

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

Thanny Porto

MicroRNAs identificados em parede ruminal de *Bos indicus* são modulados pela dieta e apresentam potenciais alvos em genes da microbiota ruminal

São Carlos

2023

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

Thanny Porto

MicroRNAs identificados em parede ruminal de *Bos indicus* são modulados pela dieta e apresentam potenciais alvos em genes da microbiota ruminal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução.

Orientação: Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

São Carlos

2023

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à minha mãe
e ao meu pai, Marina e Siderval,
dos quais tenho saudades.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Embrapa Pecuária Sudeste por fornecer a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do projeto

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro fornecido para a obtenção dos dados aqui analisados.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pela oferta de disciplinas que acrescentaram ao meu conhecimento, assim como pelo auxílio financeiro fornecido para a realização de atividades.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos, que estimulou meu interesse científico e possibilitou meu desenvolvimento bem como minha formação.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal por todo o apoio e auxílio, oferecidos solícitamente em momentos em que eu tanto precisava.

Agradeço aos colegas dos grupos de pesquisa envolvidos no projeto pelas colaborações ao desenvolvimento do projeto.

Agradeço à Doutora Luciana Correia de Almeida Regitano pela orientação e pela oportunidade oferecidas a mim, bem como pela sua compreensão quanto às dificuldades e sua dedicação sem limites.

Agradeço à Tainã Figueiredo Cardoso e à Jennifer Jessica Bruscardin pela amizade, a compreensão e o apoio oferecido em todos os momentos.

Agradeço a Mary Miyazaki Yoshida, Hélio Massayuki Yoshida e Lucas Eidi Yoshida por todo o suporte, carinho e acolhimento em tantos momentos, mesmo

quando eu não pude retribuir.

Agradeço a minhas amigas Lissa Yoshida e Sofia Rodrigues, bem como a Ricardo Akira Paiva Ichikawa, pela amizade, paciência e pelo companheirismo no caminho que me incentivam a seguir.

Agradeço a Juliana Duchini pelo suporte, a empatia e o acolhimento, que me acrescentaram muito e foram tão necessários nesse período.

Agradeço aos meus pais Marina Marcondes da Silva e Siderval Porto, sem os quais esse trabalho não seria possível e que leriam esse agradecimento com orgulho.

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) são reguladores pós-transcricionais da expressão gênica do hospedeiro e sua microbiota. miRNAs têm o potencial de influenciar a manifestação de fenótipos como eficiência alimentar em bovinos, bem como de modular a composição e a funcionalidade da microbiota em mamíferos. O presente projeto visa identificar o perfil de expressão de miRNAs expressos na parede ruminal entre dois grupos de touros Nelore (*Bos indicus*) submetidos a duas intervenções nutricionais: dieta rica em grãos (n=26); e com coprodutos agrícolas (n=22). Amostras da parede do rúmen foram coletadas e o RNA total foi extraído. Um total de 528 miRNAs foram identificados na parede ruminal dos animais, sendo nove deles expressos diferencialmente entre os grupos de tratamento (FDR $\leq 0,1$); sete miRNAs foram regulados positivamente e dois foram regulados negativamente no grupo alimentado com coprodutos agrícolas. Ademais, nosso estudo também explora a potencial regulação promovida por miRNAs do hospedeiro sobre genes da microbiota ruminal. Para investigar evidências da regulação da microbiota por miRNAs do hospedeiro, analisamos *in silico* a presença de sítios-alvos de miRNAs bovinos em sítios de ligação ao ribossomo anotados em genomas montados a partir de metagenomas (MAGs) de conteúdo ruminal bovino. Todos os miRNAs diferencialmente expressos entre os dois grupos de tratamento apresentaram alvos preditos em genes de MAGs. Os bta-miR-223 e bta-miR-874, potenciais reguladores da eficiência alimentar e do metabolismo lipídico respectivamente, foram mais expressos em animais alimentados com coprodutos; e apresentam alvos em treze e 102 genes bacterianos anotados em MAGs, respectivamente. Os resultados aqui apresentados indicam que miRNAs identificados na parede ruminal de bovinos têm seu nível de expressão modulado de acordo com a composição nutricional da dieta. Além disso, uma grande quantidade de genes da microbiota ruminal apresenta o potencial de ser regulado por miRNAs de *Bos taurus*. Trabalhos futuros podem indicar quais fenótipos podem ser influenciados por meio dessa regulação, bem como se essa regulação pode ser modulada em diferentes intervenções nutricionais.

Palavras-chave: Bovinos, Ruminantes, Regulação genética, MicroRNAs, Microbiota.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators of gene expression both from the host and from its microbiota. miRNAs have the potential to influence the expression of phenotypes such as feed efficiency in beef cattle, as well as to modulate the composition and functionality of the microbiota in mammals. This project aims to identify the expression profile of miRNAs identified in rumen wall tissue in two groups of Nelore bulls (*Bos indicus*) submitted to different diets, *i.e.* conventional high-grain diet (n=26) and agricultural co-products diet (n=22). A total of 528 miRNAs were identified in the ruminal wall of the animals, nine of which were differentially expressed between the two treatment groups (FDR \leq 0.1); seven miRNAs were up-regulated and two were down-regulated in the agricultural co-product fed group. Furthermore, our study also explores the potential regulation promoted by host miRNAs on ruminal microbiota genes. To investigate evidence of microbiota regulation by host miRNAs, we analyzed *in silico* the presence of bovine miRNA target sites in ribosome binding sites from Metagenome Assembled Genomes (MAGs) extracted from bovine ruminal contents. All nine differentially expressed miRNAs had predicted targets in MAGs' genes. bta-miR-223 and bta-miR-874, potential regulators of feed efficiency and lipid metabolism, respectively, were more expressed in animals fed with co-products; and they target thirteen and 102 bacterial genes annotated in MAGs, respectively. The results presented here suggest that miRNAs identified in the ruminal wall of *Bos indicus* have their expression level modulated by the nutritional content of the animal's diet. Furthermore, our findings support the hypothesis that ruminal microbiota genes have the potential to be regulated by *Bos taurus* miRNAs. Future work may indicate which phenotypes can be influenced through this regulation, as well as whether this regulation can be modulated in different nutritional interventions.

Keywords: Cattle, Ruminants, Genetic Regulation, MicroRNA, Microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Via canônica de biogênese de miRNAs..... | 17 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição das dietas convencional e baseada em coprodutos agrícolas fornecidas aos bovinos Nelore durante os estágios de crescimento e finalização..... | 25 |
| Tabela 2 - Principais teores nutricionais das dietas convencional e dieta baseada em coprodutos agrícolas fornecidas aos bovinos Nelore..... | 26 |
| Tabela 3 - Estatística descritiva de características fenotípicas dos 52 touros Nelore confinados sob dieta convencional e dieta baseada em coprodutos agrícolas..... | 27 |
| Tabela 4 - Estatísticas descritivas referentes à extração do RNA total de 48 amostras de parede ruminal de bovinos da raça Nelore submetidos a dois tratamentos nutricionais diferentes..... | 33 |
| Tabela 5 - Estatísticas descritivas do mapeamento das sequências de miRNAs identificadas em amostras da parede ruminal de animais dos dois grupos de tratamento: dieta convencional e baseada em coprodutos..... | 34 |
| Tabela 6 - microRNAs diferencialmente expressos em touros Nelore alimentados com coprodutos em relação a touros alimentados com uma dieta convencional rica em grãos..... | 35 |
| Tabela 7 - Número de genes bovinos identificados como alvos para cada um dos nove miRNAs diferencialmente expressos em amostras de parede ruminal do grupo de touros <i>Bos indicus</i> alimentados com coprodutos..... | 36 |
| Tabela 8 - Principais vias da Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas relacionadas aos genes-alvos dos nove microRNAs diferencialmente expressos em animais alimentados com a dieta baseada em coprodutos em relação a animais alimentados com a dieta rica em grãos ($FDR \leq 0,1$)..... | 37 |
| Tabela 9 - Resultados da análise de associação do perfil de expressão dos microRNAs diferencialmente expressos entre os animais alimentados com diferentes dietas com os fenótipos anotados..... | 40 |
| Tabela 10 - Lista de genes conhecidos nos genomas montados a partir de metagenomas (MAGs) que foram identificados como alvos dos microRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal, entre animais submetidos a diferentes dietas..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| miRNA | MicroRNA |
| MAG | Genomas montados a partir de metagenomas, do inglês <i>Metagenome Assembled Genomes</i> |
| RNAse | Ribonuclease |
| miRISC | Complexo de silenciamento induzido por miRNA, do inglês <i>microRNA Induced Silencing Complex</i> |
| MRE | Elementos de reconhecimento de miRNAs |
| mRNA | RNAs mensageiro |
| UTR | Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated Region</i> |
| PMN | Polimorfonucleares |
| AGV | Ácidos graxos voláteis |
| AGCC | Ácidos graxos de cadeia curta |
| sRNA | Pequeno RNA, do inglês <i>small RNA</i> |
| RBS | Sítio de ligação ao ribossomo, do inglês <i>Ribosome Binding Site</i> |
| TCDD | 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina |
| DE | Diferencialmente expressos |
| RIN | Número de integridade do RNA, do inglês <i>RNA Integrity Number</i> |
| FDR | Taxa de falsas descobertas, do inglês <i>False Discovery Rate</i> |
| CAR | Consumo alimentar residual (CAR) |
| RME | Emissão residual de metano |
| EGAOL | espessura de gordura externa entre a 11 ^a e a 12 ^a costela |
| AOL | Área de olho de lombo |
| GC | Grupo contemporâneo |
| CDS | Sequência codificante, do inglês <i>CoDing Sequence</i> |
| mfe | Mínima energia livre de hibridização |
| KEGG | Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas |
| RXR α | Receptor de ácido X retinóico alfa |
| PPAR γ | receptor ativado por proliferadores de peroxissoma de isoforma γ |
| QTL | <i>Locus</i> quantitativo associado a uma característica, do inglês <i>Quantitative Trait Loci</i> |
| MAPK | Proteínas quinase ativadas por mitógeno, do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> |
| CA | Taxa de conversão alimentar |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 14 |
| 2. Revisão bibliográfica..... | 16 |
| 2.1 MicroRNAs e regulação da expressão gênica em animais..... | 16 |
| 2.2 Relevância do rúmen e sua microbiota na digestão de nutrientes..... | 19 |
| 2.3 sRNAs, miRNAs e a regulação de genes da microbiota..... | 20 |
| 3. Justificativa..... | 23 |
| 4. Hipótese..... | 24 |
| 5. Objetivos..... | 25 |
| 5.1 Objetivo geral..... | 25 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| 6. Materiais e métodos..... | 26 |
| 6.1 Análise do perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal..... | 26 |
| 6.1.1 Delineamento experimental, medidas de desempenho e coleta de amostras..... | 26 |
| 6.1.2 Extração de RNA total das amostras de parede ruminal..... | 29 |
| 6.1.3 Sequenciamento, controle de qualidade e mapeamento das sequências..... | 30 |
| 6.1.4 Análise de expressão diferencial de miRNAs de parede ruminal..... | 30 |
| 6.1.5 Identificação de genes-alvos bovinos dos miRNAs DE em parede ruminal e respectivas vias metabólicas associadas aos mesmos..... | 31 |
| 6.2 Associação entre o perfil individual de expressão de miRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal e fenótipos de eficiência alimentar e de emissão de metano..... | 32 |
| 6.3 Análise de potenciais genes-alvos para os miRNAs bovinos diferencialmente expressos no rúmen em sequências de MAGs de conteúdo ruminal..... | 32 |
| 6.3.1 Anotação funcional..... | 33 |
| 6.3.2 Obtenção das janelas nucleotídicas referentes às RBS dos MAGs..... | 33 |
| 6.3.3 Identificação de potenciais alvos de miRNAs em genes anotados em MAGs de conteúdo ruminal bovino..... | 34 |
| 7. Resultados..... | 35 |
| 7.1 Análise do perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal..... | 35 |
| 7.1.1 Extração de RNA total..... | 35 |
| 7.1.2 Mapeamento e anotação das sequências de miRNA..... | 36 |
| 7.1.3 Análise de expressão diferencial de miRNAs de parede ruminal..... | 36 |
| 7.1.4 Identificação de genes bovinos alvos dos miRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal e vias biológicas associadas aos produtos desses genes..... | 37 |
| 7.1.5 Associação entre o perfil de expressão de miRNAs DE em parede ruminal e fenótipos de eficiência alimentar e emissão de metano..... | 41 |
| 7.2 Identificação de potenciais alvos de miRNAs em genes anotados em MAGs de conteúdo ruminal bovino..... | 43 |
| 8. Discussão..... | 46 |
| 8.1 Análise do perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal..... | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 8.1.1 miRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal entre os animais alimentados com duas dietas diferentes..... | 46 |
| 8.1.2 Vias metabólicas de bovinos associadas aos genes-alvos dos miRNAs diferencialmente expressos..... | 49 |
| 8.2 Identificação de potenciais alvos de miRNAs em genes de MAGs de conteúdo ruminal bovino..... | 52 |
| 9. Conclusão..... | 55 |
| 10. Referências Bibliográficas..... | 56 |

1. Introdução

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs não-codificantes que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica em eucariotos (Gebert *et al.* 2019). Devido ao papel que esses RNAs desempenham em diversos processos celulares, miRNAs são considerados fundamentais à homeostase e ao desenvolvimento de eucariotos (Brennecke *et al.* 2005; Gebert *et al.* 2019). Foi observado que o perfil de expressão de miRNAs em diversos tecidos e fluidos é modulado pelo conteúdo nutricional da dieta administrada a mamíferos (Zhang *et al.* 2009; Munch *et al.* 2013; Ojo *et al.* 2023).

