

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

GILBERTO CHIANTELLI FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE SNPS EM SEQUÊNCIAS DE
microRNAs DE SUÍNOS E OS POSSÍVEIS EFEITOS NA
PREDIÇÃO DE TRANSCRITOS ALVO**

Araçatuba

2019

GILBERTO CHIANTELLI FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE SNPS EM SEQUÊNCIAS DE
microRNAs DE SUÍNOS E OS POSSÍVEIS EFEITOS NA
PREDIÇÃO DE TRANSCRITOS ALVO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Pesquisadora Flávia Lombardi Lopes

Araçatuba - SP

2019

F383i Ferreira, Gilberto Chiantelli
IDENTIFICAÇÃO DE SNPS EM SEQUÊNCIAS
DE microRNAs DE SUÍNOS E OS POSSÍVEIS
EFEITOS NA PREDIÇÃO DE TRANSCRITOS ALVO
/ Gilberto Chiantelli Ferreira. -- Araçatuba, 2019
27 p. : il., tabs. + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina
Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Flavia Lombardi Lopes

1. SNP. 2. microRNA. 3. Suínos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados
fornecidos pelo autor(a).

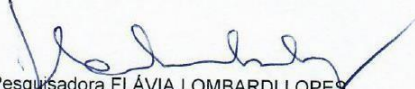
Essa ficha não pode ser modificada.

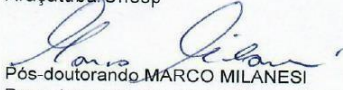
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

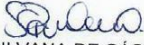
Título: IDENTIFICAÇÃO DE SNPs EM SEQUÊNCIAS DE microRNAs DE SUÍNOS E OS
POSSÍVEIS EFEITOS NA PREDIÇÃO DE TRANSCRITOS ALVO

AUTOR: GILBERTO CHIANTELLI FERREIRA
ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES
COORIENTADORA: KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Pós-doutorando MARCO MILANESI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Dra. SILVANA DE CÁSSIA PAULAN
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 27 de maio de 2019.

*Ao meu filho, **Bernardo**, pelo seu amor, carinho, e motivação que levou comigo
ao período de realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a realização deste trabalho a muitas pessoas que fazem parte da minha vida e que de certa forma me incentivam, me iluminam e me fazem acreditar num mundo melhor.

A toda minha família, por todos os esforços que tem me proporcionado.

A Pesquisadora Flavia Lombardi Lopes pela orientação, sempre disponível e disposta a ajudar e me mostrando os caminhos da ciência.

A todos aqueles a quem posso verdadeiramente chamar de amigos, pelas palavras de apoio constante.

A todos os colaboradores do laboratório que, mesmo em pequenos detalhes, fizeram grande diferença para o resultado final deste trabalho.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – FMVA /UNESP, pela estrutura e suporte.

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

“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram. ”

Charles Robert Darwin

FERREIRA, G.C. IDENTIFICAÇÃO DE SNPS EM SEQUÊNCIAS DE microRNAs DE SUÍNOS E OS POSSÍVEIS EFEITOS NA PREDIÇÃO DE TRANSCRITOS ALVO. 2019. 28 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificadores (20-22 nucleotídeos) que exercem uma função de controle pós-transcricional em RNA mensageiro (RNAm), regulando a produção de proteínas. Variações genéticas, como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), quando estão presentes em sequências de miRNA, podem alterar o controle pós-transcricional, baseado em similaridade aos seus respectivos alvos. Na produção de suínos, a identificação de fenótipos, como crescimento e características da carne, é vital. Nosso objetivo foi identificar SNPs em sequências genômicas que dão origem a miRNAs, bem como investigar, *in silico*, possíveis alterações na regulação de alvos que poderiam estar relacionados a fenótipos de produção em suínos. A montagem do assembly Sscrofa10.2 foi utilizada como genoma de referência para a localização dos SNPs e dos miRNAs descritos em suínos. Utilizando um script desenvolvido em Python, foi possível localizar 86 SNPs em sequências miRNAs maduros. Para a predição dos genes alvos, foram utilizadas sequências do 3'UTR de suínos com a adaptação do pacote Mirmap. Descobrimos que 55 das sequências de miRNA geraram mais de 28.570 genes alvos, indicando a criação de novos miRNAs interagindo com RNAm alvos. Nossos resultados indicam que SNPs afetam a predição de alvos para miRNAs em suínos.

Palavras-chave: SNP. miRNA. Suíno.

FERREIRA, G.C. **Identification of snps in sequences of pig microrna and possible effects on prediction of transcribed target.** 2019. 28 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

The microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs (20-22 nucleotides) that exert a post-transcriptional control function in messenger RNA (mRNA), regulating the production of proteins. Genetic variations, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs), when present in miRNA sequences, may change post-transcriptional control, based on similarity to their target genes. Pig production, identification of phenotypes, growth and meat characteristics is vital. Other in which SNPs in genetic sequences that give from miRNAs, as well as investigate, in silico, changes in the data of alleles, which are behavior on a phenotypes of production in swines. The assembly of the Sscrofa10.2 assembly was used as a reference reference for the location of SNPs and panel miRNAs in swine. Using a script deployed in Python, it was possible to locate 86 SNPs in mature miRNAs sequences. For a prediction of the target genes, the 3'UTR of pigs were completed with an adaptation of the Mirmap package. Discoveries that 55 of the miRNA sequences generated more than 28,570 target genes, pointing to a new creation of miRNAs interacting with mRNA targets. Cluster all SNPs for a target prediction for miRNAs in pigs.

