HARVEY, 2008). De acordo com Ponka (1999), em humanos saudáveis também já foi detectado a ferritina na circulação. Entretanto, sua origem e papel fisiológico permanecem obscuros. Em virtude de suas baixas concentrações no plasma acredita-se que seja pequena a

sua contribuição para o *pool* de ferro plasmático (HARVEY, 2008). Por outro lado, em situações com sobrecarga de ferro e inflamação os níveis de ferritina são maiores, sugerindo talvez um papel na regulação da formação de vasos sanguíneos e imunidade (RECALCATI; MINOTTI; CAIRO, 2010).

Um novo receptor de transferrina, recentemente identificado na superfície celular dos macrófagos, é o Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Além disso, Rawat et al. (2012) sugerem que o GAPDH também atua como receptor da lactoferrina (LF). Ainda segundo esses autores, sob condições de diminuição dos níveis de ferro há um aumento na ligação da LF à superfície celular dos macrófagos. A lactoferrina é encontrada em diversas secreções mucosas e sua função principal tem sido relacionada ao sequestro de Fe em alguns tecidos e possíveis papéis como antioxidante e agente antimicrobiano. Assim, sua função como transportadora de ferro em indivíduos saudáveis pode ser insignificante (TESTA, 2001).

Além da captação do ferro mediada por receptores, células eritróides normais podem captar ferro não ligado a transferrina (TESTA, 2001). Apesar de incerta a origem do ferro não ligado a transferrina, transportadores como a TFR2 e DMT-1 têm sido propostos (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Além desses, Harvey (2008) sugere que o Fe pode ser complexado com moléculas de baixo peso molecular ou outras proteínas plasmáticas que auxiliam o transporte. Contudo, o autor sugere a potencial geração de radicais livres e danos teciduais nessa situação.

2.3.3 Armazenamento

Uma vez que as necessidades metabólicas de ferro da célula foram supridas, o seu excesso é armazenado primariamente no citoplasma dos hepatócitos por meio da ferritina (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). A ferritina é uma proteína globular, oligomérica, cuja estrutura de 24 subunidades é altamente conservada, capaz de armazenar até 4.500 átomos de Fe^{3+} (PONKA, 1999). Mamíferos possuem duas subunidades de ferritina, denominadas como H (*heart* ou *heavy*) e L (*liver* ou *light*) (CRICHTON, 2009). A ferritina é formada por proporções variadas das subunidades H e L (isoferritinas), as quais variam entre os tipos celulares (TESTA, 2001). A ferritina-H predomina em eritrócitos, músculos, rins e coração, enquanto a ferritina-L é abundante no fígado, baço e plasma (HARVEY, 2008; RECALCATI; MINOTTI; CAIRO, 2010). A subunidade H é caracterizada por um sítio catalítico com atividade ferroxidase que promove a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} . A subunidade L não possui

atividade ferroxidase, entretanto é mais eficiente na nucleação e mineralização do ferro no centro da ferritina (CRICHTON, 2009; HARVEY, 2008).

A ferritina minimiza o potencial de formação de radicais livres (HARVEY, 2008), permitindo o armazenamento do ferro como um complexo inorgânico, solúvel em água, não tóxico e biodisponível na forma de oxihidróxido férrico (CRICHTON, 2009). Os principais sítios de armazenamento de ferro são as células do sistema reticuloendotelial: fígado, baço e medula óssea (HARVEY, 2008). Ainda segundo o autor, os macrófagos também armazenam ferro a partir da reciclagem dos eritrócitos senescentes. Entretanto, a maior parte é exportada via ferroportina e transferrina, e o restante é liberado lentamente no plasma. Os enterócitos, embora armazenem o ferro absorvido da dieta, não compõem o sistema de armazenamento corpóreo, uma vez que com a descamação das células senescentes da mucosa o ferro é excretado (ANDREWS, 2005).

Sob condições homeostáticas normais 95% do ferro é armazenado, predominantemente, como ferritina e o remanescente constitui a hemosiderina (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Contudo, em condições de sobrecarga associada ao estado patológico tóxico há um aumento da hemosiderina (HARVEY, 2008), particularmente em órgãos como fígado, pâncreas e coração (TESTA, 2001). A hemosiderina é um complexo proteína-ferro, provavelmente derivado da degradação lisossomal da ferritina, que forma agregados insolúveis, não homogêneo e pouco móvel (ANDREWS, 2005; TESTA, 2001).

A ferritina e a hemosiderina contribuem variavelmente para o armazenamento de ferro de acordo com a espécie, órgão e quantidade de ferro estocado (MCDOWELL, 2003). Mamíferos, tais como humanos, cachorros, bovinos, cabras e cavalos possuem maiores estoques corpóreos, enquanto suínos têm quantidades mínimas armazenadas (HARVEY, 2008). Independente da forma de armazenamento é inegável que esses estoques devem atender as exigências fisiológicas, entretanto pouco se sabe sobre como a ferritina é degradada e redistribui o ferro para o corpo (CRICHTON, 2009). Segundo Hentze, Muckenthaler e Andrews (2004), nesse processo tanto vias lisossomais quanto proteossomais estão envolvidas.

2.3.4 Excreção e perda de sangue

A quantidade de ferro excretada é relativamente pequena, haja vista que não há um mecanismo fisiológico ativo de eliminação, exceto na menstruação de primatas e no sangramento decorrente da postura em aves (HARVEY, 2008; TESTA, 2001). A propósito, as

perdas ocorrem passivamente por meio da descamação de células da superfície da pele, da mucosa epitelial ou de órgãos internos, assim como do trato urinário, pequenas quantidades de sais biliares e sangue via sistema gastrointestinal (CRICHTON, 2009; TESTA, 2001).

Embora a quantidade perdida de ferro não seja regulada fisiologicamente, estima-se que em torno de 1 mg a 2 mg diários seja perdido em homens e mulheres, respectivamente (TESTA, 2001). Em animais, apesar das perdas também serem mínimas, hemorragias, parasitas gastrointestinais e ectoparasitas podem levar à deficiência (MCCOWN; SPECHT, 2011). Do total de ferro excretado via fezes, supostamente, menos de 3% resulta de perdas endógenas, enquanto que a maioria resulta do ferro presente nos alimentos, mas não absorvido (MCDOWELL, 2003).

2.3.5 Regulação da homeostase

Como já discutido, o ferro participa de diversos processos biológicos. Contudo, em virtude da sua alta reatividade é necessário um forte controle da sua disponibilidade, a qual depende do sincronismo entre as necessidades metabólicas e das reservas corpóreas (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). Uma vez que o Fe não pode ser ativamente excretado, sua regulação ocorre principalmente na absorção (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Esse controle é realizado tanto a nível celular como sistêmico, cujas respostas são coordenadas (ANDREWS, 2005). De modo geral, nas situações que requerem menor disponibilidade desse mineral a absorção é interrompida e há maior retenção de ferro. Por outro lado, o aumento das exigências de Fe é acompanhado de maior absorção e liberação pelos macrófagos (ANDREWS, 2005).

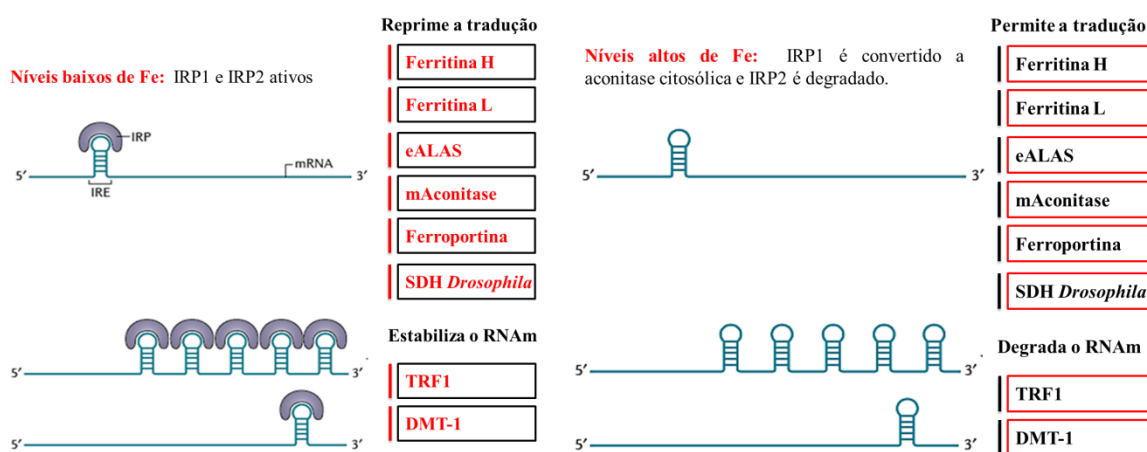
2.3.5.1 Regulação celular da homeostase do ferro

Os mecanismos regulatórios da homeostase celular do Fe envolvem a modulação transcricional, a estabilidade do mRNA, a tradução e as modificações pós-transcricionais, sendo o último melhor caracterizado (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). A regulação pós-transcricional é coordenada pela interação entre proteínas reguladoras de ferro (*iron regulatory proteins*; IRP1 e IRP2) e elementos responsivos ao ferro (*iron-responsive elements*; IRES) que controlam a expressão de genes envolvidos na absorção (TFR1, DMT-1), armazenamento (ferritina H e L), utilização (*Erythroid 5 aminolevulinic acid synthase* - eALAS, aconitase mitocondrial) e exportação (FPTN) do ferro (RECALCATI; MINOTTI; CAIRO, 2010).

IRP1 e IRP2 são proteínas citoplasmáticas que pertencem à família da aconitase e regulam o metabolismo do Fe pela ligação com alta afinidade e especificidade às regiões IREs. Essas são estruturas em *hairpin*, conservadas nas porções não traduzidas dos mRNAs (5'- UTR e 3'- UTR), que codificam proteínas relacionadas ao Fe (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). Segundo Edison, Bajel e Chandy (2008), a formação de complexos IRE-IRP na região 5' - UTR resulta na inibição dos processos transcricionais. Por outro lado, quando o complexo ocorre na região 3'- UTR promove a estabilização do mRNA. Esse processo é chamado de sistema regulatório IRE/IRP e está representado na [Figura 3](#).

Quando ocorre baixa disponibilidade de ferro, IRPs se ligam aos IREs na região 5' - UTR do mRNA da ferritina e ferroportina (FPTN), dentre outros, e bloqueiam a sua tradução, conseqüentemente inibem o armazenamento e a exportação de Fe. Simultaneamente, IRPs também se ligam aos IREs na região 3' - UTR do mRNA do TFR1 e DMT-1, estabilizando-o e aumentando a captação de ferro (TORTI; TORTI, 2013). De modo contrário, níveis altos de ferro promovem a perda da capacidade de ligação entre IRPs e IREs, o que leva a tradução eficiente do mRNA da ferritina e FPTN e diminui a estabilidade do mRNA do TFR1 e DMT-1, conseqüentemente reduzindo os níveis intracelulares de ferro (RECALCATI; MINOTTI; CAIRO, 2010).

Figura 3 – Controle celular do metabolismo de ferro pelo sistema regulatório IRE/IRP.



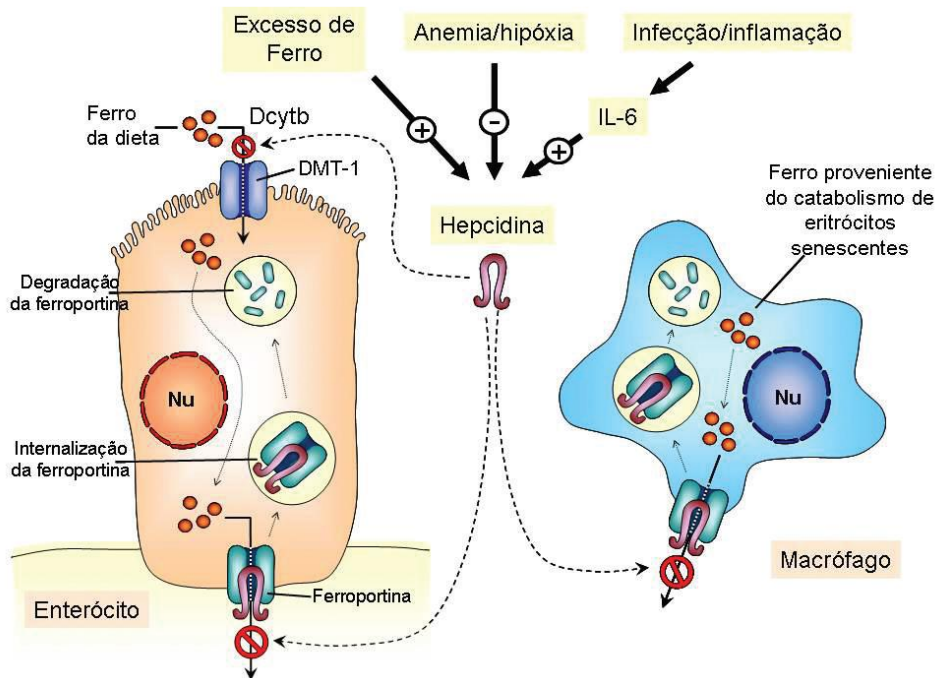
Proteínas envolvidas na absorção, transporte, armazenamento e utilização de ferro são reguladas coordenadamente por este mecanismo. Sob condições de níveis baixos de ferro, IRP1 e IRP2 se ligam aos IREs na região 5' - UTR e reprimem a tradução do mRNA em proteínas envolvidas no armazenamento (Ferritina H e L), uso (eALAS, mAconitase e SDH *Drosophila*) e exportação (ferroportina). De modo contrário, quando em excesso de Fe ocorre a perda da afinidade entre IRP1 e IREs, permitindo a tradução do mRNA em proteínas para armazenamento e utilização do ferro e degradando o mRNA daquelas envolvidas na absorção. **Fonte:** Adaptado de Torti e Torti (2013).

2.3.5.2 Regulação sistêmica da homeostase do ferro

A manutenção da homeostase do ferro sistemicamente no organismo depende da comunicação entre os locais de absorção, utilização, reciclagem e armazenamento (ANDREWS, 2008). Responsável pela regulação da homeostase sistêmica do ferro e comunicação entre esses locais, a hepcidina é um peptídeo antimicrobiano, secretado pelos hepatócitos, que regula negativamente a absorção intestinal de ferro (ANDREWS, 2005; HENTZE et al., 2010).

Os mecanismos de ação da hepcidina ainda não são bem compreendidos. No entanto, acredita-se que esse hormônio iniba a exportação intracelular de Fe ao interagir com a ferroportina (FPTN) (ANDREWS, 2005). De acordo com Hentze et al. (2010), a hepcidina ao se ligar a FPTN promove a sua internalização, ubiquitinação e subsequente degradação lisossomal, conforme representado na [Figura 4](#). Além disso, também inibe a expressão de DMT-1, suprimindo a captação de ferro (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). A FPTN pode ser um elemento chave na conexão entre os sistemas regulatórios celular e sistêmico, uma vez que é regulada por ambos (RECALCATI; MINOTTI; CAIRO, 2010).

Figura 4 – Controle sistêmico do metabolismo de ferro pela hepcidina.



A hepcidina modula a absorção e exportação de ferro pela interação com a FPTN e DMT-1. Fatores como excesso de Fe e estado inflamatório aumentam a expressão da hepcidina. Essa ao formar um complexo com a FPTN promove a sua internalização e degradação. Além disso, impede a absorção de Fe pelo enterócito ao se ligar a DMT-1. Mecanismo semelhante ocorre no macrófago, diminuindo a quantidade de Fe disponível. **Fonte:** Grotto (2008).

Várias observações têm destacado a importância da hepcidina como molécula regulatória: (I) camundongos com redução na expressão da hepcidina aumentaram o estoque de ferro corpóreo. De modo oposto, quando em excesso de Fe, ocorreu o aumento da expressão da hepcidina (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004); (II) a diminuição dos níveis plasmáticos de hepcidina resulta no aumento da FPTN na superfície basolateral dos enterócitos (HARVEY, 2008); (III) mutações no gene *HAMP* (gene que codifica a hepcidina) têm sido identificadas em pacientes portadores de hemocromatose (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004) e associada à fisiopatogênese da anemia da doença crônica (GROTTO, 2008).

A produção de hepcidina é modulada por diversos fatores, incluindo exigências de ferro, hipóxia, estado inflamatório e deficiência de cobre. Outros moduladores *upstream* são as proteínas hemojuvelina (HJV), receptor 2 da transferrina (TFR2) e hemocromatose (HFE) (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008).

2.4 Metabolismo do ferro no músculo

Há consideráveis evidências que demonstram a importância do ferro para o metabolismo do músculo esquelético (MCLANE et al., 1981). Letargia, cansaço, fraqueza, desânimo e redução da capacidade de trabalho são sintomas comuns observados em portadores de anemia (BEARD, 2001). Esses sintomas resultam da diminuição das enzimas que contêm ferro (heme proteínas) (CAMMACK; WRIGGLESWORTH; BAUM, 1990), alterando o sistema de produção de energia (ATP) pela cadeia transportadora de elétrons (POLONIFI et al., 2010). Além disso, Thompson et al. (1993) sugerem que a depleção da hemoglobina e mioglobina resultam na diminuição da capacidade de transporte de oxigênio para o sangue e músculo.

No trabalho desenvolvido por Mclane et al. (1981), ratos alimentados com uma dieta deficiente em ferro durante oito dias diminuíram a atividade das enzimas citocromo c e citocromo oxidase (50%), glicerol-3-fosfato-desidrogenase (GPDH, 26%). Essas enzimas participam da cadeia transportadora de elétrons e são fundamentais no metabolismo energético do músculo (CAMMACK; WRIGGLESWORTH; BAUM, 1990). Além disso, os autores observaram uma redução na capacidade de utilização de oxigênio, aumento da concentração de lactato no músculo quando submetido ao exercício e maior susceptibilidade a fadiga. Em contrapartida, o excesso de ferro também é prejudicial. Reardon e Allen (2009) induziram a sobrecarga de ferro em camundongos por meio da aplicação intraperitoneal de

ferro dextran e avaliaram a atividade enzimática e a resistência ao exercício. Os autores concluíram que a sobrecarga promove o aumento do estresse oxidativo, da atividade de enzimas antioxidantes, reduz a resistência física e causa atrofia muscular.