Em ruminantes, a dieta é um fator determinante para o desenvolvimento, a funcionalidade e o desempenho da microbiota ruminal. A microbiota ruminal, por sua vez, é imprescindível à digestão e absorção de nutrientes em ruminantes. Foi demonstrado que a estrutura e a diversidade de comunidades da microbiota ruminal afetam a manifestação de traços de interesse comercial em bovinos (Andrade *et al.* 2022; Liu *et al.* 2021).

Diversos estudos indicam que miRNAs são reguladores genéticos importantes na mediação da comunicação entre hospedeiro e microbiota (Ricci *et al.* 2022). Foram descritas múltiplas evidências de que miRNAs regulam o nível de expressão de genes de microrganismos e dessa forma promovem efeitos sobre a homeostase do holobionte (Du *et al.* 2021; Liu *et al.* 2016). Essas observações sugerem que miRNAs podem ser reguladores genéticos essenciais à comunicação entre hospedeiro e microbiota, bem como na coordenação de respostas de holobiontes a estímulos do ambiente.

Essas descobertas destacam a necessidade de compreender o bovino enquanto um holobionte, e portanto considerar as interações genéticas entre o hospedeiro bovino e a microbiota ruminal no contexto da nutrição, bem como da manifestação de fenótipos como eficiência alimentar e emissão de metano, por exemplo.

No trabalho aqui apresentado, identificamos como diferentes tratamentos nutricionais (*i.e.* dieta baseada em coprodutos e dieta convencional rica em grãos) alteram o perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal de bovinos Nelore, bem

como exploramos potenciais alvos de miRNAs em genes anotados em genomas montados a partir de metagenomas (MAGs) de conteúdo ruminal bovino.

2. Revisão bibliográfica

2.1 *MicroRNAs e regulação da expressão gênica em animais*

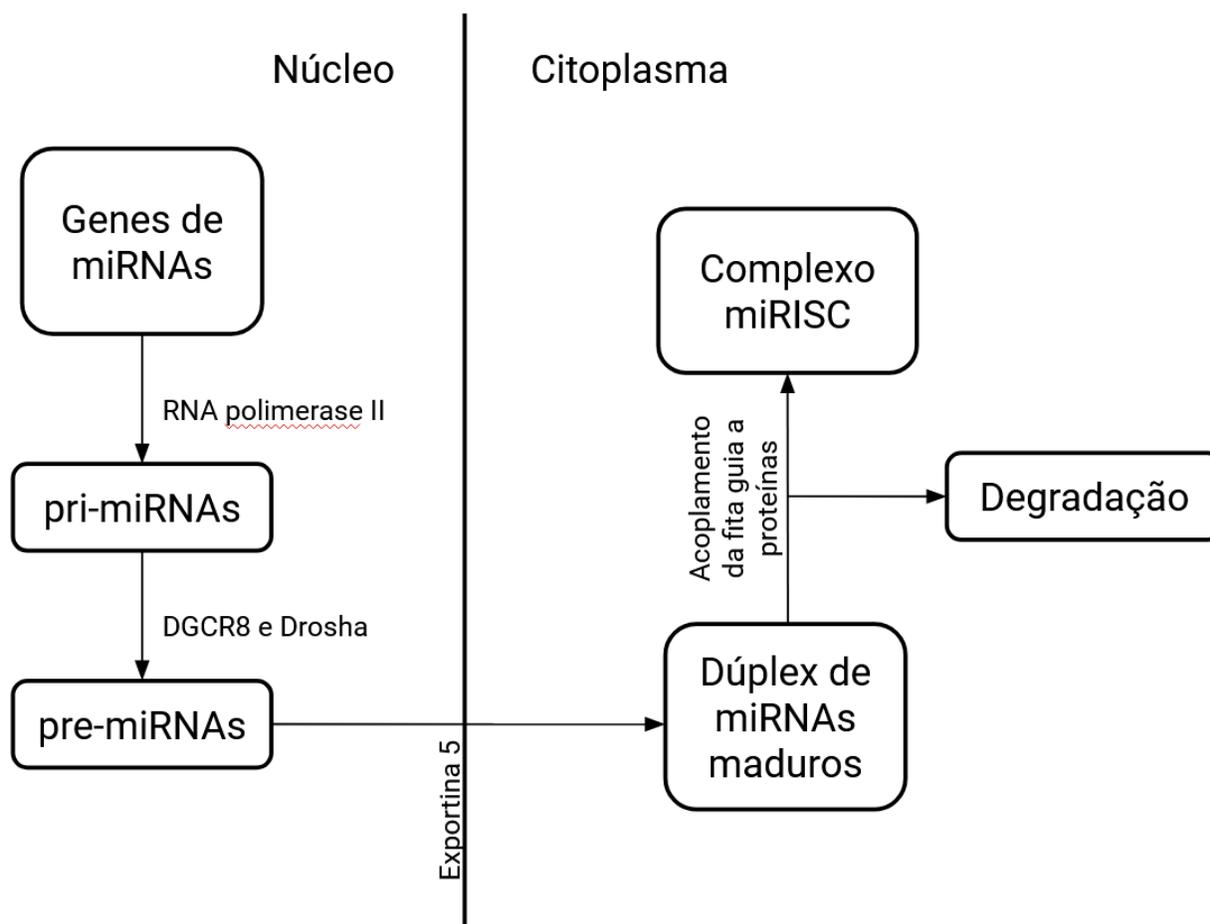
MiRNAs são pequenos RNAs não-codificantes (com em média 22 nucleotídeos de comprimento) que regulam a expressão genética pós-transcricionalmente (Gebert *et al.* 2019). Uma vasta diversidade de processos celulares são regulados por miRNAs, e estes são predominantemente bem conservados em uma ampla gama de espécies (Brennecke *et al.* 2005). Foi demonstrado que mutações em proteínas imprescindíveis à biogênese ou funcionalidade dos miRNAs apresentam efeitos impeditivos ao desenvolvimento animal (Brennecke *et al.* 2005; Gebert *et al.* 2019). MiRNAs são considerados pivotais à manutenção da homeostase e à diferenciação celular (Gebert *et al.* 2019).

A biogênese dos miRNAs compreende dois tipos principais de vias: a via canônica e as vias não-canônicas. Na via canônica, por meio da qual a maioria dos miRNAs é processada, os pri-miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II a partir de seus genes no núcleo celular (O'Brien *et al.* 2018). Os pri-miRNAs são processados em pre-miRNAs por meio de um complexo formado pela proteína de ligação a RNA DGCR8 (do inglês "*DiGeorge syndrome critical region gene 8*") e uma ribonuclease III (RNase) denominada Drosha (Tomari *et al.* 2005). Os pre-miRNAs são então transportados ao citoplasma pela Exportina 5, onde outra RNase III, a Dicer, cliva a extremidade intacta do pre-miRNA e forma um dúplex de miRNAs maduros (O'Brien *et al.* 2018; Tomari *et al.* 2005; Cai *et al.* 2009).

Cada fita do dúplex é denominada de acordo com os cortes promovidos pela Drosha na extremidade do pri-miRNA: as fitas denominadas 5p incluem a extremidade 5' do pre-miRNA, enquanto as fitas 3p correspondem à fita que se inicia na extremidade 3' do pre-miRNA (O'Brien *et al.* 2018; Tomari *et al.* 2005). A fita com menor estabilidade no pareamento da extremidade 5' do dúplex de miRNA geralmente tem preferência no acoplamento a uma proteína da família Argonauta, e é denominada fita guia; a fita que não é acoplada à proteína Argonauta é posteriormente degradada

(Gebert *et al.* 2019; O'Brien *et al.* 2018). O complexo formado pelo acoplamento da fita guia a proteínas das famílias Argonata e GW182 é denominado complexo miRISC (do inglês “*microRNA Induced Silencing Complex*”), e detecta seus alvos de forma sequência-específica (Gebert *et al.* 2019; Lin *et al.* 2015). Um fluxograma descrevendo graficamente a via canônica do processo de biogênese de miRNAs está representado na Figura 1.

Figura 1. Via canônica de biogênese de miRNAs.



Fonte: Thanny Porto, 2023.

A regulação gênica mediada por miRNAs geralmente ocorre por meio da ligação complementar entre duas regiões: a região denominada *seed*, que comumente se inicia no segundo e se estende até o sétimo nucleotídeo do miRNA; e elementos de reconhecimento de miRNAs (MREs) localizados em RNAs mensageiros (mRNAs)

(O'Brien *et al.* 2018). Além dessa interação, o pareamento adicional de uma região denominada “*supplemental*” na extremidade 3'-UTR (do inglês “*Untranslated Region*”) do miRNA torna a ligação deste a seu alvo mais específica e estável (O'Brien *et al.* 2018).

O complexo miRISC se liga então a MREs que estão predominantemente localizados na região 3'-UTR de mRNAs (Ha *et al.* 2014), podendo também estar localizados em regiões 5'-UTR ou regiões codificantes (Grimson *et al.* 2007). O grau de complementaridade entre as regiões *seed* e MRE determina o desfecho do mRNA envolvido nessa ligação (O'Brien *et al.* 2018): o pareamento inteiramente complementar entre essas duas sequências pode desencadear a clivagem do mRNA alvo (Jo *et al.* 2015). Porém, em células animais é comum que as sequências *seed* e MRE não sejam inteiramente complementares, e que a tradução do mRNA seja inibida por meio da degradação do mRNA (O'Brien *et al.* 2018). Nesses casos, a proteína GW182 do complexo miRISC possibilita o recrutamento de complexos protéicos que promovem a deadenilação e a decapagem do mRNA alvo, reduzindo conseqüentemente a estabilidade termodinâmica desse mRNA e aumentando sua susceptibilidade à degradação (Gebert *et al.* 2019; O'Brien *et al.* 2018).

Além da região 3'-UTR, miRNAs podem também se ligar a outras regiões e desencadear diferentes efeitos sobre a regulação gênica e a síntese protéica. Foi demonstrado que a ligação de miRNAs a regiões promotoras gênicas estimula a transcrição desses genes, enquanto a ligação de miRNAs às regiões codificantes ou regiões localizadas na extremidade 5' de mRNAs promovem o silenciamento da expressão gênica (Dharap *et al.* 2013; O'Brien *et al.* 2018). Ademais, o silenciamento de múltiplos genes pode ser promovido por um único miRNA, ainda que geralmente o efeito deste sobre a expressão daqueles genes não seja acentuado (Gebert *et al.* 2019). Paralelamente, miRNAs podem agir de maneira cooperativa, promovendo conjuntamente a repressão de um único alvo caracterizado por múltiplos sítios-alvos de miRNAs (Zhang *et al.* 2009; Gebert *et al.* 2019).

Uma grande diversidade de processos celulares, dentre eles proliferação, diferenciação, desenvolvimento e metabolismo energético, são regulados por miRNAs (Zhang *et al.* 2009). Esses reguladores genéticos operam no desenvolvimento de

diversos tipos celulares, e seu perfil de expressão pode ser alterado por diferentes fatores. Foi demonstrado, por exemplo, que a ingestão de uma dieta rica em gorduras durante o período da gravidez e da lactação em humanos promove alterações significativas nos níveis de expressão de miRNAs relacionados ao metabolismo e crescimento fetal na prole (Zhang *et al.* 2009), bem como nos níveis de expressão de miRNAs presentes no leite materno (Munch *et al.* 2013).

Além disso, no trabalho de Jacometo e colaboradores (2018), o suplemento de metionina fornecido a vacas Holstein no período pré-parto foi associado a alterações nos níveis de expressão de miRNAs que modulam a diferenciação e a função inflamatória em leucócitos polimorfonucleares (PMN) de bezerras. O perfil de expressão de miRNAs de diferentes tecidos pode ser portanto modulado pelo conteúdo nutricional da dieta administrada a mamíferos (Ojo *et al.* 2023).

2.2 Relevância do rúmen e sua microbiota na digestão de nutrientes

O estômago bovino compreende quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. O rúmen funciona como uma câmara de fermentação, onde reações químicas promovidas por microrganismos degradam a lignocelulose das fibras ingeridas e disponibilizam nutrientes para absorção pelo ruminante (Liu *et al.* 2021; Ojo *et al.* 2023; Matthews *et al.* 2019). Microrganismos do rúmen fermentam carboidratos, gerando ácidos graxos voláteis (AGVs) que, assim como ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e vitaminas, são absorvidos pelas células da parede ruminal (Wang *et al.* 2020; Liu *et al.* 2021). Além disso, a fermentação também gera dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e hidrogênio (H₂). O CO₂ e o H₂ agem como receptores e doadores de elétrons no rúmen, enquanto o CH₄ é eructado na atmosfera, bem como o CO₂ (Matthews *et al.* 2019). A produção de H₂ está relacionada ao pH ruminal, que pode ser alterado em função da dieta do bovino. Adicionalmente, o pH do rúmen é um dos fatores que afeta a estrutura da microbiota ruminal por meio de alterações no funcionamento de enzimas microbianas (Wang *et al.* 2020; Matthews *et al.* 2019).

A estrutura e a diversidade de comunidades da microbiota ruminal são moduladas em função de modificações no ecossistema ruminal e na dieta do hospedeiro (Andrade *et al.* 2022). Conseqüentemente, a composição e concentração de AGVs e AGCCs produzidos no rúmen também são alteradas (Andrade *et al.* 2022; Matthews *et al.* 2019). Portanto, a dieta dos bovinos é um fator determinante na manutenção da funcionalidade da microbiota ruminal, que por sua vez é imprescindível à nutrição dos ruminantes; e foi demonstrado que a estrutura e diversidade da microbiota influenciam também a manifestação de traços de interesse comercial em bovinos, como por exemplo emissão de metano e eficiência alimentar (Andrade *et al.* 2022; Liu *et al.* 2021).

Devido ao crescente interesse da comunidade científica nas interações entre microbiota e hospedeiro, estudos que possibilitem a compreensão do bovino e sua microbiota enquanto um único holobionte atraem cada vez mais atenção. A hipótese de que as interações entre a microbiota e o ruminante podem ser parcialmente reguladas por miRNAs do hospedeiro se tornaram um objeto de estudo bastante relevante, e o conhecimento gerado acerca desse tópico, ainda que não seja abundante, está em expansão (Ricci *et al.* 2022; Do *et al.* 2019; Malmuthuge *et al.* 2019; Liang *et al.* 2014).

2.3 sRNAs, miRNAs e a regulação de genes da microbiota

Evidências de que miRNAs de mamíferos interagem com genes bacterianos e promovem efeitos sobre a homeostase do hospedeiro têm sido relatadas em um número crescente de estudos (Du *et al.* 2021). Foi descrito, por exemplo, que o miR-21 pode inibir o crescimento de comunidades de bactérias *Lactobacillus reuteri* em camundongos (Santos *et al.* 2020). Outro exemplo é o trabalho de Liu e colaboradores (2016), que apresenta evidências do estímulo ao crescimento de *Fusobacterium nucleatum* e *Escherichia coli* (bactérias características da microbiota intestinal de camundongos) promovido por dois miRNAs fecais de camundongos (*i.e.* miR-1226-5p e miR-515-5p) *in vitro*.

Nesse estudo, Liu *et al.* (2016) demonstrou que a regulação dos miRNAs sobre os genes da microbiota foi específica e poderia ser negativa ou positiva; e que os miRNAs podem agir tanto no DNA quanto no RNA das bactérias analisadas. O mecanismo molecular que possibilita essas regulações, contudo, requer investigações futuras.

Em procariotos, a tradução de mRNAs específicos é parcialmente controlada por sRNAs (do inglês “*small RNAs*”) por meio de um mecanismo anti-senso (Desnoyers *et al.* 2013). Os sRNAs geralmente pareiam com mRNAs nas proximidades de sítios de ligação ao ribossomo (RBS, do inglês “*Ribosome Binding Site*”). Sequências de RBSs podem se estender de vinte nucleotídeos à montante até quinze nucleotídeos à jusante do primeiro nucleotídeo do códon de iniciação de tradução (Desnoyers *et al.* 2013). Por meio do pareamento com o mRNA, sRNAs impedem a ligação da subunidade ribossomal 30S à região RBS, promovendo a repressão da tradução e ocasionando a degradação do mRNA-alvo (Ahmed *et al.* 2016). Contudo, o pareamento entre mRNAs e sRNAs pode ocorrer em outras regiões do mRNA; por exemplo, na região 5'-UTR, onde o pareamento pode promover a tradução do mRNA ou exercer efeitos inibitórios sobre a mesma (Desnoyers *et al.* 2013).

Foi observado, portanto, que sRNAs de procariotos e miRNAs de eucariotos têm o potencial de regular pós-transcricionalmente a expressão de genes de procariotos. Enquanto há evidências que o hospedeiro regula geneticamente sua microbiota por meio de miRNAs, foi demonstrado também que a microbiota influencia o nível de expressão de miRNAs do hospedeiro (Nakata *et al.* 2017; Dalmaso *et al.* 2011; Peck *et al.* 2017). No trabalho de Williams *et al.* (2021), o nível de expressão de miRNAs em íleos de camundongos em resposta à intoxicação com 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) foi alterado em resposta à colonização por bactérias filamentosas segmentadas.

Portanto, há múltiplas evidências de que miRNAs são reguladores genéticos estratégicos na interação entre hospedeiro e microbiota. Considerando a importância da microbiota ruminal à nutrição, homeostase e saúde dos bovinos, essas observações ressaltam o potencial da aplicação de miRNAs na modulação da microbiota para beneficiar o desempenho do hospedeiro.

No presente estudo, identificamos como o perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal é diferencialmente afetado entre bovinos Nelore alimentados com dieta rica em grãos e bovinos alimentados com coprodutos agrícolas, como polpa cítrica. Além disso, investigamos a presença de sítios-alvos de miRNAs bovinos em sítios de ligação ao ribossomo associados a genes anotados em genomas montados a partir de metagenomas extraídos de conteúdo ruminal bovino. Identificamos dessa forma quais genes da microbiota são potenciais alvos de miRNAs do hospedeiro, expandindo o conhecimento sobre a regulação genética mediada por miRNAs no contexto de hologenomas.

3. Justificativa

A associação entre perfil de expressão de miRNAs e dieta foi estabelecida, bem como a regulação mediada por miRNAs e pela microbiota ruminal sobre fenótipos de eficiência alimentar, qualidade da carne e emissão de metano. Porém, são necessários estudos que explorem os efeitos do tratamento nutricional sobre o perfil de expressão de miRNAs em rúmen, bem como as vias potencialmente afetadas por estes.

A regulação de genes de microrganismos mediada por miRNAs do hospedeiro foi demonstrada; contudo, estudos que explorem os sítios de ligação a miRNAs em genomas de microrganismos são essenciais à compreensão da regulação de comunidades microbianas mediada pela genética bovina, bem como do holobionte como um todo.

4. Hipótese

miRNAs expressos na parede ruminal bovina têm o potencial de regular a expressão gênica da microbiota ruminal, bem como apresentam perfil de expressão relacionado à dieta do hospedeiro bovino.

5. Objetivos

5.1 *Objetivo geral*

Analisar a expressão diferencial de miRNAs da parede ruminal entre dois grupos de bovinos Nelore alimentados com duas diferentes dietas, e investigar a função predita destes como elementos reguladores de metagenomas identificados em conteúdo ruminal.

5.2 *Objetivos específicos*

- Identificar miRNAs diferencialmente expressos (DE) na parede ruminal de bovinos Nelore submetidos a dois tratamentos nutricionais;
- Explorar as funções preditas dos genes-alvos de miRNAs diferencialmente expressos entre bovinos submetidos a duas intervenções nutricionais distintas;
- Anotar genomas montados a partir de metagenomas (do inglês MAG, *Metagenome Assembled Genomes*) identificados em conteúdo ruminal bovino e explorar potenciais alvos de miRNAs bovinos nas sequências de MAGs identificados em conteúdo ruminal bovino.

6. Materiais e métodos

6.1 *Análise do perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal*

6.1.1 *Delineamento experimental, medidas de desempenho e coleta de amostras*

A população analisada neste trabalho corresponde aos animais gerados dentro do âmbito do projeto “Pegada Hídrica dos Produtos Carne e Leite”, coordenado pelo pesquisador Dr. Júlio César Pascale Palhares e fomentado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O delineamento experimental é baseado em um único fator: a intervenção nutricional. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com diretrizes de bem-estar animal e abate humanitário estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Pecuária Sudeste (protocolo No. 09/2016).

Um total de 52 novilhos contemporâneos não-castrados da raça Nelore foi alocado em quatro currais coletivos. Os animais tinham entre 20 e 21 meses de idade e a intervenção nutricional durou um total de 105 dias, durante os quais os animais eram alimentados duas vezes ao dia com sistemas de alimentação (GrowSafe® Ltda, Canadá) e fornecimento de água (modelo AF-1000 Master, Intergado® Ltda) automatizados para coleta de dados referentes a consumo diário de alimento e água, respectivamente.

Os novilhos foram subdivididos em dois grupos de tratamento: o primeiro grupo (n=26) continha animais que foram alimentados com uma dieta convencional baseada em grãos; e o segundo grupo (n=26) contemplava animais submetidos a uma dieta baseada em coprodutos agrícolas (Tabela 1). Os quinze primeiros dias da intervenção nutricional foram dedicados à adaptação dos animais ao novo ambiente, seguidos pelos estágios de crescimento e finalização. A composição da dieta fornecida aos dois grupos nos estágios de crescimento e finalização está descrita na Tabela 1. Na Tabela 2 são apresentados os principais teores identificados em cada dieta.

Tabela 1. Composição das dietas convencional e baseada em coprodutos agrícolas fornecidas aos bovinos Nelore durante os estágios de crescimento e finalização, respectivamente.

| Estágio de crescimento | | | |
|-------------------------------|---------------|--------------------|---------------|
| Convencional | | Coprodutos | |
| Ingredientes | Proporção (%) | Ingredientes | Proporção (%) |
| Silagem de milho | 81,80 | Silagem de milho | 73,00 |
| Farelo de soja | 4,95 | Farelo de amendoim | 3,22 |
| Grãos de milho | 11,79 | Germe de milho | 12,60 |
| Gordura protegida | 0,65 | Polpa cítrica | 7,79 |
| *Confinatto | 0,50 | *Confinatto | 0,64 |
| Uréia | 0,32 | Uréia | 0,17 |
| Estágio de finalização | | | |
| Convencional | | Coprodutos | |
| Ingredientes | Proporção (%) | Ingredientes | Proporção (%) |
| Silagem de milho | 72,80 | Silagem de milho | 57,30 |
| Farelo de soja | 3,06 | Farelo de amendoim | 4,70 |
| Grãos de milho | 21,44 | Germe de milho | 22,59 |
| Gordura protegida | 1,19 | Polpa cítrica | 13,96 |
| *Confinatto | 0,91 | *Confinatto | 1,15 |
| Uréia | 0,59 | Uréia | 0,30 |

*Confinatto N235 Agrocerec Multimix®

Tabela 2. Principais teores nutricionais das dietas* convencional e dieta baseada em coprodutos agrícolas fornecidas aos bovinos Nelore.

| | Convencional | Coprodutos |
|--|---------------------|-------------------|
| Proteína bruta, % na matéria seca (MS) | 13,91 | 14,81 |
| Matéria seca, % na alimentação | 62,51 | 72,16 |
| Gordura, % MS | 5,20 | 7,62 |
| Carboidrato não fibroso, %MS | 46,62 | 40,70 |
| Amido, % MS | 37,73 | 19,91 |
| Nutrientes totalmente digeríveis, % MS | 74,86 | 73,19 |

* Valores calculados na dieta de terminação.

MS: matéria seca.

Ao final dos 105 dias de intervenção nutricional, os animais foram abatidos. No abatedouro, um pedaço com área superficial de dois a três centímetros quadrados de tecido foi coletado da parede lateral do rúmen, incluindo todas as camadas da parede ruminal (o epitélio estratificado, circundado por uma camada muscular; e a submucosa, uma região densa de matriz extracelular).

Para padronizar a posição de coleta entre as amostras, foi utilizado como referência a abertura do esôfago e o retículo. O local de amostragem na parede lateral do rúmen foi definido como a área localizada aproximadamente duas polegadas abaixo do esôfago e caudal à borda do retículo. Imediatamente após a coleta, as amostras de parede ruminal foram lavadas com PBS para eliminação de resíduos de alimento, armazenadas em tubo falcon de 15 mL e conservadas a -80° C.