Polonifi et al. (2010) avaliaram simultaneamente a expressão de doze genes envolvidos nas vias de absorção, transporte e regulação do ferro no fígado e no músculo esquelético de humanos. Dez dos genes estudados por esses autores apresentaram-se expressos em ambos os tecidos (TFR1, HFE, DMT-1, lipocalina, ferroportina, hephaestina, ceruloplasmina, e ferritina H), enquanto hepcidina e receptor 2 da transferrina foram expressos apenas no fígado. Os autores ainda sugerem que o músculo parece participar ativamente na dinâmica do metabolismo do ferro tanto por contabilizar de 10 a 15% do ferro corpóreo como pela alta expressão da hemojuvelina, a qual acredita-se influenciar a expressão da hepcidina.

2.5 Fatores que afetam o conteúdo de ferro na carne

A composição nutricional da carne sofre variação natural decorrente de fatores ambientais, fisiológicos ou genéticos (GIUFFRIDA-MENDOZA et al., 2007). Nesse contexto, a seguir serão apresentados e discutidos alguns desses fatores e como eles influenciam na quantidade de ferro presente na carne.

2.5.1 Fatores ambientais e fisiológicos

2.5.1.1 Idade

Vários estudos comprovam que a quantidade de Fe aumenta com a idade do animal (JACOBSON; FENTON, 1956; PANNIER et al., 2014). Jacobson e Fenton (1956) ao avaliarem a quantidade de ferro no músculo de bovinos abatidos com 32, 48, 64 ou 80 semanas observaram que a quantidade do mineral foi crescente. Entretanto, Giuffrida-Mendonza et al. (2007) ao determinarem a quantidade de minerais no músculo *Longissimus dorsi thoracis* (LDT) de bovinos cruzados (Black Angus, Red Angus, Romo Sinuano e Charolês, todos cruzados com Brahman) e puros (Brahman) abatidos aos 17, 19 e 24 meses concluíram que a quantidade de ferro no músculo em estudo foi crescente até os 19 meses de idade, reduzindo a partir de então.

O decréscimo da concentração de ferro a partir dos 19 meses observado por Giuffrida-Mendonza et al. (2007) vai de encontro ao apresentado por Pannier et al. (2010)

para o quais o aumento da quantidade do mineral é influenciado pelo desenvolvimento muscular. Segundo esses autores, animais mais velhos possuem maior quantidade de fibras oxidativas e, conseqüentemente maior quantidade de ferro. No entanto, restrições nutricionais podem influenciar o tipo de fibra formada e diminuir a concentração de ferro (PANNIER et al., 2014). De acordo com Tajik et al.(2008), a variação no conteúdo mineral entre as idades poderia ser resultado do confundimento dos efeitos de vários fatores, incluindo plano nutricional, estado fisiológico do animal e taxa de crescimento.

2.5.1.2 Sexo

Os estudos de associação entre o conteúdo de ferro e sexo apresentam resultados contraditórios. Na pesquisa de Doornenbal e Murray (1982) que avaliaram 114 bovinos das raças Charolês, Simental, Limousin e Chianina (48 novilhas, 46 novilhos e 20 vacas), os autores não identificaram efeito de sexo sobre o conteúdo de ferro nos músculos *Longissimus dorsi* (LD), *semimembranosus* e diafragma. No entanto, cálcio (Ca), magnésio (Mg), zinco (Zn) e potássio (K) foram afetados. Embora não tenham identificado efeito de sexo ao compararem animais castrados e inteiros, Giuffrida-Mendonza et al. (2007) verificaram uma interação entre sexo e idade. Esses autores observaram uma redução da quantidade de Fe no músculo LDT que foi mais pronunciada nos animais castrados em comparação aos inteiros.

Diferente dos resultados obtidos pelos autores supracitados, ao avaliarem a concentração mineral no músculo LDT e no fígado de búfalos, Tajik et al. (2008) relataram que o sexo afetou a concentração de Fe em ambos os tecidos estudados, para os quais os machos apresentaram maior concentração do mineral. Em ovinos, Pannier et al. (2010, 2014) verificaram maior concentração de Fe ($P < 0,001$), no músculo *L. thoracis lumborum*, em fêmeas do que em machos.

2.5.1.3 Tipo de músculo

O músculo resulta de diferentes tipos de fibras que são classificadas de acordo com suas propriedades contráteis e metabólicas (ODDY et al., 2001). Ainda segundo esses autores as diferentes funções dos músculos resultam do tipo de fibra que o compõem de modo que músculos com maior quantidade de fibras oxidativas apresentam maior quantidade de mioglobina e mitocôndrias em comparação as fibras glicolíticas.

A quantidade de minerais, dentre eles o Fe, foi verificada em sete diferentes cortes comerciais nas raças Hereford e Braford (CABRERA et al., 2010). Nesse estudo, os autores observaram efeitos significativos ($P < 0,00001$) para conteúdo de ferro sobre os cortes cárneos em ambas as raças. Purchas e Busboom (2005) ao avaliaram os níveis de Fe nos músculos *L. lumborum* (LL) e *Tríceps brachii* (TB) em bovinos Angus cruzados observaram maior concentração de Fe no músculo TB do que em LL ($P < 0,0001$). Esses resultados são, possivelmente, devido às diferenças no tipo de fibra que compõe esses músculos. Segundo Pannier et al. (PANNIER et al., 2014), músculos com menor capacidade oxidativa apresentam menor quantidade de ferro.

2.5.1.4 Dieta

Entre todos os fatores ambientais e fisiológicos aqui apresentados a nutrição tem impacto direto e extrema importância na composição nutricional da carne. A variação no *status* nutricional, conforme já mencionado, tem influência direta nos componentes estruturais do músculo, tais como: número e tipo de fibra e, conseqüentemente no conteúdo de ferro (MORTIMER et al., 2014; ODDY et al., 2001). Holló et al. (2007) ao analisarem o efeito de dois sistemas de alimentação sobre o conteúdo mineral e composição de aminoácidos no músculo *Longissimus* em animais *Hugarian Grey* e *Holstein Friesian*, verificaram que o conteúdo de Fe e fósforo foi significativamente maior nos animais cuja dieta era baseada no consumo de forragem.

Jacobson e Fenton (1956) também verificaram que o nível nutricional da dieta ofertada a novilhas holandesas afetou o conteúdo de Fe nos músculos *Psoas major* e *semimembranosus*, mas não o músculo LD. A adição de folhas de chá verde a dieta de novilhas *Japanese Black* reduziu a concentração de ferro no músculo *semimembranosus*, enquanto os músculos *L. thoracis* e *gluteus medius* não foram influenciados (ZEMBAYASHI; LUNT; SMITH, 1999).

2.5.1.5 Interação entre os minerais

A interação do ferro com outros minerais pode afetar positiva ou negativamente a quantidade do mineral no músculo (BEARD; DAWSON, 1997). O compartilhamento dos mecanismos de absorção, transporte e/ou a presença de substâncias quelantes, bem como o balanço dietético podem potencializar o efeito competitivo entre os minerais (SANDSTRÖM, 2001). Embora essas interações possam ocorrer em vários sítios, o

que limita uma maior biodisponibilidade é a absorção na mucosa intestinal (BEARD; DAWSON, 1997). Ainda segundo esses autores, cálcio (Ca^{2+}), cobre (Cu^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) são minerais que interagem afetando a absorção de Fe. O transporte, a captação celular e o armazenamento são afetados pelo cromo (Cr^{2+}), Mn^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} (BEARD; DAWSON, 1997).

A proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT-1) medeia a absorção de Fe no intestino (RECALCATI; MINOTTI; CAIRO, 2010). Entretanto, Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} compartilham o mesmo transportador (GROTTO, 2008). Assim, altas concentrações de Fe podem diminuir a absorção dos outros minerais pela competição com o transportador (SANDSTRÖM, 2001). Suttle (2010) destaca que o excesso de ferro diminui a expressão da DMT-1, como discutido no tópico 2.3.5.1, e como efeito secundário afeta a absorção de Cu^{2+} e Mn^{2+} . Ao induzirem a deficiência de Co^{2+} em bovinos, dentre outros efeitos metabólicos, Stangl, Schwarz e Kirchgessner (1999) observaram um acúmulo crescente de ferro e níquel no fígado.

2.5.2 Fatores genéticos

Embora o balanço mineral dependa, principalmente, do equilíbrio entre suplementação e excreção, além de diversos outros fatores ambientais e fisiológicos, estudos recentes têm verificado que o balanço mineral no músculo bovino é também, pelo menos parcialmente, determinado geneticamente (AHLBERG et al., 2014; MATEESCU et al., 2013a; TIZIOTO et al., 2015a).

O estudo de associação genômica ampla (GWAS) em animais Angus, realizado por Mateescu et al. (2013a), identificou sete *loci* de caracteres quantitativos (*Quantitative Trait Loci*; QTL), em seis cromossomos (1, 2, 7, 10, 15 e 28), que tiveram efeitos importantes para o conteúdo de ferro no músculo LD. Em animais Nelore, Tizioto et al. (2015a), também por meio de GWAS, identificaram dois QTLs importantes, nos cromossomos 7 e 12, influenciando a concentração de ferro. A partir dos dados fenotípicos, de pedigree e o uso de marcadores tipo SNP, ambos os estudos identificaram que a característica possui herdabilidade de magnitude média ($h^2 = 0,48$, MATEESCU et al., 2013a e $h^2 = 0,37$, TIZIOTO et al., 2015a).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) têm sido identificados em genes relacionados à regulação, armazenamento e transporte do ferro e associados ao conteúdo do mineral no organismo (DUAN et al., 2012).

Ao avaliarem o efeito dos polimorfismos tipo SNP nos genes *TFR2* e *SLC40A1*, Duan et al. (2012) identificaram três SNPs no gene *SLC40A1* com efeitos significativos ($P < 0,0007$) no conteúdo de Fe no músculo LD. Casas et al. (2014) relataram uma associação entre polimorfismos nos genes da calpastatina e micro-calpaína com conteúdo de ferro na carne e evidenciaram que genótipos conhecidos por estarem associados com carne mais dura foram também associados com maiores níveis de concentração de ferro.

O efeito genético sobre o conteúdo de ferro em humanos tem sido demonstrado pelo estudo de desordens hereditárias, tais como a hemocromatose (HH) (DUAN et al., 2012). Essa é uma doença autossômica recessiva que causa a sobrecarga de ferro no fígado e outros órgãos devido à mutação *missense* no gene *HFE* (alelos *C282Y* e *H63D*) (HENTZE et al., 2010). Mutações nesse gene são responsáveis pela HH tipo 1, a qual acomete mais de 90% dos pacientes portadores da doença (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008). Embora menos comuns, mas clinicamente importantes, mutações nos genes *TFR2*, *HJV* (hemojuvelina) e *HAMP* (hepcidina) também causam HH em virtude da expressão inadequada de hepcidina (HENTZE et al., 2010).

2.6 Ferro e qualidade de carne

A qualidade da carne é um conceito complexo e inclui tanto aspectos de segurança alimentar e composição nutricional quanto tecnológicos e sensoriais (MUCHENJE et al., 2009). Atributos tais como cor, textura, sabor, quantidade e distribuição de gordura são os principais parâmetros valorizados pelo consumidor no momento da compra (ODDY et al., 2001). Fatores genéticos e ambientais afetam as características histoquímicas, bioquímicas e morfológicas do músculo esquelético, tanto *in vivo* como *post-mortem* (CHOI; KIM, 2009) e por consequência as características de qualidade de carne (MUCHENJE et al., 2009).

Segundo Dauncey, Katusmata e White (2004), a condição nutricional e o ambiente podem influenciar a expressão fenotípica de determinado genótipo, bem como as interações entre esses fatores. Os nutrientes atuam não apenas como fonte de energia (gorduras e carboidratos) ou para a síntese protéica (aminoácidos), mas também participam de vias importantes relacionadas ao desenvolvimento e metabolismo muscular, as quais incluem hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), hormônio da tireoide (TH) e insulina (DAUNCEY; KATSUMATA; WHITE, 2004; DORUP, 2004). Embora presentes em pequenas quantidades na dieta, minerais e micronutrientes

desempenham papel fundamental na regulação do metabolismo corpóreo, incluindo desempenho muscular e utilização de energia (DORUP, 2004).

Além dos fatores nutricionais, diferenças entre raças, sexo, tipo de músculo, envelhecimento, exercício e perfil hormonal são capazes de alterar a estrutura das fibras musculares (CHOI; KIM, 2009). Dauncey, Katusmata e White (2004) destacam que as miofibras podem ser classificadas por sua atividade contrátil (lenta ou rápida) e propriedades metabólicas (oxidativas e glicolíticas), denominando-as como **Tipo I**: lenta e oxidativa; **Tipo IIA**: rápida e oxidativa-glicolítica; **Tipo IIB**: rápida e glicolítica; e **Tipo IIX**: rápida e oxidativa-glicolítica. As fibras do tipo I contêm relativamente maior número de mitocôndrias, maiores quantidades de mioglobina e de enzimas heme-dependentes, tais como os citocromos. Além disso, possuem maior quantidade de lipídeos que servem como fonte de combustível metabólico (CHOI; KIM, 2009). Nesse contexto, fatores que afetam o tipo de fibra e a capacidade oxidativa muscular provavelmente afetam as concentrações de ferro e zinco (PANNIER et al., 2014).

Alterações na estrutura e musculatura em bovinos têm sido associadas a mutações no gene da miostatina (*MSTN*) (WARNER et al., 2010). Morris et al. (2013) avaliaram o efeito do *loci* da *MSTN* sobre a concentração mineral em diferentes tecidos. Os autores observaram que a concentração de ferro foi significativamente afetada tanto no músculo quanto no fígado, para os quais houve redução da quantidade do mineral. No entanto, Pannier et al. (2014) observaram que a seleção de cordeiros Prime australiano com base no valor genético para área de olho de lombo não apresentou resposta correlacionada para conteúdo de ferro e zinco. No entanto, os autores verificaram que a seleção de animais para produção de carne mais magra reduziu a concentração mineral. A redução da deposição de gordura intramuscular aumenta a proporção de fibras oxidativas-glicolíticas (IIX) e a redução do conteúdo do ferro seria, em parte, consequência da menor quantidade de mioglobina nessas fibras (PANNIER et al., 2014).

Corroborando os resultados de Pannier et al. (2014), Holló et al. (2007) ao avaliarem a relação entre o perfil de ácidos graxos e a composição mineral do músculo *Longissimus* observaram que os conteúdos de gordura intramuscular e de ácidos graxos saturados foram negativamente correlacionados à concentração de ferro. Colesterol e ácidos graxos poli-insaturados também apresentaram correlação negativa com conteúdo de ferro nos músculos LD e *M. semitendinosus* (AHLBERG et al., 2014). Nesse mesmo estudo, Ahlberg et al. (2014) sugerem que a seleção para o aumento da concentração de ferro no *M. semitendinosus* levaria ao aumento dos níveis de ácidos graxos monoinsaturados. Diante

desse cenário, é possível que a concentração de ferro ao influenciar o perfil de ácidos graxos acabe por afetar outras características sensoriais e nutricionais de qualidade de carne.

Suculência, sabor/aroma e maciez são importantes características sensoriais influenciadas pela quantidade de gordura intramuscular (CHOI; KIM, 2009; MATEESCU et al., 2013a). Também tem sido demonstrado que o perfil de minerais é importante na determinação desses parâmetros (GARMYN et al., 2011; MATEESCU et al., 2013b). Sabor e suculência foram significativa e positivamente correlacionados ao conteúdo de ferro no músculo LD (NOUR et al., 1983). Resultados semelhantes foram obtidos por Garmyn et al. (2011). No entanto, foram observadas correlações muito fracas (variando de 0,06 a 0,15) entre os parâmetros avaliados. Embora os parâmetros supracitados apresentem correlação significativa, Nour et al. (1983) destacam que a concentração de minerais no músculo é um pobre preditor tanto dos atributos sensoriais como do escore de marmoreio, reforçando o conceito de que esses parâmetros não são fortemente influenciados pelos componentes nutricionais individualmente (GARMYN et al., 2011).

Com relação às características de carcaça, Mateescu et al. (2013a) não identificaram correlações significativas entre a concentração de ferro e peso de carcaça quente, área de olho de lombo, escore de marmoreio e percentagem de gordura pélvica no coração e nos rins. Murray, Doornebal e Martin (1982) investigaram a relação entre o conteúdo de minerais e a maciez nos músculos LD e *semimembranosus*. Embora para o músculo LD não tenham sido encontradas correlações significativas, esses autores observaram que cobre e ferro foram significativamente associados à maciez no músculo *semimembranosus*. A maciez, dentre os vários fatores que a afetam, tem sido associada a diversos marcadores genéticos, principalmente relacionados ao complexo enzimático calpaína-calpastatina (HOCQUETTE et al., 2007; WARNER et al., 2010). Casas et al. (2014) ao investigarem a associação dos marcadores da calpastatina e microcalpaína com o conteúdo de ferro no músculo de novilhos cruzados, observaram que marcadores associados à carne mais dura apresentaram maiores níveis de ferro.

A cor da carne é, na maioria das vezes, o fator primário e determinante no momento da compra (MUCHENJE et al., 2009). As diferenças na coloração da carne refletem não apenas a composição bioquímica das fibras musculares e o conteúdo de mioglobina e mitocôndrias, mas também da exposição ao oxigênio e a luminosidade no ponto de venda (ODDY et al., 2001). As medidas de cor são determinadas pelos parâmetros de luminosidade (L^*), intensidade de vermelho (a^*) e intensidade de amarelo (b^*) (HOCQUETTE et al., 2007), e assim como as demais características são influenciadas por diversos fatores

(MUCHENJE et al., 2009). A dieta é capaz de aumentar a quantidade de ferro no músculo, conforme previamente observado por Jacobson e Fenton (1956). Esses autores também verificaram que o aumento do nível desse mineral foi acompanhado significativamente pelo aumento da intensidade de vermelho nos músculos LD, *semimembranosus* e *P. major*.