A estatística descritiva das medidas de desempenho dos animais resultantes do desenvolvimento do projeto “Pegada Hídrica dos Produtos Carne e Leite” são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Estatística descritiva de características fenotípicas dos 52 touros Nelore confinados sob dieta convencional e dieta baseada em coprodutos agrícolas.

| | | Convencional | Coprodutos | Teste T pareado |
|--|---------------|---------------------|-------------------|----------------------------|
| Emissão residual de metano (g/d) | Média | 7,95 | -7,95 | |
| | Minimo | -33,07 | -62,48 | 0,012 |
| | Máximo | 59,32 | 43,76 | |
| | Desvio-padrão | 22,14 | 21,97 | |
| Eficiência alimentar residual (kg/d) | Média | -0,20 | 0,20 | |
| | Minimo | -2,23 | -3,15 | 0,346 |
| | Máximo | 2,22 | 4,34 | |
| | Desvio-padrão | 1,10 | 1,86 | |
| Espessura de gordura externa entre a 11ª e a 12ª costela (cm) | Média | 3,58 | 4,73 | |
| | Minimo | 2 | 2 | 0,005 |
| | Máximo | 5 | 9 | |
| | Desvio-padrão | 0,99 | 1,71 | |
| Área de olho de lombo (mm) | Média | 68,3 | 70,66 | |
| | Minimo | 56,5 | 52,25 | 0,29 |
| | Máximo | 86,25 | 86,50 | |
| | Desvio-padrão | 7,68 | 8,27 | |

6.1.2 Extração de RNA total das amostras de parede ruminal

Em laboratório, as 52 amostras de parede ruminal foram individualmente submersas em nitrogênio líquido e maceradas com auxílio de um almofariz de

porcelana. O RNA total das amostras foi extraído com o uso de Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), conforme protocolo recomendado pelo fornecedor. A pureza e concentração das amostras foram analisadas pelo Nanodrop, e a integridade do RNA extraído foi verificada por meio do parâmetro número de integridade do RNA (RIN, do inglês "*RNA Integrity Number*"), obtido por meio da análise em um Bioanalyzer Agilent 2100 com RNA Nano Chip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Quatro amostras foram descartadas por apresentarem $RIN \leq 6,4$ e 48 amostras foram selecionadas para as etapas seguintes da análise.

6.1.3 Sequenciamento, controle de qualidade e mapeamento das sequências

O sequenciamento foi executado em plataforma Illumina HiSeq com uso do TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, EUA) no laboratório multiusuário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP), sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho.

As sequências de miRNAs geradas pelo sequenciamento tiveram sua qualidade verificada por meio das ferramentas FastQC (disponível em <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e MultiQC (Ewels *et al.* 2016), antes e depois do controle de qualidade. Adaptadores e leituras de baixa qualidade foram eliminados usando FASTX (<http://hannon-lab.cshl.edu/fastx-toolkit>) utilizando os mesmos parâmetros de qualidade descritos em De Oliveira *et al.* 2018. O mapeamento das sequências filtradas e a identificação do perfil de miRNAs foram realizados por meio do *software* miRDeep2 (Friedländer *et al.* 2012), usando o genoma de referência bovino ARS-UCD1.2 e as sequências de miRNA maduros da espécie *Bos taurus*, disponíveis no banco de dados miRBase (Griffiths-Jones *et al.* 2006).

6.1.4 Análise de expressão diferencial de miRNAs de parede ruminal

As leituras mapeadas foram filtradas, de forma que foram desconsideradas nas próximas etapas da análise os miRNAs que apresentaram valores de contagem nulos ou que foram identificados em menos de 20% das amostras. O pacote DESeq2 (Love *et al.* 2014) foi utilizado para a análise de expressão diferencial dos miRNAs entre os dois grupos de tratamento da intervenção nutricional. Os resultados foram ajustados para testes múltiplos usando o método da razão de falsas descobertas FDR (do inglês “*False Discovery Rate*”) $\leq 0,1$. Os miRNAs identificados foram considerados DE nos animais alimentados com coprodutos em relação aos alimentados com a dieta tradicional, ou seja, um sinal positivo denota que o miRNA foi mais expresso no grupo de coprodutos e um sinal negativo que foi menos expresso neste grupo.

6.1.5 Identificação de genes-alvos bovinos dos miRNAs DE em parede ruminal e respectivas vias metabólicas associadas aos mesmos

Os genes-alvos bovinos dos miRNAs DE entre os animais alimentados com as duas dietas, bem como as vias biológicas que têm o potencial de serem afetadas pela expressão diferencial desses miRNAs, foram identificados por meio da plataforma miRWalk (Sticht *et al.* 2018). Os sítios-alvos foram preditos por meio do algoritmo TarPmiR, que foi treinado com uma abordagem baseada no algoritmo de floresta aleatória e calcula pontuações para os sítios-alvos preditos (Ding *et al.* 2016). Por meio de um algoritmo de ranqueamento de variáveis qui-quadrado, a análise de enriquecimento funcional conduzida na plataforma miRWalk identifica, entre os genes de interesse, grupos funcionais de genes que foram significativamente enriquecidos com base em testes hipergeométricos (Sticht *et al.* 2018).

6.2 Associação entre o perfil individual de expressão de miRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal e fenótipos de eficiência alimentar e de emissão de metano

Os miRNAs identificados como significativos tiveram seu efeito sobre os fenótipos de consumo alimentar residual (CAR), emissão residual de metano (RME), EGAOL (espessura de gordura externa entre a 11^a e a 12^a costela) e AOL (área de olho de lombo) testado através de um modelo linear misto implementado no pacote lme4qtl (Ziyatdinov *et al.* 2018). O parentesco genético foi incluído como efeito aleatório na forma de uma matriz de parentesco para descartar o efeito da estrutura populacional na variação fenotípica, juntamente com dieta e grupo contemporâneo (GC, definido como o grupo de pesagem e o grupo de abate ajustados) como efeitos fixos. Detalhes sobre a construção da matriz e definição dos efeitos estão descritos em Andrade *et al.* (2022). Foram utilizados valores de leituras corrigidas de cada miRNA, obtidas pelo programa DESeq. Um teste de razão de verossimilhança foi usado para contrastar os modelos m1 (sem a inclusão do efeito de nível de expressão de um dado miRNA) e m2 (modelo completo, incluindo a expressão do miRNA). Nossos modelos podem ser descritos pelas seguintes fórmulas:

m1: fenótipo ~ Dieta + GC + Matriz de parentesco + erro residual.

m2: fenótipo ~ expressão miRNA + Dieta + GC + Matriz de parentesco + erro residual.

Valores significativos para todos os modelos foram ajustados para testes múltiplos usando o método da taxa de falsas descobertas (FDR) ($\alpha \leq 0,05$).

6.3 Análise de potenciais genes-alvos para os miRNAs bovinos diferencialmente expressos no rúmen em sequências de MAGs de conteúdo ruminal

6.3.1 Anotação funcional

Foram utilizados dados públicos de um total de 913 MAGs, montados por Stewart e colaboradores (2018) a partir do sequenciamento de bibliotecas de DNA de conteúdo ruminal bovino de 43 bovinos, os quais compreendiam indivíduos de três grupos de bovinos híbridos (das raças Aberdeen Angus, Limousin e Charolês) e uma raça pura (Luing). Como indicado na publicação de Stewart e colaboradores (2018), 28 dos 913 MAGs pertencem a organismos do reino Archaea, enquanto 885 MAGs foram identificados como bacterianos. A anotação funcional dos MAGs de microrganismos identificados no conteúdo ruminal bovino foi realizada por meio do *pipeline* Prokka (Seemann *et al.* 2014), que centraliza um conjunto de ferramentas de análise e predição de sequências, como BLAST+ (Camacho *et al.* 2009), Prodigal (Hyatt *et al.* 2010) e HMMER (Eddy, 2011); e se propõe a analisar sequências pré-montadas de DNA genômico procariótico.

6.3.2 Obtenção das janelas nucleotídicas referentes às RBS dos MAGs

Por meio da anotação funcional feita com o *pipeline* Prokka, foram obtidas as coordenadas genômicas das regiões codificadoras de genes identificados nos 913 MAGs (Stewart *et al.* 2018). A partir destas coordenadas, foram obtidas as sequências das janelas nucleotídicas que se estendem de 20 pb à montante a 15 pb à jusante do primeiro nucleotídeo de cada CDS (do inglês “*CoDing Sequence*”). As regiões CDS contém as regiões RBS dos genes procarióticos (Desnoyers *et al.* 2013). As sequências das RBS foram extraídas dos MAGs por meio das suas coordenadas genômicas usando as ferramentas BEDTools (Quinlan *et al.* 2010) e faSplit (disponível em <https://anaconda.org/bioconda/ucsc-fasplit>).

6.3.3 Identificação de potenciais alvos de miRNAs em genes anotados em MAGs de conteúdo ruminal bovino

Para a análise dos potenciais sítios-alvos de miRNAs bovinos em MAGs, as sequências de miRNAs maduros identificados como DE neste trabalho foram obtidas por meio do banco de sequências de miRNAs miRbase (Kozomara *et al.* 2019). A identificação de potenciais sítios-alvos de ligação dos miRNAs bovinos nas sequências RBS dos MAGs foi conduzida por meio do método de predição de alvos de miRNAs RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.* 2004), cujo algoritmo identifica interações significativas entre moléculas de RNA com base na mínima energia livre de hibridização (mfe) entre as mesmas.

Os resultados do método de predição de alvos de miRNAs foram filtrados, sendo consideradas significativas somente as interações entre sequências de miRNA bovino e RBSs dos MAGs que apresentaram $mfe \leq -22$ kcal/mol (Zhang *et al.* 2010) e $p\text{-valor} \leq 0,01$.

7. Resultados

7.1 Análise do perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal

7.1.1 Extração de RNA total

O RNA total das 52 amostras de parede ruminal foi extraído e sua qualidade foi verificada. Quatro amostras do grupo de tratamento alimentado com coprodutos agrícolas apresentaram valores RIN inferiores a 6,4 e foram portanto desconsideradas em análises posteriores. Assim, o grupo de tratamento alimentado com coprodutos foi reduzido em quatro amostras ($n = 22$). As estatísticas descritivas dos parâmetros RIN, rendimento e razão entre absorvâncias medidas a 260 nm e 280 nm estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Estatísticas descritivas referentes à extração do RNA total de 48 amostras de parede ruminal de bovinos da raça Nelore submetidos a dois tratamentos nutricionais diferentes.

| Grupo de tratamento | Número amostral | Estatística descritiva | RIN | Rendimento (ng/ μ l) | Razão 260/280 |
|---------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| Dieta rica em grãos | 26 | Média e desvio padrão | 7,74 \pm 0,63 | 1.310 \pm 814 | 2,02 \pm 0,04 |
| | | Valor mínimo | 6,70 | 187 | 1,91 |
| | | Valor máximo | 9,10 | 3.400 | 2,10 |
| Dieta baseada em coprodutos agrícolas | 22 | Média e desvio padrão | 7,57 \pm 0,59 | 1.360 \pm 864 | 2,01 \pm 0,05 |
| | | Valor mínimo | 6,40 | 249 | 1,90 |
| | | Valor máximo | 8,60 | 3.390 | 2,08 |

RIN: número de integridade do RNA (do inglês “*RNA Integrity Number*”).

7.1.2 Mapeamento e anotação das sequências de miRNA

As bibliotecas de miRNA referentes às 48 amostras selecionadas foram sequenciadas em plataforma Illumina. As estatísticas descritivas referentes ao total de *reads* geradas, número e percentual de *reads* mapeadas e não-mapeadas no genoma de referência bovino ARS-UCD1.2 para as 48 amostras de parede ruminal estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Estatísticas descritivas do mapeamento das sequências de microRNAs identificadas em amostras da parede ruminal de animais dos dois grupos de tratamento: dieta convencional e baseada em coprodutos.

| Dieta convencional | | | |
|--|-----------|--------------|--------------|
| Estatística descritiva | Total (M) | Mapeadas (M) | Mapeadas (%) |
| Média | 3,35 | 2,58 | 73 |
| Mediana | 3,01 | 2,17 | 75 |
| Mínimo | 1,39 | 0,799 | 51 |
| Máximo | 6,33 | 5,48 | 88 |
| Desvio padrão | 1,25 | 1,23 | 9 |
| Dieta baseada em coprodutos agrícolas | | | |
| Estatística descritiva | Total (M) | Mapeadas (M) | Mapeadas (%) |
| Média | 3,51 | 2,74 | 74 |
| Mediana | 3,53 | 2,57 | 77 |
| Mínimo | 1,19 | 0,664 | 48 |
| Máximo | 6,54 | 5,53 | 87 |
| Desvio padrão | 1,40 | 1,28 | 8 |

7.1.3 Análise de expressão diferencial de miRNAs de parede ruminal

Foram identificados nove miRNAs DE ($FDR \leq 0,1$). Sete destes (*i.e.* bta-miR-223, bta-miR-184, bta-miR-146b, bta-miR-132, bta-miR-874, bta-miR-363 e bta-miR-326) foram identificados como mais abundantes e dois como menos

abundantes (*i.e.* bta-miR-1246 e bta-miR-107) no grupo alimentado com coprodutos agrícolas em relação ao grupo alimentado com a dieta convencional rica em grãos. Os valores de FDR e $\log_2(\text{Fold Change})$ associados a cada miRNA DE estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. microRNAs diferencialmente expressos em touros Nelore alimentados com coprodutos em relação a touros alimentados com uma dieta convencional rica em grãos.

| miRNA DE | FDR | $\log_2(\text{Fold Change})$ |
|--------------|----------------------|------------------------------|
| bta-miR-223 | $4,86 \cdot 10^{-7}$ | 2,97 |
| bta-miR-184 | $1,79 \cdot 10^{-4}$ | 3,39 |
| bta-miR-1246 | $2,42 \cdot 10^{-4}$ | -1,37 |
| bta-miR-146b | $7,95 \cdot 10^{-3}$ | 1,11 |
| bta-miR-132 | $8,11 \cdot 10^{-3}$ | 0,93 |
| bta-miR-874 | $1,76 \cdot 10^{-2}$ | 0,64 |
| bta-miR-107 | $8,44 \cdot 10^{-2}$ | -0,21 |
| bta-miR-363 | $8,44 \cdot 10^{-2}$ | 1,01 |
| bta-miR-326 | $8,96 \cdot 10^{-2}$ | 0,61 |

FDR: taxa de falsas descobertas (do inglês “*False Discovery Rate*”).