Diferenças na cor da carne também têm sido associadas a variações no conteúdo de gordura intramuscular, teor de umidade, dependentes da idade, do conteúdo de mioglobina e do pH final da carne (MUCHENJE et al., 2009). Macclain e Mullins (1969) avaliaram dois grupos de animais, classificados pela força de cisalhamento em macios e duros, e verificaram que os músculos macios apresentaram menor conteúdo de ferro e pigmento total quando comparados ao grupo menos macio. Correlações moderadas entre conteúdo de ferro heme e intensidade de vermelho foram observadas nos músculos LD e *P. major* (PUROHIT et al., 2015). De acordo com Choi e Kim (2009), o nível de pigmento heme é positivamente correlacionado com fibras do tipo I. Em contrapartida, o aumento do número de fibras do tipo IIB em detrimento das fibras do tipo I e IIA está associado ao aumento da perda por gotejamento e da luminosidade (CHOI; KIM, 2009).

De acordo com Oddy et al. (2001), o pH final é determinante na cor da carne. Por sua vez, o pH é determinado pelo conteúdo de glicogênio no momento do abate (WARNER et al., 2010). Assim, menores ou maiores níveis de glicogênio podem afetar a respiração mitocondrial, levando a produção de carne escura ou pálida (ODDY et al., 2001). No estudo de associação de polimorfismos de genes candidatos com características tecnológicas e sensoriais de qualidade de carne, Reardon et al. (2010) reportaram SNPs nos genes calpastatina (*CAST*), amp-activated protein kinase, gamma-3 subunit (*PRKAG3*), growth hormone receptor (*GHR*) e stearoyl coA desaturase (*SCD*) com os parâmetros de cor e pH nos músculos *L. thoracis lumborum* e *semimembranosus*. Esses autores sugerem que a calpastatina poderia influenciar a taxa e a extensão da glicólise e declínio do pH, afetando a cor e a capacidade de retenção de água.

2.7 Transcriptômica e quantificação da expressão gênica

A maioria das características de importância econômica na produção de bovinos é dita complexa ou multifatorial, o que indica que elas são influenciadas por vários genes e fatores ambientais. Diversas são as abordagens que têm sido empregadas para identificar genes e mutações subjacentes aos fenótipos de interesse (ANDERSSON;

GEORGES, 2004). Dentre essas abordagens, as análises de transcriptoma têm se apresentado como alternativa, conjuntamente com as demais, na dissecação de características complexas.

Uma vez que o transcriptoma consiste no conjunto completo de transcritos em uma célula de acordo com o estágio de desenvolvimento e condições fisiológicas específicas (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009), a variação genética entre os indivíduos é determinante na variação fenotípica e a adoção de estudos de expressão permite explorar os efeitos genéticos em processos celulares (MONTGOMERY et al., 2010). Os avanços observados recentemente têm permitido identificar vias biológicas importantes, mecanismos regulatórios, até então desconhecidos, que participam na determinação de fenótipos complexos (HOCQUETTE et al., 2006).

Tecnologias de sequenciamento ou hibridização de DNA têm sido desenvolvidas para inferir e quantificar o transcriptoma (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Abordagens baseadas na PCR em tempo real (qPCR), microarranjos de DNA e análise serial de expressão gênica, embora tenham permitido grandes avanços, apresentam limitações metodológicas e/ou financeiras (MARIONI et al., 2008; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). No entanto, a evolução das plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next generation sequencing*) surgiu como alternativa a essas tecnologias para avaliação da expressão global (MONTGOMERY et al., 2010).

O sequenciamento de mRNA permite o mapeamento e a quantificação dos transcritos expressos com alta processividade, de forma quantitativa e mais acurada, com menor custo quando comparado a outras tecnologias (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Além dessas vantagens, outras aplicações do RNAseq incluem análises de expressão diferencial e identificação de isoformas resultantes de *splicing*; descoberta de novos transcritos, tais como RNAs longos não codificantes (lncRNAs), microRNAs; e expressão alelo-específica (MARIONI et al., 2008; SIMS et al., 2014; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Todas essas possibilidades têm permitido entender tanto a organização do genoma como a variação genética, além de gerar *insights* sobre a complexidade dos mecanismos regulatórios em mamíferos (SIMS et al., 2014).

A análise de expressão diferencial propicia identificar genes que mudaram significativamente sua abundância entre condições experimentais (TRAPNELL et al., 2012). Para tal, diversas ferramentas de bioinformática estão disponíveis de modo a processar os dados de sequenciamento e gerar as informações sobre o nível de expressão. As análises de RNAseq são classificadas em três categorias: (1) alinhamento dos *reads*; (2) montagem dos transcritos e (3) quantificação dos transcritos e genes (TRAPNELL et al., 2012). Esses autores

implementaram duas ferramentas que permitem realizar tais análises, assim como visualizar os resultados. De modo geral, essas análises são executadas da seguinte maneira: o *Tophat* realiza o alinhamento dos *reads* ao genoma de referência e identifica as junções de *splicing*. Esses alinhamentos são então utilizados pelo *Cufflinks* que monta os transcritos, estima sua abundância e determina, para as condições testadas, os genes e transcritos diferencialmente expressos (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009; TRAPNELL et al., 2012), os quais podem ser visualizados pelo *CummeRbund* (GOFF; TRAPNELL; KELLEY, 2012).

A avaliação de vias biológicas alteradas e genes com expressão diferencial resultantes do desbalanço no metabolismo do ferro têm sido descritos em estudos com camundongos (RODRIGUEZ et al., 2007) e ratos (KAMEI et al., 2010). Ao avaliarem o perfil de expressão do músculo esquelético e cardíaco de camundongos com sobrecarga de ferro, Rodriguez et al. (2007) verificaram mudanças induzidas pelo Fe na expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, glicose, transcrição e resposta ao estresse celular. Expressão diferencial também foi observada por Kamei et al. (2010) ao determinarem o efeito da deficiência de ferro na expressão de genes hepáticos. Assim como no estudo de Rodriguez et al. (2007), os autores observaram que genes envolvidos no metabolismo de colesterol, aminoácidos e glicose foram *up-regulated* nos animais com deficiência de Fe. Além dessas vias, o gene que codifica a hepcidina, hormônio que regula a absorção de ferro, e o receptor de transferrina apresentaram-se, respectivamente, *down* e *up-regulated*.

Embora de fundamental importância para o metabolismo, até a presente data, são ausentes estudos que avaliem como a deficiência ou sobrecarga de ferro podem alterar a expressão gênica e suas consequências para o metabolismo em bovinos. Os trabalhos desenvolvidos limitam-se apenas a avaliar as mudanças de parâmetros metabólicos decorrentes de dietas experimentais, assim como a interação com outros nutrientes (HOLLÓ et al., 2007; STANGL; SCHWARZ; KIRCHGESSNER, 1999) ou características sensoriais e tecnológicas de qualidade de carne (GARMYN et al., 2011; PANNIER et al., 2014), sem considerar os mecanismos genéticos que participam dessas vias. Assim, o perfil transcricional e o conhecimento dos genes que afetam características biológicas importantes poderiam auxiliar na compreensão dos processos fisiológicos influenciados pelo conteúdo de ferro no músculo e sua influência sobre a qualidade de carne.

2.8 HIPÓTESE

Diferenças de conteúdo de ferro no músculo de bovinos podem estar relacionadas a mudanças na fisiologia muscular devido a alterações na expressão de genes nesse tecido.

2.9 OBJETIVOS

Identificar genes e vias diferencialmente expressos em animais Nelore geneticamente divergentes para conteúdo de ferro, bem como estabelecer interações gênicas a fim de compreender o possível papel desses genes em processos biológicos relacionados a características de qualidade da carne.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, amostras e fenótipos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo comitê de uso e bem estar animal da EMBRAPA em parecer sancionado pelo seu presidente Dr. Rui Machado.

Foram produzidos 790 novilhos machos, descendentes de 34 touros registrados da raça Nelore, que compõem famílias de meio-irmãos. A seleção dos touros foi realizada a partir de consultas aos catálogos das principais centrais de inseminação do país. Foram analisados 616 touros Nelore, das variedades mocha e aspada, dos quais 34 foram eleitos, mediante os seguintes critérios: i) disponibilidade de sêmen no mercado, cujo valor não excedesse R\$ 50,00 a dose; ii) touros pertencentes às genealogias representativas das principais linhagens que compõem a raça Nelore, de uso comercial mais frequente; e iii) menor grau de parentesco entre eles.

A população foi gerada em três estações de monta compreendendo os anos de 2007 a 2009, por meio de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Os animais foram criados na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada na cidade de São Carlos, SP, na Embrapa Gado de Corte, em Campo Grande, MS, e em três propriedades particulares dos Estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Após a recria, os animais foram confinados nas duas unidades da Embrapa, onde foram avaliados para características de eficiência alimentar, crescimento e deposição de gordura.

A dieta fornecida aos animais era composta por silagem de milho contendo, no mínimo, 35% de matéria seca e alto teor de grãos, concentrado constituído de milho em grão moído, farelo de soja, calcário calcítico, mistura mineral, ureia e monensina sódica (Rumensin®). A dieta, numa proporção de 60:40 (volumoso:concentrado), foi formulada para ter 13% de proteína bruta e 71% de nutrientes digestíveis totais estimados. No período de confinamento, a dieta foi fornecida duas vezes ao dia e a quantidade de ração oferecida (silagem de milho e concentrado) foi ajustada em função das sobras observadas, procurando garantir consumo à vontade. O consumo foi mensurado diariamente e as sobras, sempre pela manhã, retiradas e pesadas.

Após cerca de 100 dias de confinamento, com idade média de 25 meses, foram abatidos e amostras do músculo *Longissimus dorsi* (LD), na região entre a 11ª e 13ª costelas, foram coletadas. As medidas de composição, qualidade da carcaça e da carne foram também

coletadas. Os animais nascidos em 2007 foram abatidos de dezembro de 2009 a fevereiro de 2010, os nascidos em 2008, de novembro de 2010 a janeiro de 2011 e os nascidos em 2009, de novembro de 2011 a janeiro de 2012. As amostras foram utilizadas para mensuração do conteúdo de minerais e extração de RNA.

A partir da população referência supracitada foram utilizados 373 novilhos Nelore, filhos dos 34 touros selecionados e gerados nas duas primeiras safras. Além disso, o número médio de filhos por touro foi de 20.

As amostras do músculo LD ($n = 373$) foram liofilizadas e alíquotas de aproximadamente 0,1 g foram pesadas e digeridas em micro-ondas (Ethos – 1600, a Milestone – MLS, Sorisole, Itália), utilizando 2 mL de HNO₃ concentrado e subfervido, 2 mL de H₂O₂ (30 % w/w) e 6 mL de água ultrapura. O conteúdo de ferro do músculo LD foi determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES; Vista Pro-CCD ICP-OES[®], Varian, Mulgrave, Austrália) no comprimento de 238,204 nm. A calibração linear foi calculada com até cinco pontos, os quais foram preparados a partir de soluções analíticas padrão. Fígado bovino 1557b e músculo bovino 8414 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, NIST Gaithersburg, MD, EUA) foram utilizadas para confirmação dos resultados do conteúdo de ferro (TIZIOTO et al., 2015b).

Os componentes de variância e os valores genéticos genômicos estimados (GEBV) para a amostra de 373 novilhos foram obtidos por meio de uma abordagem *Bayesiana* implementada no programa Gensel (FERNANDO; GARRICK, 2009), a qual foi anteriormente descrita por Tizioto et al. (2015a). O modelo estatístico utilizado incluiu os efeitos fixos de grupos contemporâneos, formados utilizando os dados de local de nascimento ($n = 4$) e de confinamento ($n = 2$), estação de monta ($n = 2$) e grupo de abate; a idade do animal ao abate foi incluída como covariável (TIZIOTO et al., 2015a). Os animais ($n = 373$) foram classificados de acordo com o GEBV para conteúdo de ferro (CFe) e selecionados oito animais extremos, sendo quatro com alto GEBV (ACFe) e quatro com baixo GEBV (BCFe).

3.2 Extração do RNA, preparo das bibliotecas e sequenciamento

O RNA total dos oito animais selecionados foi extraído individualmente a partir de 100 mg do músculo LD utilizando TRIzol[®] (Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante, e analisados no *Bioanalyzer 2100*[®] (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A fim de garantir qualidade adequada de RNA, o valor mínimo para a integridade do RNA total adotado foi de oito.

As bibliotecas de RNA, para cada amostra, foram preparadas utilizando o *TruSeq RNA Sample Preparation Kit* (Illumina, San Diego, CA) a partir de 2 µg de RNA total, conforme o protocolo *TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 guide* (Illumina, San Diego, CA). O *Bioanalyzer 2100*[®] (Agilent, Santa Clara, CA, USA) foi utilizado para estimar o tamanho médio das bibliotecas, bem como o PCR quantitativo com o KAPA Library Quantification kit (KAPA Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para quantificá-las. A clusterização e sequenciamento foram realizados no *Illumina HiSeq 2500*[®] (Illumina, San Diego, CA) a fim de produzir *paired-end reads* de 100 bp. O preparo das bibliotecas e o sequenciamento foram realizados no Centro de Genômica da ESALQ (Piracicaba, SP).

3.3 Controle de qualidade e mapeamento dos reads

Após a remoção dos adaptadores de sequenciamento e *reads* de baixa complexidade por meio do programa Seqclean (<http://sourceforge.net/projects/seqclean/files/>), os *reads* foram mapeados ao genoma de referência bovino (*Bos taurus* UMD3.1, http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index/) utilizando o programa Tophat (v2.0.11) (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009). O mapeamento foi realizado em cada amostra independentemente, permitindo até dois *mismatches* por *read*.

3.4 Montagem dos transcritos e estimação da abundância

A montagem dos transcritos foi realizada com o programa *Cufflinks* (v2.2.1) (TRAPNELL et al., 2010), para o qual foi fornecido um arquivo de anotação de referência. Além disso, o *Cufflinks* estimou a abundância dos transcritos, cujo nível de expressão foi determinado pelo número normalizado de fragmento por kilobase por milhão de fragmentos mapeados (FPKM). Uma vez montados os transcritos, individualmente para cada amostra, o *Cuffmerge* (v2.0.2) gerou um arquivo único de anotação, unindo de maneira parcimoniosa os transcritos montados pelo *Cufflinks* (TRAPNELL et al., 2012).

3.5 Identificação de genes diferencialmente expressos

A análise de expressão diferencial foi realizada pelo programa *Cuffdif*, o qual comparou, a partir da abundância dos *reads* para cada transcrito, transcrito primário ou gene, o nível de expressão entre os tratamentos e testou a significância estatística das mudanças observadas entre as amostras, adotando um modelo estatístico linear de máxima

verossimilhança (TRAPNELL et al., 2012). A correção para múltiplos testes foi realizada utilizando a metodologia de *Benjamini-Hochberg* ($q\ value \leq 0,05$) implementada pelo programa *Cuffdiff*.

Os valores de FPKM foram utilizados para determinação do *fold change* ($\log_2\text{fold change}$). Para os genes DE, o sinal do \log_2 (*fold change*) foi adotado como critério para classificação dos genes em *up* e *down-regulated* ($False\ Discovery\ Rate \leq 0,05$).

O pacote *CummeRbund*, implementado no programa R, foi adotado para visualização, manipulação e exploração dos dados (GOFF; TRAPNELL; KELLEY, 2012).

3.6 Classificação funcional dos genes, análise de vias canônicas e redes gênicas

A categorização funcional com base nos termos do *Gene Ontology* (GO) foi realizada conjuntamente para os genes *up*- e *down-regulated*. Além disso, os termos do *GO-slim ontology* (termos de alto nível do GO) foram utilizados para focar nos processos biológicos mais importantes (RHEE et al., 2008) adotando o software WEB-based Gene set Analysis Toolkit (WebGestalt) (ZHANG; KIROV; SNODDY, 2005). Foram consideradas enriquecidas as top dez categorias para cada termo do GO baseado no $p\ value$ ajustado para múltiplos testes ($adjP < 0,05$).

O *Functional Annotation Cluster*, ferramenta do software *Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009), foi utilizado a fim de construir módulos biológicos com base em agrupamentos de termos funcionais relacionados para ambas as categorias de genes DE (DAMON et al., 2012). Foram considerados significativos *clusters* com *EASE score* $< 0,1$, o qual é calculado a partir da modificação do Teste Exato de Fisher (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009).

Uma abordagem adicional para identificar vias metabólicas sobre-representadas e redes gênicas foi realizada utilizando o programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA[®], QIAGEN, Redwood City; <http://www.ingenuity.com>). O IPA[®] permite explorar mecanismos, vias e funções nos quais os genes DE participam a partir das relações estabelecidas entre genes, RNAs e proteínas compreendidas no *Ingenuity Pathways Knowledge Base* (IPKB) (QIAGEN, Redwood City; <http://www.ingenuity.com>). No IPKB as informações são manualmente curadas a partir da literatura científica e são modeladas de forma a ajudar na compreensão e interpretação do significado biológico dos dados (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>).

Os genes DE foram convertidos aos seus homólogos humanos correspondentes no banco de dados do IPA[®] e conjuntamente aos valores de *fold change* e *p value*, resultantes do *Cuffdiff*, foram analisados no *Core analysis function*. Foram considerados significativas vias metabólicas e processo biológicos com $p < 0,05$ calculado pelo *right-tailed Fisher Exact Test*, o qual compara o número de genes DE ao número total de ocorrências desses genes no IPKB.

4 RESULTADOS

4.1 Grupo fenotípico, mapeamento e montagem dos transcritos

Animais com diferentes conteúdos de ferro (CFe) foram selecionados com base no GEBV estimado em um estudo anterior de associação genômica ampla (GWAS) nessa mesma população experimental. A análise de GWAS, assim como a estatística descritiva para toda a população ($n = 373$) foram descritas previamente (TIZIOTO et al., 2015a). O resumo dos dados fenotípicos de CFe, os GEBVs, o número e o percentual de *reads* mapeados são apresentados na [Tabela 1](#).

As variâncias genética e residual, assim como a herdabilidade para CFe obtida a partir dessa população foram 0,15, 0,31 e 0,32, respectivamente (TIZIOTO et al., 2015a). Os valores de GEBV obtidos para os 373 animais foram ranqueados e quatro animais com alto e quatro com baixo GEBV para CFe (grupos ACFe e BCFe, respectivamente) foram selecionados para serem sequenciados. As médias do conteúdo de ferro entre os dois grupos foram estatisticamente diferentes conforme verificado pelo teste-T ($p \text{ valor} = 0,001547$). Vale destacar que os animais utilizados nesse estudo não representam extremos individuais para outras características, tais como: espessura de gordura subcutânea ($p \text{ valor} = 0,1634$), área de olho de lombo ($p \text{ valor} = 0,943$) e extrato etéreo ($p \text{ valor} = 0,3796$) ([Tabela 2](#)).

Foram produzidos pelo *Illumina HiSeq 2500* (*Illumina, Inc., San Diego, CA*) um total de 150,49 milhões de *reads*, sendo o número médio total de *reads* brutas por amostra foi de 18,8 milhões. Após o controle de qualidade dos dados brutos, realizado por meio do programa *Seqclean*, o programa *Tophat* (v2.0.11) (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009) foi empregado para mapear os fragmentos (*reads*) contra o genoma bovino de referência (*Bos taurus* UMD 3.1). O número médio de *reads* mapeados estimado pelo *Tophat* (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009) foi de 9,13 milhões, correspondente a 90,3% do total de *reads*.

Tabela 1 – Conteúdo de ferro no músculo (CFe), valor genético genômico estimado (GEBV), número de *reads* após limpeza, número e percentual de *reads* mapeados para todos os animais.

Animal	Categoria	Teor de Fe ^a	GEBV	Reads ^b	Reads mapeadas ^c	% ^d
NE002007	BCFe	9,75	-1,436	6,66	6,02	90,4
NE001681	BCFe	18,30	-1,006	14,27	12,84	89,9
NE001937	BCFe	1,41	-0,459	13,85	12,53	90,5
NE003285	BCFe	0,90	-1,261	6,18	5,59	90,4
Média – BCFe^e		7,59*	-1,041	10,24	9,25	90,3
NE001805	ACFe	89,60	0,167	11,95	10,77	90,1
NE001882	ACFe	51,57	0,162	4,42	3,99	90,3
NE003837	ACFe	56,44	0,166	18,29	16,51	90,3
NE002003	ACFe	37,19	0,169	5,28	4,82	91,3
Média – ACFe^f		58,70*	0,164	9,99	9,02	90,5

^amg/kg; ^bmilhões de *reads* após a limpeza; ^cmilhões de *reads* mapeadas; ^dporcentagem de *reads* mapeadas;

^eBCFe – grupo de baixo GEBV para conteúdo de Fe; ^fACFe – grupo de alto GEBV para conteúdo de Fe.

*Estatisticamente diferentes pelo teste-T (p valor = 0,001547).

Tabela 2 – Característica de composição e qualidade carne para os animais selecionados.

Animal	Categoria	Características ^a					
		EGS	EE	AOL	FC0	FC7	FC14
NE002007	BCFe	4,90	3,75	42,50	9,12	6,89	4,25
NE001681	BCFe	6,00	3,99	73,25	8,46	4,85	3,41
NE001937	BCFe	6,00	1,58	54,50	7,81	2,90	1,78
NE003285	BCFe	3,80	2,20	59,25	9,94	6,63	7,23
Média – BCFe^b		5,18	2,88	57,38	8,83	5,32	4,17
NE001805	ACFe	7,60	3,61	60,50	9,59	4,02	3,10
NE001882	ACFe	3,30	2,84	58,00	6,30	3,95	3,45
NE003837	ACFe	4,30	1,39	57,00	7,48	2,87	2,82
NE002003	ACFe	5,40	1,38	48,00	10,26	5,84	5,18
Média – ACFe^c		5,15	2,31	55,88	8,41	4,17	3,64

^aEGS: Espessura de gordura subcutânea (mm); EE: extrato etéreo (%); AOL: Área de olho de lombo (cm²); FC:

Força de cisalhamento 24 horas (FC0); 7 dias (FC7) e 14 dias (FC14) após o abate (Kg/f). ^bBCFe – grupo de baixo GEBV para conteúdo de Fe; ^cACFe – grupo de alto GEBV para conteúdo de Fe.

A montagem dos transcritos e a estimativa de suas abundâncias foram realizadas com o programa *Cufflinks* (v2.2.1) (TRAPNELL et al., 2010). No total 606.378 transcritos foram identificados e classificados pelo *Cuffmerge* (Figura S1, anexos). Destacaram-se, principalmente, o elevado número de potenciais novas isoformas (59% dos transcritos) e com correspondência completa (39,6%). Segundo Wang et al. (2008), eventos

de *splicing* alternativo são comuns em eucariotos, indicando a complexidade funcional de organismos superiores.

Para as condições avaliadas foram identificados 25.208 genes, dos quais 2.802 codificam proteínas preditas ou ainda não caracterizadas e 4.857 são novos genes ainda não anotados segundo o *Cufflinks* (TRAPNELL et al., 2010). A qualidade do sequenciamento e a distribuição dos transcritos entre os grupos estudados são apresentados como boxplot do \log_{10} dos valores de FPKM (Figura S2). Os dados apresentam distribuição assimétrica negativa, sendo que os valores da mediana e dos quartis são similares entre os grupos de ACFe e BCFe.

4.2 Identificação dos genes diferencialmente expressos

A variação no padrão de expressão gênica entre os animais nas condições avaliadas permitiu identificar 63 genes DE ($q < 0,05$), dos quais 49 são anotados e foram utilizados nas análises de enriquecimento funcional e identificação de vias metabólicas.

Para os genes DE, 18 genes foram classificados como *up-regulated* (Tabela 3) e 31 como *down-regulated* (Tabela 4) para os animais pertencentes ao grupo BCFe. Diferenças, similaridades e a variabilidade entre os grupos estão representadas na clusterização hierárquica realizada a partir dos genes DE e dos valores individuais do \log de FPKM, a qual está representada no *heatmap* da Figura S3. A separação das replicatas, de acordo com as condições testadas no presente estudo, observadas no *heatmap*, é confirmada pela análise de componentes principais (PCA) (Figura S4), as quais demonstram que a abordagem aqui utilizada foi suficiente para capturar a variação genética resultante das diferenças fenotípicas.

Genes lipogênicos, tais como Cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1 (*CYP4B1*), Fatty acid binding protein 4, adipocyte (*FABP4*), Fatty acid synthase (*FASN*) e Thyroid hormone responsive (*THRSP*) apresentaram-se *down-regulated* em animais com BCFe. Além desses, o gene Component complemente 3 (*C3*), que codifica uma adipocina com função imunológica, foi também *down-regulated*. Por outro lado, os genes Perilipin 5 (*PLIN5*) e Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6 (*SLC27A6*), relacionados a regulação da deposição de lipídeos e ao transporte de ácidos graxos, apresentaram-se *up-regulated*. Genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento celular, tais como Versican (*VCAN*), Tenascin C (*TNC*) e Regulador de calcineurina 1 (*RCANI*) foram encontrados como *down-regulated* no grupo BCFe.

Tabela 3 – Genes identificados como significativamente *up-regulated* no músculo *L. dorsi* de animais Nelore de baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro comparados a animais com alto valor genético genômico.

Ensembl Gene ID	Gene (símbolo)	Nome do gene	ACFe ^a (FPKM)	BCFe ^b (FPKM)	log ₂ (FC) ^c	qvalue
UNCHARACTERIZED	<i>LOC100848684</i>	-	0,994	6,333	2,672	0,0125
ENSBTAG00000013598	<i>RSPO2</i>	R-spondin 2	1,345	5,381	2,001	0,0125
ENSBTAG00000019588	<i>BLA-DQB</i>	MHC class II antigen	5,327	17,210	1,692	0,0125
ENSBTAG00000004860	<i>SLC27A6</i>	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6	2,676	8,000	1,580	0,0125
ENSBTAG00000030913	<i>MX1</i>	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	2,026	5,824	1,523	0,0125
ENSBTAG00000005078	<i>UCHL1</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	3,078	8,542	1,472	0,0312
ENSBTAG00000014818	<i>MYLK3</i>	Myosin light chain kinase 3	1,713	4,560	1,413	0,0125
ENSBTAG000000031209	<i>SLC22A4</i>	Solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4	6,663	16,550	1,313	0,0125
ENSBTAG00000014538	<i>HPCAL4</i>	Hippocalcin like 4	1,249	3,079	1,302	0,0125
ENSBTAG00000014628	<i>OAS1</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kda	2,495	5,990	1,263	0,0125
ENSBTAG00000017461	<i>SLC16A3</i>	Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	18,307	37,000	1,015	0,0125
ENSBTAG00000012335	<i>UBA7</i>	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	3,476	6,293	0,856	0,0487
ENSBTAG00000021481	<i>CA14</i>	Carbonic anhydrase XIV	17,449	30,935	0,826	0,0125
ENSBTAG000000036363	<i>MIR133A-1</i>	-	20,789	36,738	0,821	0,0125
ENSBTAG000000008953	<i>TAP1</i>	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	5,335	9,259	0,795	0,0487
ENSBTAG000000038464	<i>PLIN5</i>	Perilipin 5	13,355	22,802	0,772	0,0125
ENSBTAG00000006013	<i>NT5DC3</i>	5'-nucleotidase domain containing 3	6,244	10,661	0,772	0,0125
ENSBTAG00000000569	<i>HES1</i>	Hairy and enhancer of split 1, (<i>Drosophila</i>)	29,718	49,604	0,739	0,0125

^aACFe – Grupo de alto GEBV para CFe; ^bBCFe – Grupo de baixo GEBV para CFe; ^clog₂ FC – log₂ fold change entre ACFe/BCFe.

Tabela 4 – Genes identificados como significativamente *down-regulated* no músculo *L. dorsi* de animais Nelore de baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro comparados a animais com alto valor genético genômico.

Ensembl Gene ID	Gene (símbolo)	Nome do gene	ACFe ^a (FPKM)	BCFe ^b (FPKM)	log ₂ (FC) ^c	qvalue
ENSBTAG00000020056	<i>COL12A1</i>	Collagen, type XII, alpha 1	7,443	4,596	-0,696	0,0311
ENSBTAG00000002080	<i>NOV</i>	Nephroblastoma overexpressed	18,160	10,629	-0,773	0,0125
ENSBTAG00000037526	<i>FABP4</i>	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	86,012	49,279	-0,804	0,0125
ENSBTAG00000015980	<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	11,512	6,475	-0,830	0,0125
ENSBTAG00000002178	<i>PPL</i>	Periplakin	3,093	1,666	-0,892	0,0231
ENSBTAG00000019107	<i>GAS7</i>	Growth arrest-specific 7	3,790	2,040	-0,894	0,0311
ENSBTAG00000002215	<i>GFPT2</i>	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	7,603	4,063	-0,904	0,0125
ENSBTAG00000015434	<i>DSTN</i>	Destrin (actin depolymerizing factor)	59,435	31,252	-0,927	0,0125
ENSBTAG00000032774	<i>C28H10orf116</i>	Chromosome 28 open reading frame	77,715	40,357	-0,945	0,0402
ENSBTAG00000011207	<i>CNN1</i>	Calponin 1, basic, smooth muscle	16,474	8,370	-0,977	0,0125
ENSBTAG00000015988	<i>MYH11</i>	Myosin, heavy chain 11, smooth muscle	16,100	8,164	-0,980	0,0125
ENSBTAG00000006729	<i>ARID5B</i>	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	21,826	10,826	-1,012	0,0125
ENSBTAG00000010285	<i>MMRN1</i>	Multimerin 1	5,529	2,732	-1,017	0,0125
UNCHARACTERIZED	<i>LOC100848012</i>	-	6,358	2,977	-1,095	0,0311
UNCHARACTERIZED	<i>LOC100848883</i>	-	6,006	2,726	-1,139	0,0231
ENSBTAG00000014906	<i>VCAN</i>	Versican	7,353	3,289	-1,161	0,0125
ENSBTAG00000014614	<i>ACTG2</i>	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	18,307	8,019	-1,191	0,0125
ENSBTAG00000039035	<i>HSPA6</i>	Heat shock 70kda protein 6 (HSP70B')	9,216	4,019	-1,197	0,0125
ENSBTAG00000001257	<i>AGTPBP1</i>	ATP/GTP binding protein 1	20,313	8,810	-1,205	0,0125
ENSBTAG00000020035	<i>RCAN1</i>	Regulator of calcineurin 1	125,998	54,342	-1,213	0,0125
ENSBTAG00000003120	<i>ZNF385B</i>	Zinc finger protein 385B	3,797	1,616	-1,233	0,0231
ENSBTAG00000000575	<i>TNC</i>	Tenascin C	2,798	1,059	-1,401	0,0125

^aACFe – Grupo de alto GEBV para CFe; ^bBCFe – Grupo de baixo GEBV para CFe; ^clog₂ FC – log₂ fold change entre ACFe/BCFe.

Continuação da Tabela 4...

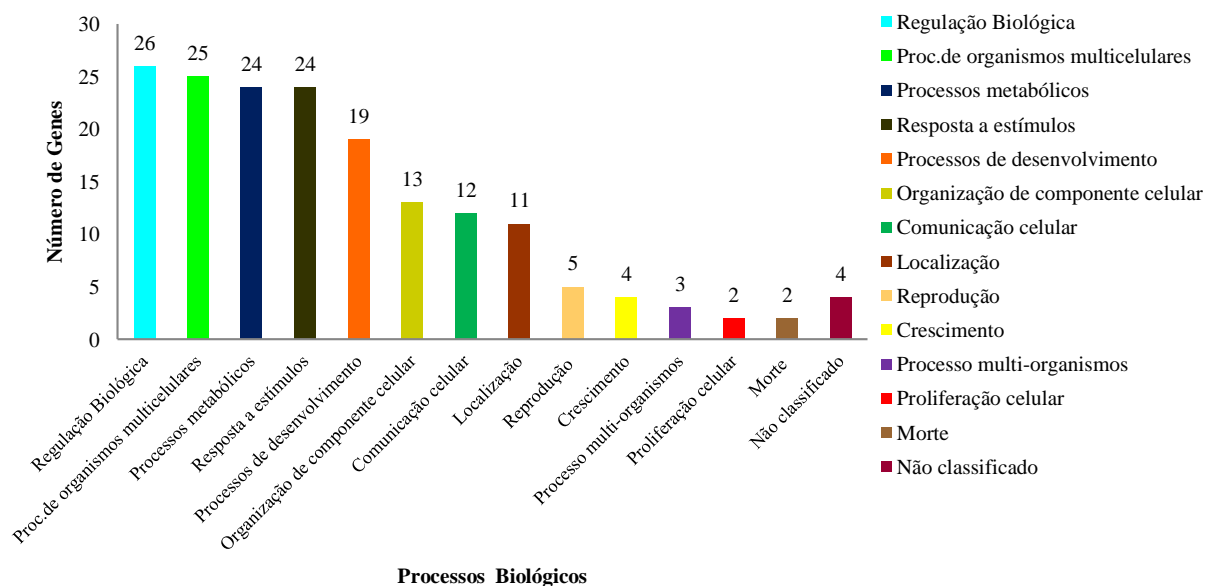
Ensembl Gene ID	Gene (símbolo)	Nome do gene	ACFe ^a (FPKM)	BCFe ^b (FPKM)	log ₂ (FC) ^c	qvalue
ENSBTAG00000019587	<i>PII5</i>	Peptidase inhibitor 15	2,098	0,732	-1,518	0,0125
UNCHARACTERIZED	<i>LOC100848726</i>	-	101,140	30,394	-1,734	0,0125
ENSBTAG00000018223	<i>CHI3L1</i>	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	5,485	1,610	-1,769	0,0125
ENSBTAG00000014340	<i>KERA</i>	Keratocan	5,333	1,520	-1,811	0,0125
ENSBTAG00000011666	<i>THRSP</i>	Thyroid hormone responsive	12,927	3,392	-1,930	0,0125
ENSBTAG00000011976	<i>CYP4B1</i>	Cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	13,993	3,256	-2,104	0,0125
ENSBTAG00000038067	<i>MT1A</i>	Metallothionein 1A	32,842	4,991	-2,718	0,0125
ENSBTAG00000017280	<i>C3</i>	Complement component 3	3,679	0,506	-2,862	0,0125
ENSBTAG00000009876	<i>C4BPA</i>	Complement component 4 binding protein, alpha	2,067	0,197	-3,393	0,0125

^aACFe – Grupo de alto GEBV para CFe; ^bBCFe – Grupo de baixo GEBV para CFe; ^clog₂ FC – log₂ fold change entre ACFe/BCFe.

4.3 Enriquecimento funcional e vias metabólicas

A fim de melhor compreender o papel dos genes DE, análises de enriquecimento funcional foram realizadas conjuntamente para todos os 49 genes identificados. Com relação aos genes DE, 45 deles foram categorizados em 13 grupos funcionais (Figura 5). Os termos mais representados para processos biológicos pelo *GO-slim* foram regulação biológica, processos de organismos multicelulares e processos metabólicos. Os grupos funcionais identificados a partir dos genes DE pelo WebGestalt ($adjP < 0,05$) foram relacionados ao metabolismo de lipídeos, triglicerídeos e acilglicerol. Além desses, outros grupos apontados foram: desenvolvimento de células do músculo estriado e organização da estrutura da actomiosina (Tabela 5).