7.1.4 Identificação de genes bovinos que são alvos dos miRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal e vias biológicas associadas aos produtos desses genes

Os números de genes-alvos bovinos identificados para cada um dos nove miRNAs DE em parede ruminal em resposta a dieta estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Número de genes bovinos identificados como alvos para cada um dos nove microRNAs diferencialmente expressos em amostras de parede ruminal do grupo de touros *Bos indicus* alimentados com coprodutos.

| miRNA diferencialmente expresso | Número de genes-alvos bovinos identificados |
|--|--|
| bta-miR-107 | 2028 |
| bta-miR-184 | 1225 |
| bta-miR-1246 | 425 |
| bta-miR-146b | 621 |
| bta-miR-132 | 1198 |
| bta-miR-874 | 1790 |
| bta-miR-223 | 481 |
| bta-miR-363 | 787 |
| bta-miR-326 | 2790 |

Algumas das principais vias biológicas da Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG) que foram enriquecidas para os genes-alvos dos nove miRNAs DE ($FDR \leq 0,1$), bem como os conjuntos de genes-alvos associados a essas vias, estão listados na Tabela 8. A lista completa de vias enriquecidas para os genes-alvos dos nove miRNAs DE ($FDR \leq 0,1$) está disponível na Tabela Suplementar 1.

Tabela 8. Principais vias da Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas relacionadas aos genes-alvos dos nove microRNAs diferencialmente expressos em animais alimentados com a dieta baseada em coprodutos em relação a animais alimentados com a dieta rica em grãos (FDR \leq 0,1).

| miRNA | Via biológica | FDR | Genes-alvos associados à via biológica* |
|--------------------------|---|------------|---|
| bta-miR-107 ^A | Via de sinalização Ras (bta04014) | 0,0283 | <i>MAP2K2, RALGDS, GNG4, FGFR1, RASSF5, MAPK8, PLCE1, FGF10, PAK5, FGF1, IGF2, RAC1, FGFR3, PIK3R1, PRKACA, RAP1B, RASGRF2, SOS1, PDGFC, RASAL1, RAPGEF5, KSR1, PLCG2</i> |
| | Via de sinalização MAPK (bta04010) | 0,0378 | <i>MAPKAPK3, NRAS, MAPK7, DUSP7, TAB1, NFKB2, FGFR1, TGFB2, FLNB, NFATC3, MAPK8, CACNA2D1, FGF10, FGF1, IGF2, RAC1, FGFR3, CACNB3, PRKACA, PPP3CA, RAP1B, RASGRF2, SOS1, PDGFC, ERBB4, CRKL</i> |
| | Metabolismo de fosfato de inositol (bta00562) | 0,0551 | <i>TPI1, ITPKB, INPP4B, PLCG2, IPPK</i> |
| | Via de sinalização do cálcio (bta04020) | 0,0721 | <i>HTR2A, ATP2B2, ORAI2, PLCE1, P2RX5, EDNRA, PRKACA, ATP2B1, PPP3CA, CD38, PTGFR, CAMK4, ERBB4, ITPKB, NOS1, PLCG2</i> |
| | Adesão focal (bta04510) | 0,0828 | <i>CCND3, MAPK8, ITGB3, PAK5, RAC1, ITGAV, PIK3R1, RAP1B, VAV3, SOS1, PDGFC, COL4A6, ITGA1, PPP1R12B, CRKL</i> |
| | Via de sinalização dos esfingolipídios (bta04071) | 0,0898 | <i>CERS2, SGPL1, MAPK8, RAC1, PIK3R1, SGPP2, PPP2R1B, GNA13</i> |
| bta-miR-223 ^B | Ferroptose (bta04216) | 0,0297 | <i>ACSL6, ACSL1, ATG7, SLC39A14, ACSL4</i> |
| | Peroxissomos (bta04146) | 0,0686 | <i>ACSL6, ACSL1, NOS2, NUDT7, ACSL4</i> |
| bta-miR-132 ^B | Via de sinalização Ras (bta04014) | 0,0047 | <i>PLA2G2D4, FGFR4, RASA2, PAK3, PIK3CD, EXOC2, RAB5B, FGF1, PGF, PIK3CA, SOS1, PTPN11, RALBP1, ARF6, KSR1, GAB2</i> |

| | | | |
|--------------------------|---|---------|---|
| | Resistência a insulina (bta04931) | 0,014 | <i>PTPA, RPS6KB2, TBC1D4, PIK3CA, PTPN11, PPP1R3E</i> |
| | Via de sinalização PI3K-Akt (bta04151) | 0,056 | <i>CDC37, PRKAA1, FGF20, FGFR4, CCNE1, PIK3CD, RPS6KB2, ITGA3, RXRA, FGF1, PGF, ITGAV, PIK3CA, ITGA4, MYB, SOS1, MAGI1, JAK2, LAMC3</i> |
| | Via de sinalização da insulina (bta04910) | 0,0574 | <i>EIF4E2, PIK3CD, RPS6KB2, PIK3CA, SOS1, PPP1R3E</i> |
| | Via de sinalização mTOR (bta04150) | 0,0937 | <i>MLST8, PIK3CA, SOS1, CAB39L, CASTOR2, RNF152</i> |
| bta-miR-184 ^B | Via de sinalização mTOR (bta04150) | < 0,001 | <i>TBC1D7, CLIP1, RRAGD, FZD3, PIK3CA, ATP6V1B2, INSR, CASTOR2, FZD5, BRAF, RNF152, PDPK1</i> |
| | Via de sinalização da insulina (bta04910) | 0,0918 | <i>MKNK1, INSR, CBL, BRAF, PPP1R3D, PDPK1</i> |
| bta-miR-874 ^B | Metabolismo de glicerofosfolipídios (bta00564) | 0,0194 | <i>GPAM, GPD2, DGKE, PCYT1B, PLA2G5, PHOSPHO1, AGPAT1, LOC615045, CHAT, DGKK, PLA2G4E</i> |
| | Via de sinalização cAMP (bta04024) | 0,0194 | <i>PPARA, PDE4B, ADCY6, ATP2B4, ATP2B2, MAPK8, ADCY9, GRIA3, CALM1, CFTR, FSHB, ADCY7, RAP1A, PRKACB, EDN1, CAMK4, SUCNR1, PDE4D, LOC523126, GIPR, CACNA1C, TIAM1, GABBR2</i> |
| | Via de sinalização Ras (bta04014) | 0,03 | <i>PLA2G2D4, NGFR, GNG4, EFNA2, ABL2, MAPK8, PLA2G5, PAK3, ABL1, KSR2, CALM1, FGF1, PGF, PRKCA, RAP1A, PRKACB, PRKCB, LOC615045, SOS1, RASAL2, TIAM1, PLA2G4E</i> |
| | Via de sinalização MAPK (bta04010) | 0,0366 | <i>DUSP10, NGFR, ERBB3, EFNA2, PPP5C, NFATC3, MAPK8, MAP3K12, RPS6KA6, MAP4K2, IL1R1, DUSP4, FGF1, PGF, MAPT, PRKCA, RAP1A, CACNB3, PRKACB, PRKCB, PPP3CA, SOS1, CACNG4, CACNA1C, PLA2G4E</i> |
| | Sistema de sinalização do fosfatidilinositol (bta04070) | 0,0366 | <i>CDIPT, CALM1, PRKCA, PI4KA, PRKCB, PI4KB, INPP5A, DGKK</i> |

| | | | |
|---------------------------|---|--------|---|
| | Via de sinalização do glucagon (bta04922) | 0,0617 | PRMT1, PRKAB2, CALM1, LDHA, PRKACB, PPP3CA, PYGM |
| | Via de sinalização do Wnt (bta04310) | 0,067 | RBX1, PRKCA, PRKACB, PRKCB, PPP3CA, CTBP2, DVL3, FBXW11, DAAM2, WISP1, WNT10B, WNT7B |
| bta-miR-326 ^B | Via de sinalização do Wnt (bta04310) | 0,0478 | CCND3, CAMK2G, FZD10, MAPK8, CUL1, LGR4, VANGL1, SMAD3, VANGL2, RSPO2, DVL1, SFRP1, SFRP5, CSNK2A2, CBY1, PLCB1, LRP6, NFATC2, FZD2, FZD5, WNT8B, WNT9B, WNT9A, FZD8 |
| bta-miR-1246 ^A | Diferenciação de células Th1 e Th2 (bta04658) | 0,0464 | CD3D, NFATC1, IL2RA, IL12RB2, LOC786717 |
| | Via de sinalização Ras (bta04014) | 0,0464 | ANGPT4, RALB, CALM1, FGF1, PIK3CA, LOC786717, TGFA, LOC521224 |

FDR: taxa de falsas descobertas (do inglês “*False Discovery Rate*”).

*Genes destacados em negrito foram identificados como potenciais alvos de mais de um dos nove microRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal de animais alimentados com coprodutos.

^AMenos expresso no grupo alimentado com coprodutos.

^BMais expresso no grupo alimentado com coprodutos.

7.1.5 Associação entre o perfil de expressão de miRNAs DE em parede ruminal entre os tratamentos e fenótipos de eficiência alimentar e emissão de metano

As análises de associação considerando os miRNA DE entre os tratamentos com os fenótipos de interesse não demonstraram nenhuma associação significativa. Os resultados dessa análise podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da análise de associação do perfil de expressão dos microRNAs diferencialmente expressos entre os animais alimentados com diferentes dietas com os fenótipos anotados.

| miRNA | RME | | | CAR | | | EGAOL | | | AOL | | |
|--------------|-------|---------|---------|-------|---------|---------|-------|---------|---------|-------|---------|---------|
| | Beta | p-value | q-value |
| bta-miR-107 | -0,11 | 0,52 | 0,79 | -0,03 | 0,860 | 0,931 | -0,03 | 0,83 | 0,83 | 0,11 | 0,39 | 0,71 |
| bta-miR-1246 | -0,14 | 0,41 | 0,79 | -0,29 | 0,085 | 0,765 | 0,04 | 0,78 | 0,83 | 0,04 | 0,76 | 0,76 |
| bta-miR-132 | -0,08 | 0,61 | 0,79 | -0,04 | 0,824 | 0,931 | -0,07 | 0,61 | 0,83 | -0,14 | 0,27 | 0,71 |
| bta-miR-146b | 0,08 | 0,61 | 0,79 | 0,01 | 0,931 | 0,931 | -0,06 | 0,68 | 0,83 | -0,06 | 0,65 | 0,73 |
| bta-miR-184 | -0,17 | 0,31 | 0,79 | -0,09 | 0,596 | 0,931 | 0,18 | 0,20 | 0,83 | 0,08 | 0,51 | 0,73 |
| bta-miR-223 | -0,01 | 0,93 | 0,94 | -0,02 | 0,903 | 0,931 | -0,14 | 0,32 | 0,83 | -0,12 | 0,36 | 0,71 |
| bta-miR-326 | -0,11 | 0,50 | 0,79 | 0,19 | 0,242 | 0,931 | -0,11 | 0,45 | 0,83 | -0,23 | 0,07 | 0,64 |
| bta-miR-363 | -0,01 | 0,94 | 0,94 | -0,08 | 0,650 | 0,931 | -0,09 | 0,54 | 0,83 | -0,15 | 0,23 | 0,71 |
| bta-miR-874 | -0,09 | 0,62 | 0,79 | 0,04 | 0,803 | 0,931 | -0,06 | 0,69 | 0,83 | -0,07 | 0,60 | 0,73 |

RME: emissão residual de metano; CAR: consumo alimentar residual; EGAOL: espessura de gordura externa entre a 11^a e a 12^a costela; AOL: área de olho de lombo.

7.2 Identificação de potenciais alvos de miRNAs em genes anotados em MAGs de conteúdo ruminal bovino

A partir das sequências de RBSs de genes anotados em MAGs de conteúdo ruminal e das sequências de miRNAs maduros de *Bos taurus*, foram identificados potenciais alvos de miRNAs bovinos. Um total de 3.718 genes foram identificados como potenciais genes-alvos de miRNA bovinos em sequências RBS de 888 dos 913 MAGs analisados. Destes genes, 212 genes são potenciais alvos dos nove miRNAs DE identificados em parede ruminal entre os touros submetidos a duas intervenções nutricionais diferentes.