Figura 5 – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do *Gene Ontology* (*GO-Slim*) para os genes diferencialmente expressos identificados em animais Nelore com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro no músculo *L. dorsi*.



Cada categoria do processo biológico é representada por uma barra. O número de genes por categoria é indicado acima da barra.

Tabela 5 – Processos biológicos significativamente enriquecidos pelo WebGestalt para os genes diferencialmente expressos no músculo *L. dorsi*, comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.

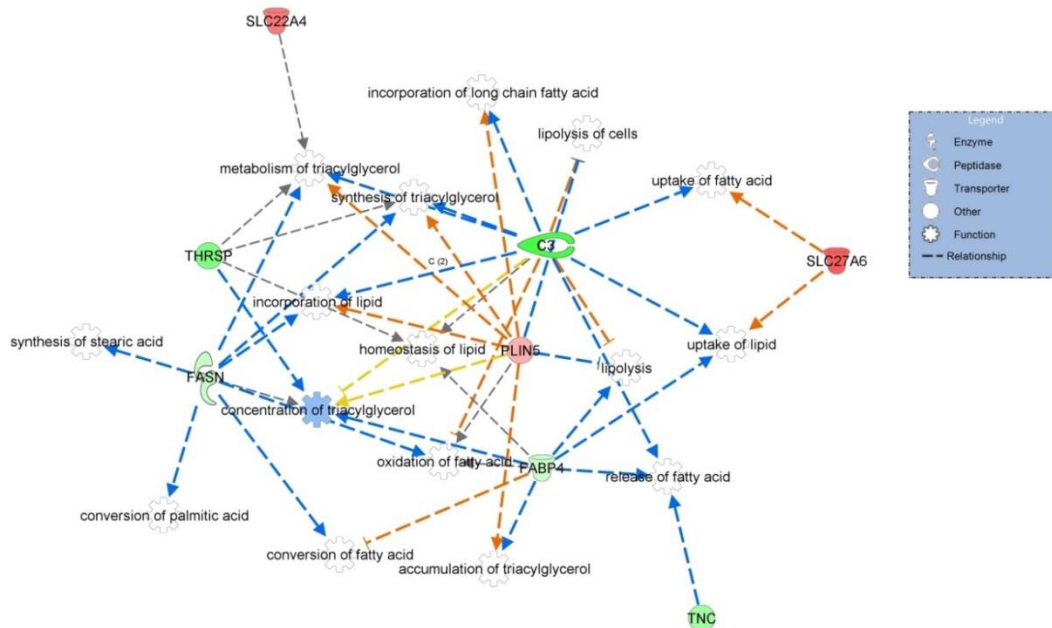
GO ID	Termo	Genes	C ^a	E ^b	R ^c	rawP ^d	adjP ^e
0006638	Processo metabólico de lipídeos neutros	<i>C3, FABP4, FASN, SLC22A4, THRSP</i>	110	0,29	17,05	1,03e-05	0,0017
0006639	Processo metabólico de acilglicerol	<i>C3, FABP4, FASN, SLC22A4, THRSP</i>	109	0,29	17,21	9,85e-06	0,0017
0006641	Processo metabólico de triglicerídeos	<i>C3, FABP4, FASN, SLC22A4, THRSP</i>	104	0,28	18,04	7,83e-06	0,0017
0055001	Desenvolvimento de células do músculo	<i>HES1, MYH11, MYLK3, RCAN1, TNC</i>	145	0,39	12,94	3,92e-05	0,0049
0031032	Organização da estrutura da actomiosina	<i>CNN1, MYH11, MYLK3</i>	47	0,13	23,94	0,0003	0,0252
0055002	Desenvolvimento de células do músculo estriado	<i>MYH11, MYLK3, RCAN1, TNC</i>	121	0,32	12,40	0,0003	0,0252
0019432	Processo de biossíntese de triglicerídeos	<i>C3, FASN, THRSP</i>	56	0,15	20,10	0,0004	0,0280
0046460	Processo de biossíntese de lipídeos neutros	<i>C3, FASN, THRSP</i>	58	0,15	19,40	0,0005	0,0280
0046463	Processo de biossíntese de acilglicerol	<i>C3, FASN, THRSP</i>	58	0,15	19,40	0,0005	0,0280
0044707	Processo em organismo multicelular	<i>ACTG2, AGTPBP1, ARID5B, C3, CHI3L1, CNN1, COL12A1, CYP4B1, FABP4, GAS7, HES1, HPCAL4, KERA, MMRN1, MYH11, MYLK3, PPL, RCAN1, RSPO2, SLC16A3, SLC22A4, TAP1, TNC, UBA7, VCAN</i>	5612	14,96	1,67	0,0010	0,0292

*Destacados em negrito, genes *down-regulated* nos animais do grupo BCFé. ^aC: número de genes referência na categoria; ^bE: número de genes esperados na categoria; ^cR: Razão de enriquecimento; ^drawP: p valor a partir do teste hipergeométrico; ^eadjP: p valor ajustado para múltiplos testes.

A construção dos módulos biológicos com base em agrupamentos de termos funcionais relacionados aos genes diferencialmente expressos (DAMON et al., 2012; HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009), por meio do *Functional annotation cluster*, identificou sete grupos funcionais significativamente enriquecidos (*EASE score* < 0,1) (Tabela S1). Os genes foram organizados em sete *clusters* que compreendem funções relacionadas ao desenvolvimento e diferenciação de células musculares, matriz extracelular, morfogênese, ligação de nucleotídeos, citoesqueleto de actina e resposta imune.

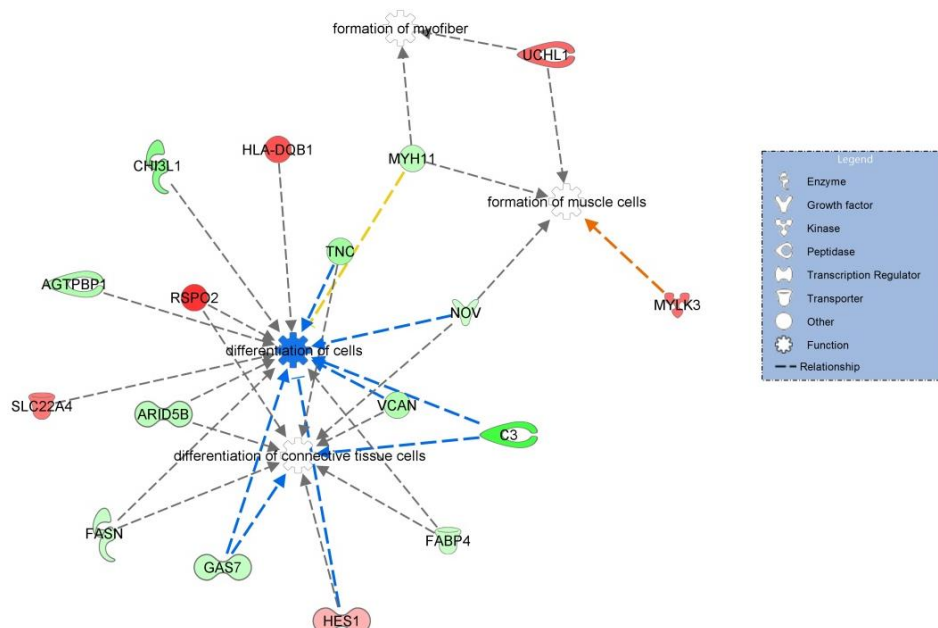
A fim de identificar vias metabólicas ainda não apontadas pelos outros programas foi adotada uma terceira abordagem, *Core analysis function*, inclusa no programa IPA[®]. Dos 49 genes DE, cinco deles (*LOC100848883*, *LOC100848012*, *LOC100848726*, *LOC100848684*, *MIR133A-1*) não apresentaram homólogos humanos no banco de dados do IPA[®], não sendo considerados na análise. Dentre os genes DE analisados pelo IPA[®], 16 apresentaram-se *up-regulated* e 29 *down-regulated* nos animais do grupo BCFe. As principais funções biológicas evidenciadas pelo IPA[®] (*p valor* < 0,05) foram metabolismo de lipídeos (Figura 6), desenvolvimento e crescimento celular (Figura 7). Além dessas, foram evidenciados processos relacionados à bioquímica de pequenas moléculas e ao desenvolvimento e função do sistema hematológico, interação e sinalização célula-célula que (Tabela 6), entre outros, não haviam sido enriquecidos nas análises anteriores.

Figura 6 – Rede de genes diferencialmente expressos com funções no metabolismo de lipídeos.



Genes apresentados em verde e vermelho são *down-* e *up-regulated*, respectivamente, no grupo BCF_e. A intensidade de cor é referente às estimativas de *fold change*. Setas pontilhadas representam interações indiretas e as cores laranja, azul, cinza e amarela denotam ativação, inibição, efeito não previsto e inconsistente, respectivamente.

Figura 7 – Rede de genes diferencialmente expressos com funções de desenvolvimento e diferenciação celular.



Genes apresentados em verde e vermelho são *down-* e *up-regulated*, respectivamente, no grupo BCF_e. A intensidade de cor é referente às estimativas de *fold change*. Setas pontilhadas representam interações indiretas e as cores laranja, azul, cinza e amarela denotam ativação, inibição, efeito não previsto e inconsistente, respectivamente.

Tabela 6 – Cinco principais funções biológicas significativamente identificadas pelo IPA® para os genes diferencialmente expressos no músculo *L. dorsi*, comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.

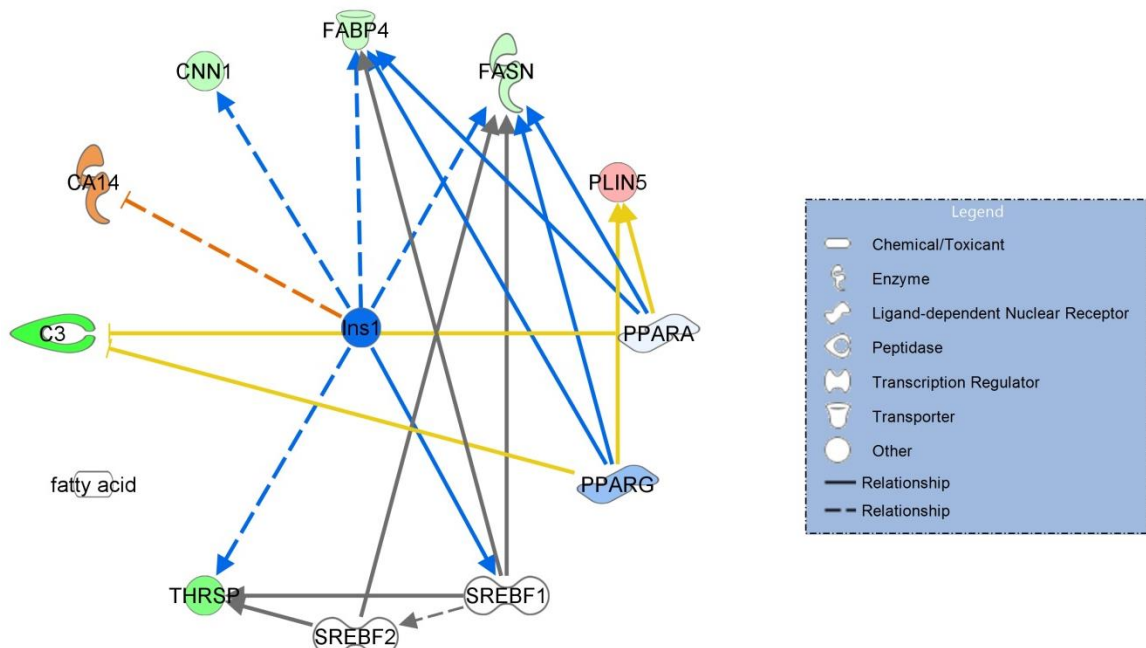
Função biológica	Categoria	Genes	<i>p value</i>
Funções celular e molecular	Metabolismo de lipídeos	<i>AGTPBP1, C3, CYP4B1, FABP4, FASN, MX1, PLIN5, SLC27A6, SLC22A4, THRSP, TNC</i>	2,30E-06 2,62E-02
	Bioquímica de pequenas moléculas	<i>C3, CA14, CYP4B1, FABP4, FASN, MX1, PLIN5, SLC27A6, SLC22A4, THRSP, TNC, VCAN, AGTPB1, GFPT2</i>	2,30E-06 2,62E-02
	Desenvolvimento celular	<i>ARID5B, AGTPB1, BLA-DQB, C3, CHI3L1, FABP4, FASN, GAS7, HES1, MYH11, MYLK3, NOV, PPL, RCAN1, RSPO2, SLC22A4, TNC, UCHL1, VCAN</i>	2,60E-06 2,31E-02
	Crescimento e proliferação celular	<i>ARID5B, BLA-DQB, C3, CHI3L1, CNNI, FABP4, FASN, GAS7, HES1, MT1A, MX1, MYH11, NOV, PPL, RCAN1, SLC22A4, TAP1, TNC, UCHL1, VCAN</i>	1,43E-05 2,40E-02
	Interação e sinalização célula-célula	<i>BLA-DQB, CHI3L1, C3, C4BP4, FASN, HES1, MYLK3, NOV, RCAN1, TAP1, TNC, UCHL1, VCAN</i>	1,32E-04 2,83E-02
Desenvolvimento e funções do Sistema fisiológico	Desenvolvimento de tecidos	<i>AGTPBP1, ARID5B, BLA-DQB, C3, C4BPA, COL12A1, DSTN, FABP4, FASN, GAS7, HES1, KERA, MYH11, MYLK3, NOV, RSPO2, TNC, VCAN, RCAN1, UCHL1</i>	2,60E-06 2,83E-02
	Desenvolvimento e funcionamento do sistema hematológico	<i>ARID5B, BLA-DQB, CHI3L1, C3, C4BPA, FABP4, HES1, KERA, MYH11, RCAN1, TAP1, TNC, VCAN,</i>	1,32E-04 2,63E-02
	Tráfego de células imunes	<i>CHIL3L1, C3, FABP4, MYH11, MYLK3, RCAN1, TNC, VCAN</i>	1,32E-04 2,83E-02
	Desenvolvimento do organismo	<i>AGTPBP1, ARID5B, BLA-DQB, C3, CA14, COL12A1, CNNI, FABP4, HES1, KERA, MYH11, MYLK3, NOV, PLIN5, SLC22A4, RCAN1, RSPO2, UCHL1, TAP1, TNC</i>	2,51E-04 2,83E-02
	Desenvolvimento e função do sistema esquelético e muscular	<i>ARID5B, C3, CNNI, COL12A1, FASN, GAS7, MYH11, MYLK3, NOV, PLIN5, RCAN1, RSPO2, TNC, UCHL1, VCAN</i>	4,31E-04 2,83E-02

*Destacados em negrito, genes *down-regulated* nos animais do grupo BCFé.

O IPA[®] identificou várias vias canônicas das quais seis se destacaram. Entre as vias canônicas de sinalização as principais foram: sinalização do interferon (*P value* 6,82E-05, *OAS1*, *MX1* e *TAP1*), ativação do receptor da tireoide (TR/RXR) (*P value* 8,75E-04, *SLC16A3*, *FASN* e *THRSP*) e sistema complemento (*P value* 2,41E-03, *C3* e *C4BPA*). Os genes identificados nas vias canônicas de sinalização *OAS1*, *MX1*, *TAP1* e *SLC16A3* foram *up-regulated*, enquanto *C3*, *C4BPA*, *FASN* e *THRSP* foram *down-regulated*. Do mesmo modo, as principais vias canônicas metabólicas sobre-representadas foram: biossíntese do estearato em animais (*P value* 2,71E-03, *FASN* e *SLC27A6*), biossíntese do palmitato (*P value* 4,41E-03, *FASN*) e biossíntese de ácidos graxos (*P value* 4,41E-03, *FASN*). Os genes *FASN* e *SLC27A6* foram *down-* e *up-regulated*, respectivamente no grupo BCFe.

A via metabólica da insulina foi predita como inibida (*z-score* -2,162; **Figura 8**) nos animais com baixo GEBV para CFe. Nessa análise a ferramenta do IPA[®], *upstream regulatory analysis*, prediz quais reguladores transcricionais estão envolvidos em determinada via e se eles estão ativados ou inibidos com base no padrão de expressão dos genes em estudo (<http://www.ingenuity.com/>).

Figura 8 – Rede mecânica mostrando regulador *upstream* da insulina 1 (Ins1) predita a partir dos genes diferencialmente expressos em *L. dorsis*, comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.



Genes apresentados em verde e vermelho são *down-* e *up-regulated*, respectivamente, no grupo BCFe. A intensidade de cor é referente às estimativas de *fold change*. Setas representam a relação direta (cheias) ou indireta (pontilhadas) entre os genes e as cores laranja, azul, cinza e amarela denotam ativação, inibição, efeito não predito e inconsistente, respectivamente.

Outros reguladores *upstream* foram inferidos: Fator de necrose tumoral (TNF, $P \leq 1,15E-08$), Complexo do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF BB, $P \leq 1,58E-07$), Lipopolissacarídeos ($P \leq 1,76E-07$) e Substrato do receptor da insulina 2 (IRS2, $P \leq 7,61E-07$). Entretanto, não foi possível prever se esses reguladores estão ativados ou inibidos com base no perfil de expressão analisado.

A análise integrada entre os genes identificados no estudo de GWAS para conteúdo de ferro, realizada anteriormente nessa população (TIZIOTO et al., 2015a) e a lista de genes DE, do presente estudo, identificou em comum apenas o gene *Keratocan*.

5 DISCUSSÃO

São crescentes as exigências do mercado consumidor por alimentos mais saudáveis e nutritivos. Para atender esses anseios faz-se necessário identificar os componentes nutricionais com efeitos negativos e positivos à saúde e assim desenvolver e aplicar ferramentas para reduzi-los ou melhorá-los, respectivamente (MATEESCU, 2014). Estudos recentes têm demonstrado as oportunidades criadas pelos avanços genômicos para o melhoramento de características de difícil mensuração, dentre elas a seleção para composição mineral da carne (AHLBERG et al., 2014; MATEESCU et al., 2013a; MORRIS et al., 2013; TIZIOTO et al., 2015a).