Dentre os 212 genes, quatro e 208 foram identificados como potenciais genes-alvos conhecidos em RBSs de MAGs de Archaea e Bacteria, respectivamente. Nos MAGs de Archaea, foram preditos genes-alvos para três dos miRNAs DE (*i.e.* bta-miR-1246, bta-miR-326 e bta-miR-363). Paralelamente, oito dos miRNAs DE (*i.e.* todos exceto bta-miR-1246) apresentaram genes-alvos nos MAGs de organismos do reino Bacteria. Os genes dos MAGs identificados como potenciais alvos dos miRNAs DE estão listados na Tabela 10; os genes identificados como potenciais alvos de todos os miRNAs bovinos analisados encontram-se na Tabela Suplementar 2.

Tabela 10. Lista de genes conhecidos nos genomas montados a partir de metagenomas que foram identificados como alvos dos microRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal, entre animais submetidos a diferentes dietas.

| microRNA DE | Número de potenciais genes-alvos | Potenciais genes-alvos* |
|---------------------------|----------------------------------|--|
| bta-miR-107 ^A | 5 | <i>smc_3, bepC_1, atpA, ftsZ, fba_1</i> |
| bta-miR-184 ^B | 10 | <i>gapA1, fieF_3, amn, queE, pknD_3, clpC, czcD, gltD, argJ</i> , gene da Beta-galactosidase BoGH2A |
| bta-miR-1246 ^A | 1 | <i>hypE</i> |
| bta-miR-146b ^B | 0 | Nenhum gene-alvo conhecido identificado. |
| bta-miR-132 ^B | 2 | <i>rlhA, oprM_2</i> |
| bta-miR-874 ^B | 102 | <i>menE, murJ_2, srmB, susB_1, ybhR_1, yhhT, ispE_1, rplC, rpoN, bar, rimM_1, dinB_3, ruvC, yycJ, aptB_2, rhIE, tdiR, groL, topA, ansA, moaC, mltC, rimM, dinB_1, yacL, rpsM, dbpA, btuD_1, hdfR_5, nadD, phoU, tagO, ulaF, ppx, iaaH_3, degA_1, clpB, leuS, comEC, araD, noc_1, ispF, dinB_2, murJ_1, rho, murC, atpE, dmdC, priA_2, wbpl, pdhC, selD, miaA_2, mglA_2, rnc, atsB, recX, ngcG_3, fumD, purM, cobD, guaB1, ispE_2, glpT_4, gpmA, dinG, aroC, nagZ, ung_2, copA, lgt_1, gcvH, mdtK_1, trkG, lgt, rtcB_1, dasC, prfB, mepA_8, susB_2, DmdB, leuB, ybaK, ldhA, manA, yegS, mntR, sdhA, esiB_23, yitJ_1, dusB, gabR, ecfA1, prkC, mreB, xseA, amyE_2, ygfK</i> , gene da 3-metiladenina DNA glicosilase putativa, gene do regulador transcricional putativo do tipo HTH, gene da serina protease putativa semelhante a CtpA, gene da fosfatase de carboidratos fosforilados |
| bta-miR-223 ^B | 13 | <i>greA_1, pfkA, fucU, greA_2, gltS_2, pyrF, hisD_1, cobB, opuE_2, mntP_2, dnaG_2, gtfA, metN2</i> |
| bta-miR-363 ^B | 9 | <i>ybbH, birA, hisK, rpoC, lepA, smc, citE_2, rnfC_2, fklB_2</i> |
| bta-miR-326 ^B | 72 | <i>rlmB_1, yhaM_2, ispG, ilvB, alaS, sdsA, argA, trpG, pyrB_2, atpB, ravA, bfrA, ybaK, iscS_1, scS, iscS_2, coaE, dapF, mntH_1, rluF, ybeY, fruG, galK, gltX, moaA_1, engB, hipO, ruvA, rhaR_1, rspR_2, rspR_1, araH_3, ansA, lon1,</i> |

| | |
|--|--|
| | <i>fabD, mneP, map_3, map_2, map_1, nanM, gdh, ndhS_1, nrgB, glnB, mazG, appA, pckA, tagU_1, pnp, pepIP, secA, epsE, yggS, proC, rnhB, rsmB, rpe, rcsC_3, stkP, baeS, smpB, tmk, tabA, mraZ, trkA_1, trmB, iphP, murB_2, uvrA, btuC</i> , gene da proteína de homeostase de piridoxal fosfato, gene da proteína tipo TelA |
|--|--|

*Genes identificados em genomas montados a partir de metagenomas de arqueas estão em negrito.

^AMenos expresso no grupo alimentado com coprodutos.

^BMais expresso no grupo alimentado com coprodutos.

Os genes *ansA*, *smpB*, *ybaK*, *iscS*, *iscS_1*, *iscS_2*, *map_1*, *map_2* e *map_3* foram os genes identificados com maior frequência entre os genes de MAGs como potenciais alvos de miRNAs DE.

8. Discussão

8.1 Análise do perfil de expressão de miRNAs em parede ruminal

8.1.1 miRNAs diferencialmente expressos em parede ruminal entre os animais alimentados com duas dietas diferentes

Nove miRNAs DE entre touros alimentados com diferentes dietas foram identificados. Dentre estes, três deles (*i.e.*, bta-miR-223, bta-miR-363 e bta-miR-1246) foram previamente associados por eficiência alimentar (Mukiibi *et al.* 2020). Os miRNAs bta-miR-223 (FDR = $4,86 \cdot 10^{-7}$) e bta-miR-363 (FDR = $8,44 \cdot 10^{-2}$), mais abundantes na parede ruminal de animais alimentados com coprodutos que em animais alimentados com a dieta convencional, foram descritos na literatura como mais abundantes em fígado de bovinos da raça Kinsella Composite com baixos valores de CAR. Estes miRNAs foram portanto identificados como potenciais reguladores da eficiência alimentar (Mukiibi *et al.* 2020).

O miRNA bta-miR-223 é um regulador central da resposta transcricional à infecção causada por *Staphylococcus aureus*, e seu nível de expressão pode auxiliar com precisão na identificação precoce de processos inflamatórios; adicionalmente, sua atividade estimula a ativação da resposta pró-inflamatória de macrófagos (Fang *et al.* 2016; Tzelos *et al.* 2022; Jacometo *et al.* 2018). No trabalho de Fang *et al.* (2016), também foi descrito que a regulação mediada pelo bta-miR-223 influencia a expressão de múltiplos genes relacionados ao metabolismo de lipídios. Além disso, a expressão deste miRNA foi mais abundante em tecido mamário de fêmeas Holstein lactantes infectadas com *Streptococcus uberis*, quando comparada com a expressão em animais do grupo saudável; e seus genes-alvos foram associados a um possível efeito inibitório sobre o metabolismo de lipídios (Naeem *et al.* 2012). Portanto, o bta-miR-223 pode também desempenhar um importante papel na defesa dos hospedeiros contra infecções bacterianas e no metabolismo de lipídios.

O miRNA bta-miR-146b (FDR = $7,95 \cdot 10^{-3}$) foi identificado como mais abundante em animais alimentados com coprodutos agrícolas; e foi descrito em outra população Nelore como um regulador negativo da composição de ácidos graxos em músculo bovino (De Oliveira *et al.* 2019). Além disso, esse miRNA também foi identificado como menos abundante em Nelore com alto conteúdo de gordura intramuscular (De Oliveira *et al.* 2018). A gordura intramuscular representa a quantidade de gordura acumulada entre fibras musculares ou dentro de células musculares, e tem impacto determinante na qualidade da carne (Wood *et al.* 2008).

O miRNA bta-miR-874 (FDR = $1,76 \cdot 10^{-2}$), mais expresso em animais alimentados com coprodutos, pode inibir a expressão do gene *RXR α* . O gene *RXR α* codifica o receptor de ácido X retinóico alfa (*RXR α*), um receptor nuclear que forma um heterodímero com o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma de isoforma γ (*PPAR γ*) e se liga à região promotora RARE dos genes-alvos, regulando por exemplo o metabolismo lipídico e a diferenciação celular (Guo *et al.* 2017; Latruffe *et al.* 2000). A dieta baseada em coprodutos contém maior quantidade de gordura (cerca de 47% a mais do que a dieta padrão, no estágio de finalização) e levou a uma maior deposição de gordura (EGAOL) nos animais alimentados com essa dieta, fortalecendo a hipótese de que o bta-miR-874 pode estar implicado na regulação do metabolismo de lipídios (Li *et al.* 2018; Guo *et al.* 2017).

De acordo com o QTLdb (Mudadu *et al.* 2020), sete dos nove miRNAs DE estão colocalizados com QTLs (do inglês “*Quantitative Trait Loci*”) para diversas características de bovinos de corte e de leite (*i.e.*, bta-miR-184, bta-miR-132, bta-miR-146b, bta-miR-326, bta-miR-874, bta-miR-363 e bta-miR-107).

Dentre estes, o bta-miR-184 (FDR = $1,79 \cdot 10^{-4}$; mais expressos em animais alimentados com coprodutos) está colocalizado com QTLs para diversas características; entre elas gordura na 12^a costela, tamanho e peso corporal, área de olho de lombo e duração da gestação. O bta-miR-146b (mais expressos em animais alimentados com coprodutos) também se encontra em uma região de QTLs para múltiplas categorias, dentre elas rendimento de proteína e gordura do leite, peso da gordura interna, consumo alimentar residual, e duração da gestação. O bta-miR-132 (FDR = $8,11 \cdot 10^{-3}$; mais expressos em animais alimentados com coprodutos) se

encontra em uma região de QTLs relacionada ao marmoreio, conteúdo de ácido oléico, CAR e peso corporal. O bta-miR-326 (FDR = $8,96 \cdot 10^{-2}$; mais expressos em animais alimentados com coprodutos) se encontra em uma região de QTLs para algumas características, das quais se destacam marmoreio, altura e peso corporal; e o bta-miR-874 (FDR = $1,76 \cdot 10^{-2}$; mais expressos em animais alimentados com coprodutos) está colocalizado numa região de QTLs para gordura na 12^a costela e peso corporal, dentre outras características. O bta-miR-107 (FDR = $8,44 \cdot 10^{-2}$), mais abundante em touros alimentados com a dieta padrão, está colocalizado com QTLs para ponto de fusão da gordura, conteúdo de ácidos graxos saturados e área de olho de lombo. Estes resultados também reforçam a ideia da implicação direta desses miRNAs sobre o metabolismo de lipídios e deposição de gordura (EGAOL), visto que alguns dos miRNAs DE encontrados neste trabalho (i.e., bta-miR-184, bta-miR-874) estão localizados em QTL para gordura na 12^a costela e outros fenótipos do metabolismo de lipídios.

Esses resultados sugerem que uma dieta baseada em coprodutos (com maior conteúdo de gordura, menor conteúdo de amido, mais matéria seca e menos uréia em comparação à dieta convencional) pode ter o potencial de influenciar a eficiência alimentar e o metabolismo lipídico por meio da regulação mediada pelos miRNAs bta-miR-184, bta-miR-223, bta-miR-146b, bta-miR-132, bta-miR-326 e bta-miR-874. Esta hipótese de modulação, contudo, não foi confirmada nesse trabalho, visto que a associação da expressão dos miRNAs DE entre as dietas com os fenótipo analisados não foram significativas. Não foram encontradas diferenças significativas para CAR entre as dietas no experimento de avaliação durante todo o período de confinamento, conforme descrito nos materiais e métodos desse trabalho. Contudo, houve diferença significativa de CAR no período de terminação desses animais: os animais alimentados com a dieta convencional foram associados ($P < 0,05$) a um CAR mais baixo que os animais alimentados com coprodutos (Malheiros et al.)¹. A futura investigação da associação dos demais miRNAs expressos em rúmen com a característica CAR (nos

¹ Malheiros, J.M.; Correia, B.S.B.; Ceribeli, C.; Bruscadin, J.J.; Diniz, W.J.S.; Banerjee, P.; Vieira, D.S.; Cardoso, T.F.; Andrade, B.G.N.; Petrini, J.; Cardoso, D.R.; Colnago, L.A.; Junior, S.B.; Mourão, G.B.; Coutinho, L.L.; Palhares, J.C.P.; Medeiros, S.R.; Berndt, A.; Regitano, L.C.A. *Ruminal and feces metabolites associated with feed efficiency, water intake and methane emission in Nelore bulls*. Submetido à publicação na revista Scientific Reports.

diferentes períodos de análise), bem como com outros fenótipos relacionados à deposição de gordura e perfil de ácidos graxos, poderá elucidar com mais detalhes a extensão da regulação exercida por miRNAs sobre esses traços.

8.1.2 Vias metabólicas de bovinos associadas aos genes-alvos dos miRNAs diferencialmente expressos

Um total de 92 vias biológicas foram associadas ($FDR \leq 0,1$) aos genes-alvos identificados para os miRNAs DE entre os animais submetidos às duas intervenções nutricionais.