O sequenciamento de RNA para análise do transcriptoma do músculo LD em bovinos representantes dos extremos de GEBV para CFe foi adotado como forma de identificar os mecanismos biológicos subjacentes à regulação desse mineral no músculo, assim como inferir o envolvimento de vias biológicas específicas resultantes das diferenças na composição genética individual (KOGELMAN et al., 2011). Este é o primeiro estudo que busca identificar genes diferencialmente expressos e estabelecer interações que possibilitem a compreensão dos mecanismos biológicos que regulam o conteúdo de ferro no músculo LD, ou são regulados por aquele, e avaliar sua participação em vias biológicas que afetam a qualidade de carne em bovinos.

Embora os principais processos homeostáticos do ferro concentrem-se no fígado, em estudos anteriores foi observado que o conteúdo desse mineral no músculo em animais Nelore, é em parte, determinado geneticamente (TIZIOTO et al., 2015a). Do mesmo modo, também foi identificada, em animais Angus, uma alta herdabilidade para conteúdo de Fe no músculo LD, sendo a característica sugerida como candidata à seleção (MATEESCU et al., 2013a). Ahlberg et al. (2014) observaram correlações significativas entre conteúdo de

ácidos graxos mono e poli-insaturados, e colesterol com o conteúdo de ferro no músculo *Semitendinosus* (ST) em animais cruzados. Esses autores sugerem ainda que a seleção para o aumento da concentração de ferro no ST levaria ao aumento dos níveis de ácidos graxos monoinsaturados e à diminuição dos níveis de colesterol e ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, o ferro é componente estrutural ou cofator enzimático de diversas enzimas (BEARD, 2001) que desempenham papel no metabolismo muscular, levando a crer que a sua maior disponibilidade poderia afetar diversas funções fisiológicas, dentre as quais aquelas relacionadas à homeostase do ferro e a qualidade de carne.

A observação conjunta do *heatmap* e da análise de componentes principais, apresentados, respectivamente, nas Figuras S3 e S4, demonstram que houve variação na expressão gênica suficiente para separar os animais em dois extremos fenotípicos. Entretanto, a replicata NE001805 (Figura S3) foi categorizada no *cluster* de BCFé. É possível que a separação incompleta das amostras se deva ao fato da característica em estudo ser quantitativa e os animais representarem extremos fenotípicos para uma condição considerada normal.

Entretanto, não foram observadas mudanças estatisticamente significativas na expressão de genes sabidamente relacionados à homeostase do ferro entre as condições testadas. Provavelmente, esses resultados decorrem do fato que o músculo esquelético não é o alvo primário da falta ou excesso do mineral (RODRIGUEZ et al., 2007), levando a presumir que as mudanças nos níveis de expressão observadas no músculo decorrem da diferença da quantidade de ferro presente no tecido.

Para as categorias funcionais identificadas, alguns genes serão discutidos considerando aspectos referentes ao seu papel fisiológico no músculo, sua influência sobre a qualidade de carne e como o conteúdo de ferro poderia atuar sobre a via metabólica identificada.

5.1 Metabolismo de lipídeos

As análises de expressão diferencial apontaram mudanças significativas na expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (Figura 6), os quais são componentes chaves em vias metabólicas canônicas relacionadas à biossíntese de ácidos graxos, estearato e palmitato, identificadas no presente trabalho.

Estudos avaliando o efeito da deficiência ou sobrecarga de ferro na expressão gênica em ratos (COLLINS et al., 2005; DAVIS et al., 2012), em diversos tecidos e em cultura celular (OEXLE; GNAIGER; WEISS, 1999), também evidenciaram alterações na

expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, glicose e aminoácidos (KAMEI et al., 2010), além daquelas relacionadas à homeostase do mineral. De acordo com Stangl e Kirchgessner (1998), a deficiência de ferro, mesmo moderada, afeta vários aspectos do metabolismo de lipídeos. Enzimas lipogênicas e do ciclo do ácido cítrico que são ferro dependentes têm sua atividade reduzida sob condições de deficiência de ferro (AHMED; LATHAM; OATES, 2012; OEXLE; GNAIGER; WEISS, 1999). Além da redução na atividade das enzimas ácido graxo sintetase, enzima málica e outras enzimas lipogênicas, Stangl e Kirchgessner (1998) verificaram uma menor taxa na síntese de lipídeos em ratos deficientes em ferro.

O gene *THRSP*, encontrado como *down-regulated*, também chamado de *SPOT14* ou *S14*, codifica uma proteína nuclear que atua como fator de transcrição lipogênico, regulando genes codificantes de enzimas necessárias à síntese de ácidos graxos de cadeia longa (LOOR, 2010; OH et al., 2014), tais como os genes *FASN* e *FABP4*, também identificados como *down-regulated* nos animais do grupo BCFé. Apesar de basicamente todos os tecidos sintetizarem ácidos graxos, o tecido adiposo e o fígado são os principais sítios de expressão do gene *THRSP* (CUNNINGHAM et al., 1998). Além de fatores nutricionais (YAO et al., 2014), o *THRSP* é responsivo aos níveis do hormônio da tireoide (TH), cuja síntese é prejudicada nos casos de menor disponibilidade de ferro em virtude da redução na atividade da tireoide peroxidase, a qual é heme-dependente (CUNNINGHAM et al., 1998; ZIMMERMANN; KÖHRLE, 2002).

O TH desempenha um papel central na regulação do metabolismo (YAO et al., 2014). É provável, portanto, que a diminuição dos níveis de expressão do *THRSP* nos animais com BCFé seja uma resposta adaptativa a menor quantidade de ferro, haja vista que a deficiência de ferro, com ou sem anemia, prejudica o metabolismo da tireoide (ZIMMERMANN; KÖHRLE, 2002).

A *FASN* é uma enzima chave na síntese *de novo* de ácidos graxos (GRIFFIN; SUL, 2004). Caracterizada como um complexo multifuncional, composta por dois monômeros idênticos e seis domínios catalíticos, a *FASN* catalisa a síntese dos ácidos graxos saturados de cadeia longa como miristato (C14:0), palmitato (C16:0) e estearato (C18:0) por meio dos substratos acetil-CoA, malonyl-CoA e NADPH (GRIFFIN; SUL, 2004; MAIER; LEIBUNDGUT; BAN, 2008; SUL et al., 2000). Esses ácidos graxos podem ser esterificados a triacilglicerol e armazenados (GRIFFIN; SUL, 2004), ou ainda, alongados a ácidos graxos de cadeia muito longa, os quais são componentes importantes de esfingolipídios, ceramidas e glicolipídeos (CHIRALA; WAKIL, 2004).

O gene *FABP4* é membro de uma família multi-genes, os quais facilitam o transporte de lipídeos a compartimentos específicos da célula (SYAMSUNARNO et al., 2013). Também conhecida como adipócito *FABP4* (*A-FABP4*) ou *P2*, Shi et al. (2010) sugerem que a proteína codificada por esse gene se liga com alta afinidade apenas a ácidos graxos de cadeia longa, desempenhando um importante papel na captação, transporte e metabolismo de ácidos graxos livres.

A proteína codificada pelo gene *C3*, além de desempenhar papel central na ativação do sistema complemento, atua como precursora da proteína estimulante de acilação (ASP, do inglês *Acylation Stimulating Protein*) (COSTA; DUARTE, 2006), cujos níveis séricos entre ambas são positivos e significativamente correlacionados ($r=0,58$) (KOISTINEN et al., 2001). A ASP está envolvida na regulação dos estoques de energia, já que aumenta a síntese e o armazenamento de triglicerídeos e a captação de glicose (AHRÉN et al., 2003). Diante da importância do ferro no funcionamento do sistema imune, Al-Maarof (2013) verificou que os níveis séricos da proteína *C3* em mulheres adultas são significativamente reduzidos sob condições de deficiência de ferro.

Segundo Cánovas et al. (2010), os parâmetros de qualidade de carne são afetados diretamente pelo metabolismo de lipídeos. A deposição de gordura intramuscular influencia positivamente a suculência, o sabor, a textura e a maciez da carne (HOCQUETTE et al., 2006; WANG et al., 2009). Nesse contexto, os genes *THRSP*, *FASN* e *FABP4* têm sido sugeridos como genes candidatos funcionais para deposição de gordura intramuscular e escore de marmoreio em bovinos (JAGER et al., 2013; OH et al., 2014; WANG et al., 2009) e suínos (CÁNOVAS et al., 2010; COROMINAS et al., 2013).

Dentre os genes *up-regulated* identificados no grupo BCFe, o gene *PLIN5* (também chamado de *OXPAT*) codifica um membro da família PAT ou Perilipin (BRASAEMLE, 2007). Com funções de diferenciação do tecido adiposo e regulação da lipólise (WANG et al., 2011), essa família constitui o grupo de proteínas estruturais mais abundante que recobre gotículas de lipídeos na superfície dos adipócitos (XU; SZTALRYD; LONDOS, 2006). O gene *PLIN5* é mais expresso em tecidos oxidativos, tais como os músculos esquelético e cardíaco, nos quais provavelmente regula negativamente a atividade lipolítica (WANG et al., 2011). Ainda segundo esses autores, o gene *PLIN5* regula negativamente a hidrólise das gotículas de gordura pela ligação e inibição da atividade da lipase de triacilglicerol do adipócito. O papel do *PLIN5* na regulação da lipólise tem sido confirmado em estudos com ratos *knockout* e humanos obesos, nos quais a ausência de proteínas perilipin levou ao aumento da atividade lipolítica, aumento da concentração de

ácidos graxos não-esterificados na circulação e, conseqüente redução do tecido adiposo (XU; SZTALRYD; LONDOS, 2006). Em bovinos cruzados, Jager et al. (2013) avaliaram a expressão de genes envolvidos no metabolismo da gordura intramuscular. Dentre os genes identificados no conjunto relacionado à síntese e armazenamento de triglicérides, esses autores observaram que o nível de expressão do gene *PLIN1*, membro da mesma família do *PLIN5*, apresentou uma correlação de 0,30 com a percentagem de gordura intramuscular. Além disso, o nível de expressão do gene da transferrina, proteína transportadora do ferro, foi também positivamente correlacionado com a percentagem de gordura intramuscular (JAGER et al., 2013).

Dentre as vias canônicas identificadas nas análises do IPA[®], as vias de ativação do receptor da tireoide (TR/RXR), biossíntese do estearato, palmitato e ácidos graxos têm funções já descritas que destacam tanto a sua participação em funções metabólicas importantes (DAUNCEY; KATSUMATA; WHITE, 2004) e seus efeitos sobre parâmetros de qualidade da carne (HOCQUETTE et al., 2006), quanto à influência do ferro nessas vias (OEXLE; GNAIGER; WEISS, 1999). O TH, além de importante regulador do metabolismo de lipídeos, também é um regulador chave no crescimento e desenvolvimento celular (DAUNCEY; KATSUMATA; WHITE, 2004).

5.2 Desenvolvimento e crescimento celular

Processos biológicos relacionados ao desenvolvimento e estrutura celular (Figura 7) foram evidenciados por meio das análises de enriquecimento (Tabelas 5, 6 e S1). Além desses, a análise de agrupamentos realizada pelo programa DAVID destacou diversos *clusters* relacionados à matriz extracelular (*COL12A1*, *KERA*, *TNC*, *VCAN*), organização do citoesqueleto de actina (*ACTG2*, *DSTN*, *GAS7*, *MYH11*, *PPL*) e celular (*HES1*, *GAS7*, *RCAN1*) (Tabela S1). Envolvido em diversos processos celulares, o citoesqueleto de actina mantém a integridade das células musculares e ancora os filamentos contráteis. Contudo, ainda são incertas as relações entre a organização do citoesqueleto, a dinâmica da actina e o desenvolvimento muscular (DAMON et al., 2012).

O gene Tenascin C (*TNC*), identificado como *down-regulated* nos animais do grupo BCFe no presente estudo, é componente de uma família gênica que codifica proteínas da matriz extracelular (MEC) cuja função está relacionada à adesão celular (KAYAN et al., 2011). Em suínos, SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*) no gene *TNC* têm sido associados a características de qualidade de carne, tais como: cor, pH, gordura subcutânea e

área de olho de lombo (KAYAN et al., 2011). Além disso, esses autores, ao avaliarem a expressão diferencial do gene *TNC* entre grupos de animais extremos para pH após 24 horas, observaram que o gene foi mais expresso no grupo de pH mais alto, os quais também apresentavam menor perda por gotejamento. Mortimer et al. (2014) observaram uma correlação genética negativa entre o conteúdo de ferro e o pH no músculo *Longissimus thoracis et lumborum* em ovinos. Diante do papel do pH na determinação de parâmetros de qualidade de carne e do seu efeito sobre a expressão do gene *TNC* (KAYAN et al., 2011), acredita-se que, de algum modo, o conteúdo de ferro poderia estar afetando o pH extracelular e, indiretamente, a expressão do gene *TNC*.

Também *down-regulated* e componente da família das “*Hyallectins*”, o gene Versican (*VCAN*) codifica proteoglicanos componentes da MEC (WIGHT, 2002). Expresso em uma variedade de tecidos, a proteína está envolvida na adesão, proliferação e migração celular; montagem da MEC (WIGHT, 2002) e amplificação da resposta inflamatória (ZHANG; MIAO; WANG, 2012), interagindo com uma variedade de ligantes, tais como *TNC* e colágeno (WU et al., 2005).

A MEC, principal componente do tecido conectivo intramuscular, consiste de uma rede dinâmica de moléculas que incluem colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas não-colagênicas com papel central na regulação e diferenciação de células do músculo (VELLEMAN, 2012). Entretanto, ainda são inconsistentes os resultados que associam o conteúdo de tecido conectivo com parâmetros de qualidade de carne (DUBOST et al., 2013). Embora Velleman (1999) sugira um impacto positivo dos proteoglicanos na suculência da carne, os resultados obtidos por Dubost et al. (2013) demonstraram um efeito contrário da quantidade de proteoglicanos sobre esse parâmetro em bovinos.

Categorizado em *clusters* com funções de desenvolvimento e diferenciação de células musculares, e de atividade regulatória de transcrição, o gene Regulador de calcineurina 1 (*RCANI*) é membro de uma família gênica que modula negativamente a calcineurina e, por consequência, vias dependentes dessa (PRITCHARD; MARTIN, 2013). A calcineurina é uma fosfatase dependente de cálcio, a qual, segundo Sakuma e Yamaguchi (2010), desempenha funções relacionadas à regeneração e regulação da hipertrofia do músculo esquelético. O gene *RCANI* tem sua expressão regulada pelo TH (PEIRIS et al., 2014) e foi *down-regulated* nos animais com BCFé. Assim como para os genes lipogênicos, discutidos anteriormente, é possível, portanto, que a menor disponibilidade de ferro no grupo BCFé esteja afetando a atividade regulatória do TH. No estudo desenvolvido por Jiang et al. (2009) a fim de identificar redes gênicas e genes candidatos que afetavam diferentes medidas

fenotípicas de qualidade e composição de carcaça, os autores observaram um efeito pleiotrópico do gene *RCANI* sobre as características peso de carcaça e escore de marmoreio da carne.

A insulina é um hormônio com efeitos pleiotrópicos, incluindo transporte de glicose e regulação da expressão gênica por meio de uma complexa via de sinalização (TSAKIRIDIS et al., 1999). Nos resultados apresentados pelo IPA[®] a insulina foi predita como *upstream regulator*, indicando a via como inibida nos animais do grupo BCFe. Nessa via foram agrupados sete genes (Figura 8), dos quais *C3*, *CNN1*, *FABP4*, *FASN* e *THRSP* apresentam-se *down-regulated*. Segundo Graugnard et al. (2009), TH e insulina atuam sinergicamente na adipogênese e são positiva e significativamente correlacionados com ingestão de alimento, peso corpóreo e ganho médio diário em bovinos. Ainda de acordo com esses autores a insulina induz o gene *THRSP*, o qual é um regulador de transcrição lipogênico que atua positivamente sobre os genes *FASN* e *FABP4*.

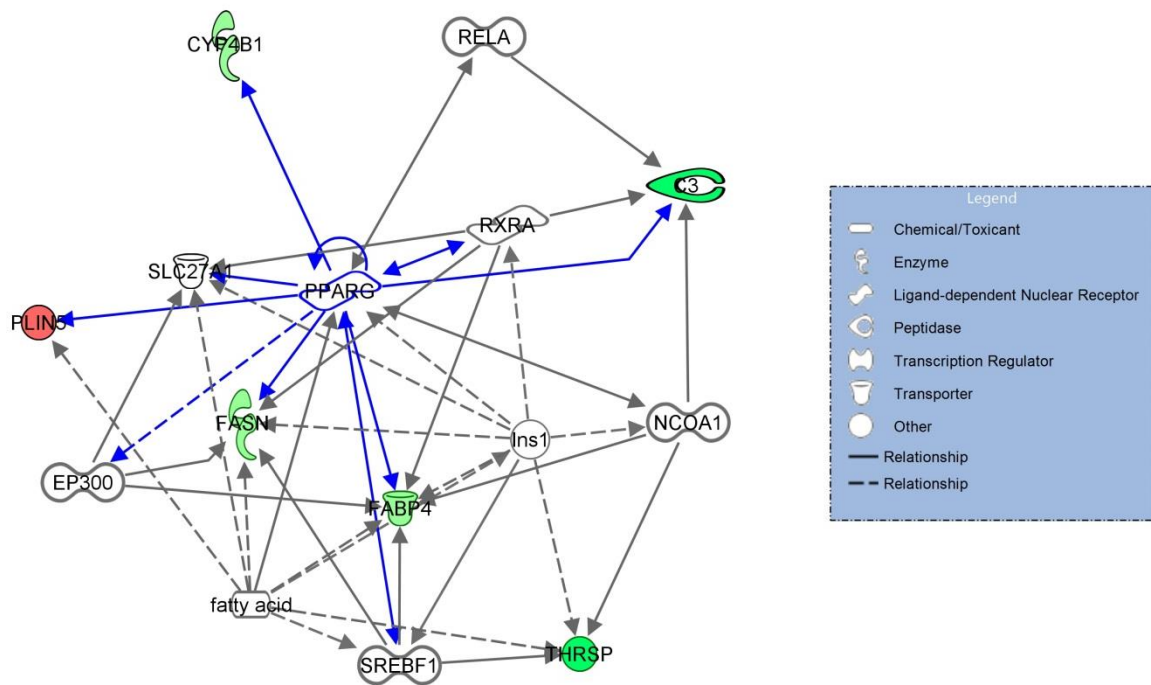
5.3 Integrando os genes do GWAS para ferro aos genes DE

A análise de GWAS para conteúdo de ferro, realizada nessa mesma população, apontou 102 genes localizados nos QTLs identificados (TIZIOTO et al., 2015a). No entanto, esses genes não se sobrepuseram àqueles identificados na análise de expressão diferencial. A arquitetura genética subjacente a características complexas é poligênica e diversos fatores, tais como a variação genética em promotores e elementos regulatórios transcricionais são esperados modularem a expressão gênica de modo a afetar atividades funcionais de vias específicas (KOGELMAN et al., 2011). Por outro lado, processos biológicos, tais como crescimento e desenvolvimento celular; desenvolvimento e funcionamento do sistema hematológico foram vias comuns aos estudos de GWAS e RNAseq.

Dentre outros fatores, a expressão diferencial pode ser causada por genes candidatos, identificados em estudos de GWAs, que atuam como reguladores funcionais (TIZIOTO et al., 2015b). Desse modo, foi realizada uma análise conjunta, utilizando o IPA[®], com os genes DE e os do GWAS para ferro a fim de determinar interações gênicas entre ambos os estudos. Por meio dessa análise, alguns dos genes identificados no GWAS foram sugeridos como potenciais reguladores, diretos ou indiretos, de genes identificados como DE. Dentre os genes potenciais reguladores, o gene Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*) foi sugerido estar regulando os genes *C3*, *CYP4B1*, *FABP4*, *FASN* e *PLIN5* (Figura 9) os quais estão envolvidos no metabolismo de lipídeos. Logo, o desenvolvimento de

estudos a fim de identificar mutações regulatórias, em regiões promotoras ou elementos regulatórios, e determinar o seu efeito sobre a expressão gênica poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos no músculo bovino (TIZIOTO et al., 2015b).

Figura 9 – Rede mecanística dos genes diferencialmente expressos potencialmente regulados pelo gene *PPARG* em *L. dorsi*, comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.



Genes apresentados em verde e vermelho são *down-* e *up-regulated*, respectivamente, no grupo BCF. Setas apresentadas em azul denotam a relação direta (cheias) ou indireta (pontilhadas) do gene *PPARG* (identificado no GWAS) com os demais genes DE.

6 CONCLUSÕES

Por meio do perfil transcricional do músculo de oito animais extremos para GEBV para conteúdo de ferro foram identificados 49 genes DE. Esse é o primeiro estudo em bovinos demonstrando que a variação da quantidade de ferro no músculo está associada à mudança na expressão de genes lipogênicos, assim como aqueles relacionados ao crescimento e desenvolvimento celular.

Alguns genes relacionados ao metabolismo de lipídeos (*C3*, *FABP4*, *FASN*, *PLIN5*, *THRSP*), referenciados na literatura como candidatos funcionais em parâmetros de desenvolvimento e composição de carcaça foram identificados dentre aqueles com expressão diferencial. No entanto, o efeito do ferro sobre a expressão desses genes e das vias biológicas identificadas deve ser melhor investigado.

Embora esses resultados não apresentem genes com papel direto na regulação do conteúdo de Fe, esse estudo aponta rotas biológicas que são influenciadas por esse mineral, contribuindo com informações que serão úteis para melhor compreensão dos mecanismos moleculares em que o ferro está envolvido e o entendimento da sua participação em vias que afetam a qualidade da carne.

7 REFERÊNCIAS

- AHLBERG, C. M. et al. Genome wide association study of cholesterol and poly- and monounsaturated fatty acids, protein, and mineral content of beef from crossbred cattle. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p. 804–814, dez. 2014.
- AHMED, U.; LATHAM, P. S.; OATES, P. S. Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 34, p. 4651–4658, 2012.
- AHRÉN, B. et al. Acylation stimulating protein stimulates insulin secretion. **International journal of obesity**, v. 27, n. 9, p. 1037–1043, 2003.
- AL-MAAROOF, Z. W. Estimation of C3 and C4 Level in non-Pregnant Women with Iron Deficiency Anemia. **Medical Journal of Babylon**, v. 10, n. 3, p. 662–668, 2013.
- ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 3, p. 202–12, mar. 2004.
- ANDREWS, N. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159–169, jun. 2005.
- ANDREWS, N. C. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 3, p. 208–217, 2000.
- ANDREWS, N. C. Forging a field : the golden age of iron biology. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 219–230, 2008.
- BEARD, J. L. Iron-deficiency anemia : reexamining the nature and magnitude of the public health problem iron biology in immune function , muscle metabolism and neuronal functioning. **The Journal of Nutrition**, n. supl, p. 568–580, 2001.
- BEARD, J. L.; DAWSON, H. D. Iron. In: O'DELL, B. L.; SUNDE., R. A. (Eds.). . **Handbook of nutritionally essential mineral elements clinical nutrition in health and disease**. 2. ed. New York: CRC Press, 1997. p. 275–334.
- BEGUIN, Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 9–22, mar. 2003.
- BRASAEMLE, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 12, p. 2547–59, dez. 2007.
- CABRERA, M. C. et al. Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. **Meat Science**, v. 84, n. 3, p. 518–528, 2010.
- CAMMACK, R.; WRIGGLESWORTH, J. M.; BAUM, H. Iron-dependent enzymes in mammalian systems. In: PONKA, P. et al. (Eds.). . **Iron:transport and storage**. United States of America: CRC Press, 1990. p. 17–39.

- CÁNOVAS, A. et al. Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. **BMC Genomics**, v. 11, p. 372, jan. 2010.
- CASAS, E. et al. Polymorphisms in calpastatin and mu-calpain genes are associated with beef iron content. **Animal Genetics**, v. 45, n. 2, p. 283–284, abr. 2014.
- CHIRALA, S. S.; WAKIL, S. J. Structure and function of animal fatty acid synthase. **Lipids**, v. 39, n. 11, p. 1045–1053, 2004.
- CHOI, J. S. et al. Effects of excess dietary iron and fat on glucose and lipid metabolism ☆. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 9, p. 1634–1644, 2013.
- CHOI, Y. M.; KIM, B. C. Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. **Livestock Science**, v. 122, n. 2-3, p. 105–118, 2009.
- COLLINS, J. F. et al. Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. **American Journal Physiological Gastrointestinal and Liver Physiological**, v. 85724, p. 964–971, 2005.
- CONRAD, M. E.; UMBREIT, J. N. Pathways of Iron Absorption. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 29, n. 3, p. 336–355, nov. 2002.
- COROMINAS, J. et al. Analysis of porcine adipose tissue transcriptome reveals differences in de novo fatty acid synthesis in pigs with divergent muscle fatty acid composition. **BMC Genomics**, v. 14, p. 843, jan. 2013.
- COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Médica Portuguesa**, 2006.
- CRICHTON, R. **Iron Metabolism – from molecular mechanisms to clinical consequences**. 3^a. ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd Registered, 2009.
- CUNNINGHAM, B. A. et al. “Spot 14” protein: a metabolic integrator in normal and neoplastic cells. **Thyroid**, v. 8, n. 9, p. 815–825, 1998.
- DAMON, M. et al. Comparison of muscle transcriptome between pigs with divergent meat quality phenotypes identifies genes related to muscle metabolism and structure. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.
- DAUNCEY, M. J.; KATSUMATA, M.; WHITE, P. Nutrition, hormone receptor expression and gene interactions: implications for development and disease. In: PAS, M. F. W.; EVERTES, M. E.; HAAGSMAN, H. P. (Eds.). **Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality**. Wallingford: CABI, 2004. p. 419.
- DAVIS, M. R. et al. Comparisons of the iron deficient metabolic response in rats fed either an AIN-76 or AIN-93 based diet. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 95, jan. 2012.
- DOORNENBAL, H.; MURRAY, A. C. Effects of Age, Breed, Sex and Muscle on Certain Mineral Concentrations in Cattle. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 55–58, 1982.

- DORUP, I. The impact of minerals and micronutrients on growth control. In: PAS, M. F. W.; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. (Eds.). **Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality**. Wallingford: CABI, 2004. p. 419.
- DUAN, Q. et al. Genetic polymorphisms in bovine transferrin receptor 2 (TFR2) and solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 (SLC40A1) genes and their association with beef iron content. **Animal Genetics**, v. 43, n. 2, p. 115–122, abr. 2012.
- DUBOST, A. et al. Structural and biochemical characteristics of bovine intramuscular connective tissue and beef quality. **Meat Science**, v. 95, n. 3, p. 555–561, 2013.
- EDISON, E. S.; BAJEL, A.; CHANDY, M. Iron homeostasis: new players, newer insights. **European Journal of Haematology**, v. 81, n. 6, p. 411–24, dez. 2008.
- FERNANDO, R. L.; GARRICK, D. J. **GenSel-User manual for a portfolio of genomic selection related analyses** AmesBiomedcentral, , 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2105-12-186-s1.pdf>>
- GARMYN, A. J. et al. Estimation of relationships between mineral concentration and fatty acid composition of longissimus muscle and beef palatability traits. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 2849–2858, 2011.
- GIUFFRIDA-MENDOZA, M. et al. Mineral content of longissimus dorsi thoracis from water buffalo and Zebu-influenced cattle at four comparative ages. **Meat Science**, v. 75, p. 487–493, 2007.
- GOFF, L. A.; TRAPNELL, C.; KELLEY, D. **CummeRbund : visualization and exploration of Cufflinks high-throughput sequencing data**, 2012. Disponível em: <<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/cummeRbund/inst/doc/cummeRbund-manual.pdf>>
- GRAUGNARD, D. E. et al. Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. **BMC Genomics**, v. 10, p. 142, 2009.
- GRIFFIN, M.; SUL, H. S. Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life**, v. 56, n. 10, p. 595–600, 1 out. 2004.
- GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro : uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390–397, 2008.
- HARVEY, J. W. Iron metabolism and its disorders. In: J. JERRY KANEKO, JOHN W. HARVEY, M. L. B. (Ed.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5^a. ed. United States of America: Elsevier, 2008. p. 259–285.
- HE, H.; LIU, X. Characterization of transcriptional complexity during longissimus muscle development in bovines using high-throughput sequencing. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e64356, jan. 2013.

HENTZE, M. W. et al. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 24–38, 9 jul. 2010.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285–97, 30 abr. 2004.

HIGGS, J. D. The changing nature of red meat : 20 years of improving nutritional quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 85–95, 2000.

HOCQUETTE, J. et al. The potential benefits of genetics and genomics to improve beef quality – a review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 24, n. 3, p. 173–189, 2006.

HOCQUETTE, J.-F. et al. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v. 1, n. 01, p. 159, fev. 2007.

HOLLÓ, G. et al. Effect of feeding on the composition of longissimus muscle of Hungarian Grey and Holstein Friesian bulls. **Archiv Tierzucht**, v. 50, n. 6, p. 575–586, 2007.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, jan. 2009.

JACOBSON, M.; FENTON, F. Effects of three levels of nutrition and age of animal on the quality of beef. II. color, total iron content, and pH. **Journal of Food Science**, v. 21, n. 4, p. 427–435, 1956.

JAGER, N. DE et al. Gene expression phenotypes for lipid metabolism and intramuscular fat in skeletal muscle of cattle 1. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1112–1128, 2013.

JIANG, Z. et al. Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 528–42, jan. 2009.

KAMEI, A. et al. Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. **Physiological Genomics**, v. 42, p. 149–156, 2010.

KAYAN, A. et al. Polymorphism and expression of the porcine Tenascin C gene associated with meat and carcass quality. **Meat Science**, v. 89, n. 1, p. 76–83, 2011.

KOGELMAN, L. J. et al. Genetic architecture of gene expression in ovine skeletal muscle. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 607, 2011.

KOISTINEN, H. A et al. Plasma Acylation Stimulating Protein Concentration and Subcutaneous Adipose Tissue C3 mRNA Expression in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Men. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 6, p. 1034–1039, 1 jun. 2001.

LIEU, P. T. et al. The roles of iron in health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 1–87, 2001.

- LOOR, J. J. Transcriptomics of muscle and fat development in growing cattle. In: CROVETTO, G. M. (Ed.). **Energy and protein metabolism and nutrition**. 3. ed. Italy: Wageningen Academic Publishers, 2010. p. 59–68.
- MAIER, T.; LEIBUNDGUT, M.; BAN, N. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5894, p. 1315–22, 5 set. 2008.
- 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. 1509–17, set. 2008.
- MATEESCU, R. **It is possible to genetically change the nutrient profile of beef** (Beef Improvement Federation, Ed.) Beef improvement Federation Research Symposium & Annual Meeting. **Anais...** Lincoln, Nebraska: 2014 Disponível em: <<http://www.bifconference.com/bif2014/newsroom.html>>
- MATEESCU, R. G. et al. Genome-wide association study of concentrations of iron and other minerals in longissimus muscle of Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 3593–3600, 2013a.
- MATEESCU, R. G. et al. Genetic parameters for concentrations of minerals in longissimus muscle and their associations with palatability traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1067–75, mar. 2013b.
- MCCLAIN, P. . E. .; MULLINS, A. . M. . Relationship of intracellular proteins and muscle pigments to the tenderness of bovine muscles. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 3, p. 423–425, 1969.
- MCCOWN, J. L.; SPECHT, A. J. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 3, p. 151–60, 2011.
- MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. 2. ed. Wallingford: ELSEVIER, 2003.
- MCLANE, J. A. et al. Physiological and biochemical effects of iron deficiency on rat skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 241, n. 27, p. C47–C54, 1981.
- MONTGOMERY, S. B. et al. Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 773–7, 1 abr. 2010.
- MORRIS, C. A et al. Effects of quantitative trait loci and the myostatin locus on trace and macro elements (minerals) in bovine liver, muscle and kidney. **Animal Genetics**, v. 44, n. 4, p. 361–8, ago. 2013.
- MORTIMER, S. I. et al. Genetic parameters for meat quality traits of Australian lamb meat. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 1016–1024, 2014.
- 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.

MURRAY, A. C.; DOORNENBAL, H.; MARTIN, A. H. Relationship of mineral content and tenderness of meat from cattle differing in breed, sex and age. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 1, p. 49–51, jan. 1982.

NOUR, A. Y. M. et al. Muscle Mineral Concentrations as Predictors of Taste Panel Sensory Attributes of Beef. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1170–1171, 1983.

NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington: National Academy Press, 2001.

ODDY, V. H. et al. Nutritional and developmental effects on the intrinsic properties of muscles as they relate to the eating quality of beef. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, p. 921–942, 2001.

OEXLE, H.; GNAIGER, E.; WEISS, G. Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1413, p. 99–107, 1999.

OH, D. et al. Identification of exonic nucleotide variants of the thyroid hormone responsive protein gene associated with carcass traits and Fatty Acid composition in korean cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 10, p. 1373–80, out. 2014.

PANNIER, L. et al. Prime Australian lamb supplies key nutrients for human health. **Animal Production Science**, v. 50, p. 1115–1122, 2010.

PANNIER, L. et al. Associations of genetic and non-genetic factors with concentrations of iron and zinc in the longissimus muscle of lamb. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 1111–1119, 2014.

PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 1–13, 2004.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 199–211, 15 jan. 2005.

PEIRIS, H. et al. RCAN1 regulates mitochondrial function and increases susceptibility to oxidative stress in mammalian cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

POLONIFI, A. et al. Iron metabolism gene expression in human skeletal muscle. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 45, p. 233–237, 2010.

PONKA, P. Cellular iron metabolism. **Kidney International**, v. 55, n. 69, p. S2–S11, mar. 1999.

PONKA, P. Iron and cell proliferation: another piece of the puzzle. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2620–2621, 2004.

PONKA, P.; LOK, C. N. The transferrin receptor : role in health and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 1111–1137, 1999.

PRITCHARD, M. A.; MARTIN, K. R. RCAN1 and its potential contribution to the down syndrome phenotype. In: DEY, S. (Ed.). . **Down Syndrome**. [s.l.] InTech, 2013. p. 270.

PURCHAS, R. W.; BUSBOOM, J. R. The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme Q(10), and creatine in beef muscles and liver. **Meat Science**, v. 70, n. 4, p. 589–96, ago. 2005.

PUROHIT, A. et al. Effects of heme and nonheme iron on meat quality characteristics during retail display and storage. **Food Measure**, 2015.

RAJPATHAK, S. N. et al. The role of iron in type 2 diabetes in humans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 7, p. 671–681, 2009.

RAWAT, P. et al. The multifunctional glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a novel macrophage lactoferrin receptor. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 90, n. 3, p. 329–38, jun. 2012.

REARDON, T. F.; ALLEN, D. G. Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 6, p. 720–30, jun. 2009.

REARDON, W. et al. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 270–5, out. 2010.

RECALCATI, S.; MINOTTI, G.; CAIRO, G. Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 10, p. 1593–1616, 2010.

RHEE, S. Y. et al. Use and misuse of the gene ontology annotations. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 509–515, 2008.

RODRIGUEZ, A. et al. Effects of iron loading on muscle: genome-wide mRNA expression profiling in the mouse. **BMC Genomics**, v. 8, p. 379, jan. 2007.

SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

SANDSTRÖM, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. S2, p. S181, maio 2001.

SHI, H. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein: An important gene related to lipid metabolism in chicken adipocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 157, n. 4, p. 357–363, dez. 2010.

SIMS, D. et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 2, p. 121–32, fev. 2014.