Quatro das principais vias significativamente enriquecidas foram associadas aos miRNA DE com aumento de expressão nos animais alimentados com coprodutos: 1) via de sinalização PI3K-Akt (bta04151; $FDR = 0,056$, bta-miR-132); 2) via de sinalização mTOR (bta04150; $FDR = 0,0937$ para o bta-miR-132 e $FDR = 0,0918$ para o bta-miR-184); 3) metabolismo de glicerofosfolípidios (bta00564; $FDR = 0,0194$, bta-miR-874); 4) via de sinalização do Wnt (bta04310; $FDR = 0,067$ para o bta-miR-874 e $FDR = 0,0478$ para o bta-miR-326).

O gene *PLA2G4E* (alvo do bta-miR-874) codifica a fosfolipase A_2 do grupo IVE, um dos seis membros do grupo IV de fosfolipases A_2 (Ohto *et al.* 2005); e foi associado à via de sinalização Ras (bta04014; $FDR = 0,03$), à via de sinalização MAPK (bta04010; $FDR = 0,0366$) e à via de metabolismo de glicerofosfolípidios (bta00564; $FDR = 0,0194$). A via de sinalização Ras (bta04014; $FDR = 0,0464$) também foi enriquecida para alvos dos miRNAs bta-miR-1246 e bta-miR-107, que foram identificados como menos abundantes em touros alimentados com coprodutos; bem como para os miRNAs bta-miR-132 e bta-miR-874, identificados como mais abundantes em touros alimentado com coprodutos. Foi demonstrado que a via de sinalização Ras ativa a cascata de sinalização promovida por proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs, do inglês "*mitogen activated protein kinase*") e as vias de sinalização PI3K-AKT-mTOR, que promovem o crescimento e a divisão celular bem como a inibição da apoptose (Yang *et al.* 2021). A via de sinalização Wnt regula a

diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSC) em osteoblastos (Li *et al.* 2018); e a via de metabolismo de glicerofosfolípidios (bta00564) foi significativamente enriquecida (FDR = 0,0194) para um conjunto de onze genes-alvos (*i.e.* *GPAM*, *GPD2*, *DGKE*, *PCYT1B*, *PLA2G5*, *PHOSPHO1*, *AGPAT1*, *LOC615045*, *CHAT*, *DGKK* e *PLA2G4E*) do miRNA bta-miR-874.

Considerando o maior teor de gorduras presente na dieta baseada em coprodutos e um aumento de EGAOL, esses resultados fortalecem a hipótese de que o aumento no nível de expressão do bta-miR-874 em animais alimentados com coprodutos pode estar relacionado à regulação da adipogênese nesses animais.

O gene *SCD* foi identificado como alvo do miRNA bta-miR-874 e relacionado a diversas vias metabólicas (bta01100; FDR = 0,0366); bem como o gene *ELOVL6*, que regula a lipogênese e a lipólise por meio das vias de sinalização Wnt, cAMP, FoxO e PI3K-Akt em adipócitos bovinos (Junjvlieke *et al.* 2020). O gene *ELOVL6* regula positivamente ácidos graxos de cadeia longa (*i.e.* C18:0 e C20:4n6); e regula negativamente os ácidos graxos de cadeia curta C14:0 e C16:0 (Junjvlieke *et al.* 2020). Em estudo do perfil de metaboloma do rúmen e das fezes dos mesmos animais utilizados no presente trabalho (Malheiros *et al.*)², foi observado um aumento de C14:0, C15:0 e C16:0 nos animais alimentados com co-produtos, corroborando a hipótese de inibição do gene *ELOVL6* pela ação do bta-miR-874 nesses animais. Além disso, os genes *SCD* e *ELOVL6* foram identificados como candidatos para a regulação da deposição de gordura em bovinos Huaxi por meio da regulação positiva de ácidos graxos monoinsaturados e triglicerídeos; e da regulação negativa de ácidos graxos saturados, diacilglicerol e liso-glicerofosfocolina (Du *et al.* 2022).

Os genes *CDK2*, *ACSL1* e *SCD* são marcadores genéticos relacionados à adipogênese (Guo *et al.* 2021) e foram respectivamente identificados como alvos dos miRNAs bta-miR-326, bta-miR-223 e bta-miR-874 (identificados como significativamente mais abundantes na parede ruminal de animais alimentados com coprodutos); e associados a vias biológicas significativamente enriquecidas em bovinos

² Malheiros, J.M.; Correia, B.S.B.; Ceribeli, C.; Bruscadin, J.J.; Diniz, W.J.S.; Banerjee, P.; Vieira, D.S.; Cardoso, T.F.; Andrade, B.G.N.; Petrini, J.; Cardoso, D.R.; Colnago, L.A.; Junior, S.B.; Mourão, G.B.; Coutinho, L.L.; Palhares, J.C.P.; Medeiros, S.R.; Berndt, A.; Regitano, L.C.A. *Ruminal and feces metabolites associated with feed efficiency, water intake and methane emission in Nelore bulls*. Submetido à publicação na revista Scientific Reports.

alimentados com coprodutos. O gene *CDK2* é alvo do bta-miR-326 e foi associado à via de sinalização FoxO (bta04068; FDR = 0,0478).

O gene *ACSL1* é alvo do bta-miR-223, e foi significativamente associado à ferroptose (bta04216; FDR = 0,0297) e a peroxissomos (bta04146; FDR = 0,0686). Esse gene modula a síntese de ácidos graxos insaturados e a formação de gotículas lipídicas em adipócitos bovinos (Bai *et al.* 2021). Neste trabalho, a via de peroxissomos (bta04146; FDR = 0,0686) e de ferroptose (bta04216; FDR = 0,0297) foram significativamente enriquecidas para os genes-alvos do bta-miR-223. Em cada uma das duas vias participam um total de cinco genes-alvos do bta-miR-223 (*i.e.* *ACSL6*, *ACSL1*, *NOS2*, *NUDT7* e *ACSL4*; e *ACSL6*, *ACSL1*, *ATG7*, *SLC39A14* e *ACSL4*, respectivamente).

Ambas vias estão associadas ao metabolismo de lipídios. A via de peroxissomos promove a oxidação de ácidos graxos e a síntese de lipídios, que ativam o PPAR γ . Este receptor é um regulador central da diferenciação de adipócitos, e induz a adipogênese por meio da ativação de uma cascata de sinalização relacionada a MAPKs como ERK1 e ERK2, regulando a expressão de genes relacionados à biogênese que ocorre em peroxissomos (Lodhi *et al.* 2014; Li *et al.* 2018; Prusty *et al.* 2002). A ferroptose é um processo de morte celular mediado pela peroxidação lipídica, e está relacionada a alterações no metabolismo de lipídios (Sun *et al.* 2022). A dieta baseada em coprodutos contém aproximadamente 47% a mais de gordura que a dieta padrão (no estágio de finalização), e essa diferença nutricional pode estar relacionada ao enriquecimento significativo destas duas vias biológicas para alvos do bta-miR-223, identificado como mais abundante em animais alimentados com coprodutos.

Esses resultados indicam que a ingestão de uma quantidade maior de gordura, característica da dieta baseada em coprodutos, está correlacionada a um aumento significativo na expressão de miRNAs que modulam processos relacionados ao metabolismo de lipídios, como por exemplo a adipogênese, lipogênese e sinalização celular.

8.2 Identificação de potenciais alvos de miRNAs em genes de MAGs de conteúdo ruminal bovino

Um total de 3.718 genes foram identificados como potenciais alvos de miRNAs bovinos em sequências RBS de genes anotados em 888 dos 913 MAGs provenientes de conteúdo ruminal.

O gene *cobD* foi identificado como alvo do miRNA bta-miR-874 (mais abundantemente expresso em animais alimentados com coprodutos, e descrito como regulador do metabolismo de lipídios na literatura). O gene *cobD* foi associado ao fenótipo CAR e foi significativamente mais expresso no rúmen de animais mais eficientes; esse gene codifica a treonina-fosfato descarboxilase, que está relacionada à biossíntese de vitamina B12 (Lima *et al.* 2019).

Por se tratar de um cofator essencial que não é produzido por eucariotos, é necessário que a vitamina B12 seja ingerida por meio da dieta ou disponibilizada para absorção animal pela microbiota ruminal (Warren *et al.* 2002). Em bovinos alimentados com dietas ricas em fibras, a vitamina B12 foi associada ao CAR e a alterações no apetite de ruminantes por meio do aumento no conteúdo de cobalto e ácidos graxos voláteis (VFAs) associados a esse tipo de dieta (Beaudet *et al.* 2017; Frost *et al.* 2014; Lima *et al.* 2019). Foi demonstrado que o gene *cobD*, bem como os genes de microrganismos *cbiN* e *cobL* (também relacionados à biossíntese de vitamina B12) apresentam maior abundância em animais eficientes (Lima *et al.* 2019). Observando que genes essenciais à biossíntese de vitamina B12 apresentaram o potencial de serem regulados por miRNAs bovinos no presente trabalho, podemos formular a hipótese de que bovinos podem modular a biossíntese de vitamina B12 por meio da regulação genética de organismos da microbiota ruminal através desses miRNAs e controle desses genes oriundos dos microrganismos; no entanto a contribuição dessa modulação para a eficiência alimentar no presente trabalho não pode ser confirmada pelas análises de associação entre nível de expressão e fenótipos CAR e RME.

Os genes *asd* e *paak* foram identificados como potenciais alvos de miRNAs bovinos (*i.e.*, bta-miR-369-5p, bta-miR-11975 e bta-miR-11976). Ambos genes estão associados ao metabolismo de aminoácidos e vias de transporte; e junto de outros 12

genes, podem explicar 65,4% da variação no ganho de peso diário (GPD) entre animais divergentes para taxa de conversão alimentar (CA) (Lima *et al.* 2019). O gene *paak* foi também associado na literatura a ovelhas com alta produção de metano (Kamke *et al.* 2016). No presente trabalho, o gene *paak* foi identificado como um potencial alvo dos miRNAs bta-miR-369-5p, bta-miR-11975 e bta-miR-11976 em dois MAGs do reino Archaea (um do gênero *Methanomethylophilus* e outro do filo *Euryarchaeota*) e em um MAG de *Actinobacteria*. A partir desses resultados, podemos formular a hipótese de que a regulação mediada por miRNAs bovinos acrescenta uma camada adicional ao modelo proposto por Lima *et al.* (2019) para prever GPD em função da presença dos genes *asd* e *paak* no metagenoma; bem como que miRNAs bovinos têm o potencial de modular a emissão de metano por meio da regulação pós-transcricional de genes da microbiota, como por exemplo o gene *paak*.

O gene *lpxA* está relacionado à integração do lipídio A na parede celular, sendo portanto útil à prevenção contra o sistema imunológico do hospedeiro (Raetz *et al.* 2007). Duas isoformas desse gene (*lpxA* e *lpxA_2*) foram identificadas como potenciais alvos dos miRNAs bovinos bta-miR-324, bta-miR-2904, bta-miR-339b, bta-miR-744 e bta-miR-339a em MAGs de organismos das famílias *Prevotellaceae* e *Veillonellaceae*. Com base nesses resultados, podemos formular a hipótese de que a regulação mediada por miRNAs do hospedeiro sobre o gene *lpxA* poderia ser uma estratégia do bovino para controlar o desenvolvimento de comunidades bacterianas por meio do reconhecimento pelo sistema imunológico bovino.

O bta-miR-339a (que apresenta sítios-alvos no gene *lpxA*) foi descrito em um trabalho anterior do nosso grupo como um dos principais reguladores negativos da expressão gênica relacionada ao conteúdo de ácido oléico em músculo esquelético; e apresentou mais conexões no grupo de bovinos com baixo conteúdo de ácido oléico (De Oliveira *et al.* 2019). Foi descrito que genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e proteínas, bem como na digestão de carboidratos fibrosos e não fibrosos, em vias de conservação de energia metabólica, e na produção de metano, podem estar relacionados a diferenças na abundância e diversidade de organismos da microbiota ruminal entre animais divergentes para eficiência alimentar (Lopes *et al.* 2021).

Três isoformas do gene *galk* (*i.e.* *galk*, *galk_1* e *galk_2*) foram identificadas como potenciais genes-alvos dos miRNAs bta-miR-205, bta-miR-370, bta-miR-149-5p, bta-miR-2474 e bta-miR-326 (sendo o bta-miR-326 significativamente mais abundante na parede ruminal de touros alimentados com coprodutos). Foi demonstrado que os genes *galk*, *punA*, *xylE*, *uidA*, *lpxA* e *aguA*, juntamente com outros catorze genes, podem explicar 63,4% da variação na CA observada entre bovinos divergentes para essa característica (Lima *et al.* 2019). Esses seis genes foram identificados como potenciais alvos de miRNAs bovinos; sugerindo, portanto, que a CA pode ser parcialmente modulada pelo bovino por meio da regulação mediada por miRNAs sobre genes da microbiota.

9. Conclusão

A análise dos dados experimentais permitiu concluir que as diferentes composições das dietas de coprodutos e convencional podem influenciar significativamente o perfil de expressão de miRNAs da parede ruminal de touros Nelore. A dieta baseada em coprodutos levou a um aumento da expressão de sete dos nove miRNA identificados como diferencialmente expressos. Essa diferença pode se dar em resposta, particularmente, ao maior teor de gordura na dieta de coprodutos. Essa influência se demonstrou também nas vias enriquecidas para os genes-alvos dos miRNAs DE entre tratamentos através do enriquecimento de múltiplas vias relacionadas ao metabolismo e vias de sinalização celular, com destaque para o bta-miR-874, que foi mais expresso em animais alimentados com coprodutos e pode estar implicado na regulação do metabolismo de lipídios.

Ademais, diversos genes anotados em MAGs de conteúdo ruminal foram identificados como potenciais alvos de miRNAs bovinos. Múltiplos genes microbianos relacionados a traços de interesse comercial, como eficiência alimentar, qualidade da carne e emissão de metano, foram identificados como potenciais alvos de miRNAs do hospedeiro, fortalecendo a hipótese de que miRNAs podem agir como mediadores da regulação genética do hospedeiro sobre a microbiota do trato gastrointestinal em holobiontes. Os mecanismos que fundamentam a base molecular dessa regulação são objeto de estudo de trabalhos futuros.

10. Referências Bibliográficas

Ahmed W, Zheng K, Liu ZF. Small Non-Coding RNAs: New Insights in Modulation of Host Immune Response by Intracellular Bacterial Pathogens. *Front Immunol.* 2016;7:431. 2016 Oct 18. doi:10.3389/fimmu.2016.00431

Andrade BGN, Bressani FA, Cuadrat RRC, et al. Stool and Ruminant Microbiome Components Associated With Methane Emission and Feed Efficiency in Nelore Beef Cattle. *Front Genet.* 2022;13:812828. 2022 May 17. doi:10.3389/fgene.2022.812828

Bai Y, Li X, Chen Z, et al. Interference With *ACSL1* Gene in Bovine Adipocytes: Transcriptome Profiling of mRNA and lncRNA Related to Unsaturated Fatty Acid Synthesis. *Front Vet Sci.* 2021;8:788316. 2021 Dec 16. doi:10.3389/fvets.2021.788316

Beaudet V, Gervais R, Graulet B, et al. Effects of dietary nitrogen levels and carbohydrate sources on apparent ruminal synthesis of some B vitamins in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2016;99(4):2730-2739. doi:10.3168/jds.2015-10521

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):e85. doi:10.1371/journal.pbio.0030085

Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2009;7(4):147-154. doi:10.1016/S1672-0229(08)60044-3

Dalmasso G, Nguyen HT, Yan Y, et al. Microbiota modulate host gene expression via microRNAs. *PLoS One.* 2011;6(4):e19293. 2011 Apr 29. doi:10.1371/journal.pone.0019293

De Oliveira PSN, Coutinho LL, Tizioto PC, et al. An integrative transcriptome analysis indicates regulatory mRNA-miRNA networks for residual feed intake in Nelore cattle. *Sci Rep.* 2018;8(1):17072. 2018 Nov 20. doi:10.1038/s41598-018-35315-5

De Oliveira PSN, Coutinho LL, Cesar ASM, et al. Co-Expression Networks Reveal Potential Regulatory Roles of miRNAs in Fatty Acid Composition of Nelore Cattle. *Front Genet.*

2019;10:651. 2019 Jul 11. doi:10.3389/fgene.2019.00651

Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS One*. 2013;8(11):e79467. 2013 Nov 12. doi:10.1371/journal.pone.0079467

Ding J, Li X, Hu H. TarPmiR: a new approach for microRNA target site prediction. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2768-2775. doi:10.1093/bioinformatics/btw318

Do DN, Dudemaine PL, Fomenky BE, Ibeagha-Awemu EM. Integration of miRNA weighted gene co-expression network and miRNA-mRNA co-expression analyses reveals potential regulatory functions of miRNAs in calf rumen development. *Genomics*. 2019;111(4):849-859. doi:10.1016/j.ygeno.2018.05.009

Du X, Ley R, Buck AH. MicroRNAs and extracellular vesicles in the gut: new host modulators of the microbiome?. *MicroLife*. 2021;2:uqab010. 2021 Aug 10. doi:10.1093/femsml/uqab010

Du L, Chang T, An B, et al. Transcriptomics and Lipid Metabolomics Analysis of Subcutaneous, Visceral, and Abdominal Adipose Tissues of Beef Cattle. *Genes (Basel)*. 2022;14(1):37. 2022 Dec 22. doi:10.3390/genes14010037

Fang L, Hou Y, An J, et al. Genome-Wide Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Innate Immune and Defense Responses of Bovine Mammary Gland to *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:193. 2016 Dec 26. doi:10.3389/fcimb.2016.00193

Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. 2014;5:3611. 2014 Apr 29. doi:10.1038/ncomms4611

Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):21-37. doi:10.1038/s41580-018-0045-7

Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007;27(1):91-105.

doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017

Guo Y, Zhang X, Huang W, Miao X. Identification and characterization of differentially expressed miRNAs in subcutaneous adipose between Wagyu and Holstein cattle. *Sci Rep.* 2017;7:44026. 2017 Mar 8. doi:10.1038/srep44026

Guo H, Khan R, Abbas Raza SH, et al. RNA-Seq Reveals Function of Bta-miR-149-5p in the Regulation of Bovine Adipocyte Differentiation. *Animals (Basel).* 2021;11(5):1207. 2021 Apr 22. doi:10.3390/ani11051207

Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol Cell.* 2015;59(1):117-124. doi:10.1016/j.molcel.2015.04.027

Jacometo CB, Alharthi AS, Zhou Z, Luchini D, Loor JJ. Maternal supply of methionine during late pregnancy is associated with changes in immune function and abundance of microRNA and mRNA in Holstein calf polymorphonuclear leukocytes. *J Dairy Sci.* 2018;101(9):8146-8158. doi:10.3168/jds.2018-14428

Junjvlieke Z, Khan R, Mei C, et al. Effect of ELOVL6 on the lipid metabolism of bovine adipocytes. *Genomics.* 2020;112(3):2282-2290. doi:10.1016/j.ygeno.2019.12.024

Kamke J, Kittelmann S, Soni P, et al. Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a *Sharpea*-enriched microbiome characterised by lactic acid formation and utilisation. *Microbiome.* 2016;4(1):56. 2016 Oct 19. doi:10.1186/s40168-016-0201-2

Kong L, Xiong Z, Song X, Xia Y, Ai L. CRISPR/dCas9-based metabolic pathway engineering for the systematic optimization of exopolysaccharide biosynthesis in *Streptococcus thermophilus*. *J Dairy Sci.* 2022;105(8):6499-6512. doi:10.3168/jds.2021-21409

Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D155-D162. doi:10.1093/nar/gky1141

Latruffe N, Cherkaoui Malki M, Nicolas-Frances V, Clemencet MC, Jannin B, Berlot JP.

Regulation of the peroxisomal beta-oxidation-dependent pathway by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and kinases. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(8):1027-1032. doi:10.1016/s0006-2952(00)00416-0

Li Y, Jin D, Xie W, et al. PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(3):185-192. doi:10.2174/1574888X12666171012141908

Liang G, Malmuthuge N, McFadden TB, et al. Potential regulatory role of microRNAs in the development of bovine gastrointestinal tract during early life. *PLoS One.* 2014;9(3):e92592. 2014 Mar 28. doi:10.1371/journal.pone.0092592

Lima J, Auffret MD, Stewart RD, et al. Identification of Rumen Microbial Genes Involved in Pathways Linked to Appetite, Growth, and Feed Conversion Efficiency in Cattle. *Front Genet.* 2019;10:701. 2019 Aug 8. doi:10.3389/fgene.2019.00701

Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):321-333. doi:10.1038/nrc3932

Liu S, da Cunha AP, Rezende RM, et al. The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host Microbe.* 2016;19(1):32-43. doi:10.1016/j.chom.2015.12.005

Liu K, Zhang Y, Yu Z, et al. Ruminal microbiota-host interaction and its effect on nutrient metabolism. *Anim Nutr.* 2021;7(1):49-55. doi:10.1016/j.aninu.2020.12.001

Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab.* 2014;19(3):380-392. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.002

Lopes DRG, de Souza Duarte M, La Reau AJ, et al. Assessing the relationship between the rumen microbiota and feed efficiency in Nellore steers. *J Anim Sci Biotechnol.* 2021;12(1):79. 2021 Jul 15. doi:10.1186/s40104-021-00599-7

Malmuthuge N, Liang G, Guan LL. Regulation of rumen development in neonatal ruminants through microbial metagenomes and host transcriptomes. *Genome Biol.* 2019;20(1):172. 2019

Aug 23. doi:10.1186/s13059-019-1786-0

Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*. 2019;10(2):115-132. doi:10.1080/19490976.2018.1505176

Mudadu MA, Zerlotini A, Machado: Open source genomics data integration framework. *Gigascience*. 2020;9(9):giaa097. doi:10.1093/gigascience/giaa097

Munch EM, Harris RA, Mohammad M, et al. Transcriptome profiling of microRNA by Next-Gen deep sequencing reveals known and novel miRNA species in the lipid fraction of human breast milk. *PLoS One*. 2013;8(2):e50564. doi:10.1371/journal.pone.0050564

Naeem A, Zhong K, Moisés SJ, Drackley JK, Moyes KM, Looor JJ. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis*. *J Dairy Sci*. 2012;95(11):6397-6408. doi:10.3168/jds.2011-5173

Nakata K, Sugi Y, Narabayashi H, et al. Commensal microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through the small GTPase ARF4. *J Biol Chem*. 2017;292(37):15426-15433. doi:10.1074/jbc.M117.788596

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402. 2018 Aug 3. doi:10.3389/fendo.2018.00402

Ohto T, Uozumi N, Hirabayashi T, Shimizu T. Identification of novel cytosolic phospholipase A(2)s, murine cPLA(2){delta}, {epsilon}, and {zeta}, which form a gene cluster with cPLA(2){beta}. *J Biol Chem*. 2005;280(26):24576-24583. doi:10.1074/jbc.M413711200

Ojo OE, Kreuzer-Redmer S. MicroRNAs in Ruminants and Their Potential Role in Nutrition and Physiology. *Vet Sci*. 2023;10(1):57. 2023 Jan 14. doi:10.3390/vetsci10010057

Pacífico C, Ricci S, Sajovitz F, et al. Bovine rumen epithelial miRNA-mRNA dynamics reveals post-transcriptional regulation of gene expression upon transition to high-grain feeding and

phytogenic supplementation. *Genomics*. 2022;114(3):110333. doi:10.1016/j.ygeno.2022.110333

Peck BC, Mah AT, Pitman WA, Ding S, Lund PK, Sethupathy P. Functional Transcriptomics in Diverse Intestinal Epithelial Cell Types Reveals Robust MicroRNA Sensitivity in Intestinal Stem Cells to Microbial Status. *J Biol Chem*. 2017;292(7):2586-2600. doi:10.1074/jbc.M116.770099

Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46226-46232. doi:10.1074/jbc.M207776200

Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:295-329. doi:10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803

Santos AA, Afonso MB, Ramiro RS, et al. Host miRNA-21 promotes liver dysfunction by targeting small intestinal *Lactobacillus* in mice. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1-18. doi:10.1080/19490976.2020.1840766

Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One*. 2018;13(10):e0206239. 2018 Oct 18. doi:10.1371/journal.pone.0206239

Sun Y, Xue Z, Huang T, Che X, Wu G. Lipid metabolism in ferroptosis and ferroptosis-based cancer therapy. *Front Oncol*. 2022;12:941618. 2022 Aug 1. doi:10.3389/fonc.2022.941618

Tomari Y, Zamore PD. MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol*. 2005;15(2):R61-R64. doi:10.1016/j.cub.2004.12.057

Tzelos T, Ho W, Charmana VI, Lee S, Donadeu FX. MiRNAs in milk can be used towards early prediction of mammary gland inflammation in cattle. *Sci Rep*. 2022;12(1):5131. 2022 Mar 24. doi:10.1038/s41598-022-09214-9

Wang L, Zhang G, Li Y, Zhang Y. Effects of High Forage/Concentrate Diet on Volatile Fatty Acid

Production and the Microorganisms Involved in VFA Production in Cow Rumen. *Animals (Basel)*. 2020;10(2):223. 2020 Jan 30. doi:10.3390/ani10020223

Warren MJ, Raux E, Schubert HL, Escalante-Semerena JC. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B12). *Nat Prod Rep*. 2002;19(4):390-412. doi:10.1039/b108967f

Wood JD, Enser M, Fisher AV, et al. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci*. 2008;78(4):343-358. doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.019

Williams MR, Stedtfeld RD, Stedtfeld TM, et al. MicroRNA-based host response to toxicant exposure is influenced by the presence of gut microbial populations. *Sci Total Environ*. 2021;797:149130. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149130

Yang C, Zhang J, Wu T, et al. Multi-Omics Analysis to Examine Gene Expression and Metabolites From Multisite Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Front Genet*. 2021;12:627347. 2021 Feb 18. doi:10.3389/fgene.2021.627347

Zhang J, Zhang F, Didelot X, et al. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. *BMC Genomics*. 2009;10:478. 2009 Oct 16. doi:10.1186/1471-2164-10-478