- SKIKNE, B. S. Serum transferrin receptor. **American Journal of Hematology**, v. 83, n. 11, p. 872–875, nov. 2008.
- STANGL, G. I.; KIRCHGESSNER, M. Different degrees of moderate iron deficiency modulate lipid metabolism of rats. **Lipids**, v. 33, n. 9, p. 889–895, 1998.
- STANGL, G. I.; SCHWARZ, F. J.; KIRCHGESSNER, M. Cobalt deficiency effects on trace elements, hormones and enzymes involved in energy metabolism of cattle. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 69, n. 2, p. 120–126, 1999.
- SUL, H. S. et al. Regulation of the fatty acid synthase promoter by insulin. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2S Suppl, p. 315S–320S, 2000.
- SUTTLE, N. **Mineral nutrition of livestock**. 4^a. ed. United Kingdom: CABI, 2010.
- SYAMSUNARNO, M. R. A. A. et al. A critical role of fatty acid binding protein 4 and 5 (FABP4 / 5) in the systemic response to fasting. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 1–13, 2013.
- TAJIK, H. et al. Mineral contents of muscle (Longissimus dorsi thoracis) and liver in river buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Muscle Foods**, v. 21, n. 2010, p. 459–473, 2008.
- TESTA, U. **Proteins of iron metabolism**. United States of America: CRC Press, 2001.
- THOMPSON, C. H. et al. The effect of iron deficiency on skeletal muscle metabolism of the rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 147, n. 1, p. 85–90, 1993.
- TIZIOTO, P. C. et al. Detection of quantitative trait loci for mineral content of Nelore longissimus dorsi muscle. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, n. 1, p. 15, 2015a.
- TIZIOTO, P. C. et al. Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, 2015b.
- TORTI, S. V; TORTI, F. M. Iron and cancer : more ore to be mined. **Nature reviews cancer**, p. 1–14, 2013.
- TRAPNELL, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511–5, maio 2010.
- TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 3, p. 562–578, 2012.
- TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105–11, 1 maio 2009.
- TSAKIRIDIS, T. et al. Role of the actin cytoskeleton in insulin action. **Microscopy Research and Technique**, v. 47, n. 2, p. 79–92, 15 out. 1999.

VELLEMAN, S. G. **Skeletal Muscle Collagen Organization May Be Associated with Proteoglycan Expression**. Disponível em: <http://ohioline.osu.edu/sc164/sc164_3.html>. Acesso em: 27 jan. 2015.

VELLEMAN, S. G. Meat science and muscle biology symposium: Extracellular matrix regulation of skeletal muscle formation. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. E-Suppl, p. 936–941, 2012.

VIFOR PHARMA. **Iron Atlas**. Disponível em: <<http://www.ironatlas.com/nc/en/news.html>>. Acesso em: 22 set. 2014.

WANG, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470–476, 2008.

WANG, H. et al. Unique Regulation of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) by Perilipin 5, a Lipid Droplet-associated Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 15707–15715, 6 maio 2011.

WANG, Y. H. et al. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 119–130, 2009.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

WARNER, R. D. et al. Genetic and environmental effects on meat quality. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 171–83, set. 2010.

WIGHT, T. N. Versican: A versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 617–623, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Micronutrient deficiencies iron deficiency anaemia**. Disponível em: <<http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/#>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

WU, Y. J. et al. The interaction of versican with its binding partners. **Cell Research**, v. 15, n. 7, p. 483–494, jul. 2005.

XU, G.; SZTALRYD, C.; LONDOS, C. Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 1, p. 83–90, jan. 2006.

YAO, X. et al. Thyroid Hormone Receptor Coregulators in Metabolic Regulation. **Journal of Endocrinology, Diabetes & Obesity**, v. 2, n. 3, p. 1051, 2014.

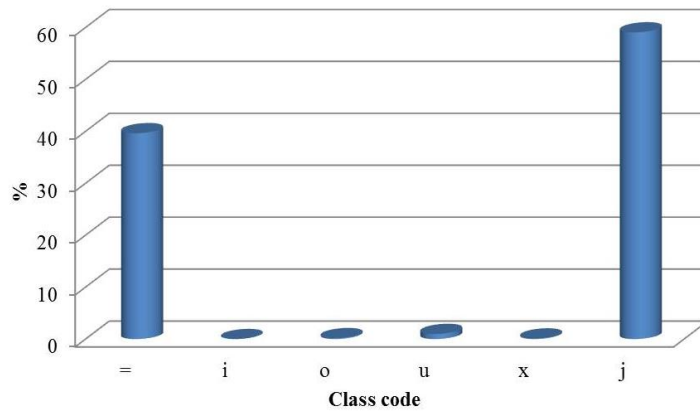
ZEMBAYASHI, M.; LUNT, D. K.; SMITH, S. B. Dietary tea reduces the iron content of beef. **Meat Science**, v. 53, n. 4, p. 221–6, dez. 1999.

ZHANG, B.; KIROV, S.; SNODDY, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W741–W748, 1 jul. 2005.

ZHANG, Z.; MIAO, L.; WANG, L. Inflammation Amplification by Versican: The First Mediator. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 6873–6882, 6 jun. 2012.

ZIMMERMANN, M. B.; KÖHRLE, J. The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism : biochemistry and relevance to public health. **Thyroid**, v. 12, n. 10, p. 867–878, 2002.

8 ANEXOS

Figura Suplementar S1 – Transcritos classificados pelo *Cuffmerge*.

=: Correspondência completa; **i**: Um transfrag compreendido inteiramente dentro de um íntron de referência; **o**: sobreposição genérica exônica com um transcrito de referência; **u**: Desconhecido, transcrito intergênico; **x**: sobreposição exônica com referência na fita oposta; **j**: potencialmente nova isoforma: pelo menos uma junção de *splice* é partilhada com um transcrito de referência;

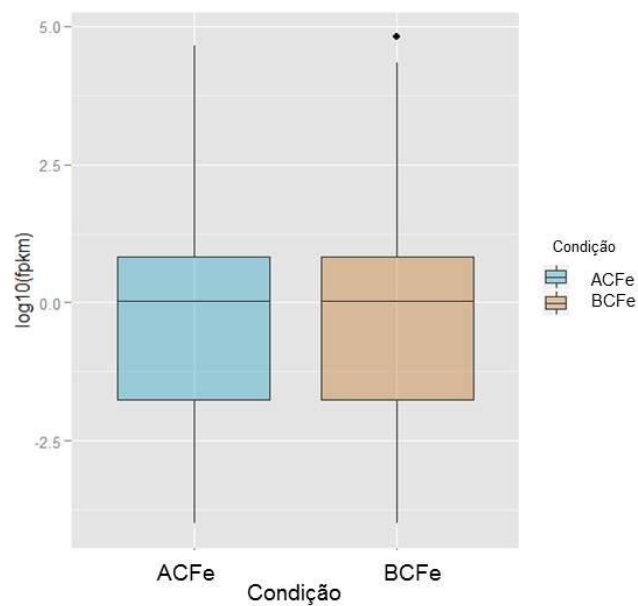
Figura Suplementar S2 – Boxplot do \log_{10} dos valores de FPKM sobre as condições de alto (ACFe) e baixo (BCFe) conteúdo de ferro no músculo.

Figura Suplementar S4 – Análise de Componentes Principais (PCA) entre as condições de alto (ACFe) e baixo (BCFe) GEBV para conteúdo de ferro no músculo.

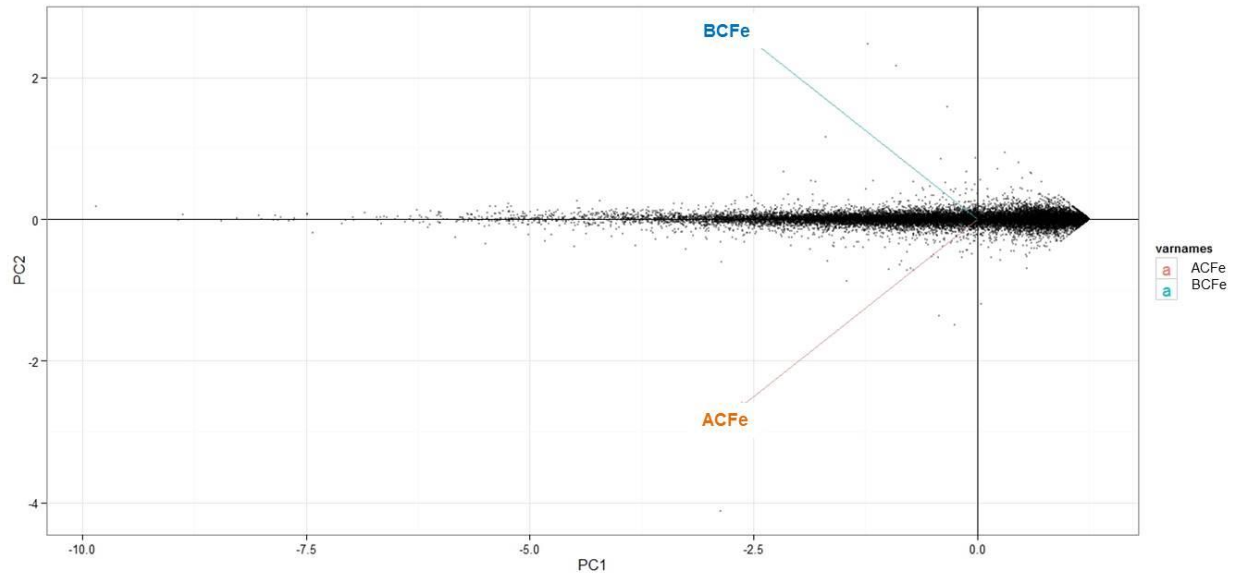


Tabela Suplementar S1 – *Functional annotation cluster* para os genes diferencialmente expressos no músculo *L. dorsi*, comparando grupos com alto e baixo valor genético genômico para conteúdo de ferro em animais Nelore.

Annotation Cluster 1		Enrichment Score: 1.8288365043089938			
Category	Term	PValue	Genes		
GOTERM_BP_FAT	GO:0048747~muscle fiber development	0,0033	<i>TNC, MYH11, RCAN1</i>		
GOTERM_BP_FAT	GO:0055002~striated muscle cell development	0,0071	<i>TNC, MYH11, RCAN1</i>		
GOTERM_BP_FAT	GO:0055001~muscle cell development	0,0082	<i>TNC, MYH11, RCAN1</i>		
GOTERM_BP_FAT	GO:0007517~muscle organ development	0,0145	<i>TNC, ARID5B, MYH11, RCAN1</i>		
GOTERM_BP_FAT	GO:0051146~striated muscle cell differentiation	0,0194	<i>TNC, MYH11, RCAN1</i>		
GOTERM_BP_FAT	GO:0014706~striated muscle tissue development	0,0339	<i>TNC, MYH11, RCAN1</i>		
GOTERM_BP_FAT	GO:0042692~muscle cell differentiation	0,0350	<i>TNC, MYH11, RCAN1</i>		
GOTERM_BP_FAT	GO:0060537~muscle tissue development	0,0371	<i>TNC, MYH11, RCAN1</i>		
Annotation Cluster 2		Enrichment Score: 1.547720844687776			
GOTERM_CC_FAT	GO:0031012~extracellular matrix	8,20E-11	<i>NOV, KERA, TNC, CHI3L1, COL12A1, VCAN</i>		
SP_PIR_KEYWORD S	Secreted	0,0024	<i>NOV, KERA, C3, TNC, RSPO2, CHI3L1, COL12A1, VCAN, C4BPA, MMRN1, PII5</i>		
GOTERM_CC_FAT	GO:0005578~proteinaceous extracellular matrix	0,0049	<i>KERA, TNC, CHI3L1, COL12A1, VCAN</i>		
GOTERM_CC_FAT	GO:0005576~extracellular region	0,0078	<i>NOV, KERA, C3, TNC, RSPO2, CHI3L1, COL12A1, VCAN, C4BPA, MMRN1, PII5</i>		
SP_PIR_KEYWORD S	extracellular matrix	0,0146	<i>KERA, TNC, COL12A1, VCAN</i>		

GOTERM_CC_FAT	GO:0044421~extracellular region part	0,0159	<i>NOV, KERA, C3, TNC, CHI3L1, COL12A1, VCAN</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0009611~response to wounding	0,0388	<i>C3, TNC, VCAN, C4BPA, MMRN1</i>
SP_PIR_KEYWORD S	signal	0,0737	<i>NOV, KERA, CA14, C3, TNC, RSPO2, CHI3L1, COL12A1, VCAN, C4BPA, MMRN1, PII5</i>
UP_SEQ_FEATURE	signal peptide	0,0765	<i>NOV, KERA, CA14, C3, TNC, RSPO2, CHI3L1, COL12A1, VCAN, C4BPA, MMRN1, PII5</i>
SP_PIR_KEYWORD S	disulfide bond	0,0830	<i>NOV, KERA, CA14, C3, TNC, RSPO2, CHI3L1, COL12A1, VCAN, C4BPA, MMRN1</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0007155~cell adhesion	0,0888	<i>HES1, TNC, COL12A1, VCAN, MMRN1</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0022610~biological adhesion	0,0892	<i>HES1, TNC, COL12A1, VCAN, MMRN1</i>
SP_PIR_KEYWORD S	glycoprotein	0,1109	<i>CA14, KERA, C3, TNC, UCHL1, CHI3L1, C4BPA, MMRN1, NOV, RSPO2, SLC22A4, COL12A1, VCAN, PII5</i>
UP_SEQ_FEATURE	disulfide bond	0,1405	<i>NOV, KERA, CA14, C3, TNC, RSPO2, CHI3L1, VCAN, C4BPA, MMRN1</i>
UP_SEQ_FEATURE	glycosylation site:N-linked (GlcNAc...)	0,1573	<i>CA14, KERA, C3, TNC, CHI3L1, C4BPA, MMRN1, NOV, RSPO2, SLC22A4, COL12A1, VCAN, PII5</i>

Annotation Cluster 3 Enrichment Score: 1.1267682736210545

GOTERM_BP_FAT	GO:0032989~cellular component morphogenesis	0,0153	<i>HES1, UCHL1, MYH11, VCAN, GAS7</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0030182~neuron differentiation	0,0211	<i>HES1, AGTPBP1, UCHL1, VCAN, GAS7</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0048666~neuron development	0,0489	<i>HES1, UCHL1, VCAN, GAS7</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0000902~cell morphogenesis	0,0551	<i>HES1, UCHL1, VCAN, GAS7</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron differentiation	0,0918	<i>HES1, UCHL1, VCAN</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0048812~neuron projection morphogenesis	0,0948	<i>UCHL1, VCAN, GAS7</i>

GOTERM_BP_FAT	GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	0,1189	<i>HES1, UCHL1, VCAN</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0048858~cell projection morphogenesis	0,1197	<i>UCHL1, VCAN, GAS7</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0031175~neuron projection development	0,1286	<i>UCHL1, VCAN, GAS7</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0032990~cell part morphogenesis	0,1286	<i>UCHL1, VCAN, GAS7</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0030030~cell projection organization	0,2261	<i>UCHL1, VCAN, GAS7</i>
Annotation Cluster 4 Enrichment Score: 1.1030523645221304			
GOTERM_BP_FAT	GO:0009611~response to wounding	0,0388	<i>C3, TNC, VCAN, C4BPA, MMRN1</i>
INTERPRO	IPR006209:EGF	0,0390	<i>TNC, VCAN, MMRN1</i>
INTERPRO	IPR000742:EGF-like, type 3	0,0823	<i>TNC, VCAN, MMRN1</i>
SP_PIR_KEYWORDS	egf-like domain	0,0862	<i>TNC, VCAN, MMRN1</i>
INTERPRO	IPR006210:EGF-like	0,0875	<i>TNC, VCAN, MMRN1</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0007155~cell adhesion	0,0888	<i>HES1, TNC, COL12A1, VCAN, MMRN1</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0022610~biological adhesion	0,0892	<i>HES1, TNC, COL12A1, VCAN, MMRN1</i>
SMART	SM00181:EGF	0,0980	<i>TNC, VCAN, MMRN1</i>
INTERPRO	IPR013032:EGF-like region, conserved site	0,1622	<i>TNC, VCAN, MMRN1</i>
Annotation Cluster 5 Enrichment Score: 1.0757278267449475			
SP_PIR_KEYWORDS	nucleotide-binding	0,0080	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, SLC27A6, OAS1, MX1</i>
SP_PIR_KEYWORDS	atp-binding	0,0208	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1</i>

GOTERM_MF_FAT	GO:0005524~ATP binding	0,0957	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0032559~adenyl ribonucleotide binding	0,1011	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0032553~ribonucleotide binding	0,1114	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1, MX1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0032555~purine ribonucleotide binding	0,1114	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1, MX1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0030554~adenyl nucleotide binding	0,1246	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0001883~purine nucleoside binding	0,1321	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0017076~purine nucleotide binding	0,1346	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1, MX1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0001882~nucleoside binding	0,1357	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, OAS1</i>
GOTERM_MF_FAT	GO:0000166~nucleotide binding	0,1377	<i>ACTG2, MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7, HSPA6, SLC27A6, OAS1, MX1</i>
UP_SEQ_FEATURE	nucleotide phosphate-binding region:ATP	0,1497	<i>MYLK3, TAP1, MYH11, SLC22A4, UBA7</i>
Annotation Cluster 6 Enrichment Score: 0.8586899310100715			
GOTERM_BP_FAT	GO:0030036~actin cytoskeleton organization	0,0174	<i>MYH11, CNN1, GAS7, DSTN</i>
GOTERM_CC_FAT	GO:0015629~actin cytoskeleton	0,0205	<i>ACTG2, MYH11, GAS7, DSTN</i>
GOTERM_BP_FAT	GO:0030029~actin filament-based process	0,0206	<i>MYH11, CNN1, GAS7, DSTN</i>
Annotation Cluster 7 Enrichment Score: 0.8124139950661177			
SP_PIR_KEYWORD S	immune response	0,0824	<i>C3, TAP1, C4BPA</i>