Key words: SNP. miRNA. Swine.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 EPIGENÉTICA	11
1.2 SNP	11
1.3 MicroRNA	12
1.4 SUÍNO	13
OBJETIVO	13
REFERENCIAS	13
CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO.....	15
1. Resumo.....	15
2. Introdução	16
3. Material e Métodos	17
4. Resultados.....	18
5. Discussão.....	25
6. Conclusão	26
REFERENCIAS	26

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

1.1 EPIGENÉTICA

Células geneticamente idênticas são capazes de se distinguir fenotipicamente dependendo da sua localização e/ou função celular (LEVENSON; SWEATT, 2005). A epigenética é um processo que regula a expressão gênica sem afetar o código genético. Os mecanismos são: modificação das histonas, metilação do DNA, e ação dos RNAs não-codificadores, que, individualmente ou em associação, têm papel vital na expressão fenotípica. Estes processos regulam a expressão gênica através do controle da transcrição e/ou tradução (Revisado por MAZZIO; SOLIMAN, 2012).

1.2. SNP

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs, do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*) representam a forma mais abundante de variação genética em animais e plantas (RAMOS et al., 2009) (KILIAN; GRANER, 2012). São importantes marcadores que vinculam as regiões genômicas às mudanças fisiológicas normais, doenças, resposta a agentes patogênicos, produtos químicos, medicamentos, vacinas e outros agentes (KIM; MISRA, 2007).

As variações de nucleotídeos, ou SNPs, em regiões promotoras de genes codificadores de proteínas podem causar ganhos ou perdas de elementos de resposta e resultar em uma regulação diferencial da transcrição (JIANG et al., 2009).

Uma alteração funcional também é esperada para SNPs localizados em regiões codantes, que alterem aminoácidos na proteína final. No entanto, em torno de 93% de SNPs funcionais, ou seja, que estão relacionados com mudanças fenotípicas, estão localizados em regiões não-codificadoras em humanos (TAK; FARNHAM, 2015).

1.3. MicroRNA

MicroRNAs, uma categoria de RNA não-codificadores, são responsáveis por controlar epigeneticamente a produção de proteínas. Os miRNAs são moléculas pequenas de RNAs não-codificadores, com tamanho de 20 a 22 nucleotídeos e que regulam negativamente a tradução de proteínas

Descoberto inicialmente em um nematódeo, o *C.elegans* em 1993 (LEE, 1993) esses miRNAs têm papel na regulação de diversos processos celulares, tais como: resposta imune, desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular, controle de vias metabólicas, dentre outros (AVID P. BARTEL, 2004), (KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006), (DEIULIIS et al., 2016).

Os miRNAs são transcritos pela enzima RNA Polimerase II em um precursor primário chamado pri-miRNA. Como as sequências dos pri-miRNAs têm complementaridade com seus próprios nucleotídeos ele forma um *hairpin*, estrutura semelhante a um grampo de cabelo. Em seguida são processados, ainda no núcleo, pela enzima RNase III Drosha, originando o pré-miRNA, ou estrutura secundária do miRNA, podendo derivar de regiões intrônicas ou de RNAs longos não-codificadores (lncRNAs), durante o processamento pós-transcricional (Revisado por (GEBERT; MACRAE, 2019).

Após o transporte deste pré-miRNA para o citoplasma, outras enzimas como a Dicer, cliva-o em uma dupla fita do tamanho final do miRNA maduro de aproximadamente 20 nucleotídeos, em fita simples (revisado em Maudet et al., 2014). Este por sua vez se associa a proteínas como TRNC6 e Argonata, formando o chamado complexo RISC (do inglês - *RNA-induced silencing complex*) (He, L., & Hannon, G. J., 2004) para exercer a função de repressão de RNAm que contenha complementariedade de sequência com o miRNA, e também o processo de deadenilação que causa degradação destes RNAm alvos (EULALIO; HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2008), (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011).

Os miRNAs em seu estado maduro estão localizados em regiões de diversos tecidos dos suínos, desempenhando suas funções como

reguladores gênicos envolvidos nos valores de carcaça, processo de reprodução e desenvolvimento de alguns órgãos sólidos (SONG et al., 2018).

1.4. Suíno

Correspondendo a mais da metade do consumo mundial de carne, a suinocultura está em constante mudança, com base nas preferências e demandas do consumidor. A crescente demanda por maior qualidade alimentar dos produtos suínos provocou mudanças na indústria (REN et al., 2017). O melhoramento genético para a produção de porcos é um ponto crítico do qual dependem a produção de qualidade, o crescimento sustentável, e até mesmo a resistência a doenças (WANG; HUANG; ZHAO, 2017).

OBJETIVO

Mapear SNPs em sequências de microRNAs conhecidos em suínos, possibilitando a criação de uma base de dados de regiões de interesse para análises futuras de expressão de miRNAs e seus alvos, entre raças e/ou populações fenotipicamente distintas.

REFERÊNCIAS

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

DEIULIIS, J. A. et al. Visceral adipose MicroRNA 223 is upregulated in human and murine obesity and modulates the inflammatory phenotype of macrophages. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2016.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 21–37, 2019.

JIANG, Z. et al. Discovery of novel genetic networks associated with 19 economically important traits in beef cattle. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 528–542, 2009.

KILIAN, B.; GRANER, A. NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks. **Briefings in Functional Genomics**, v. 11, n. 1, p. 38–50, 2012.

KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 9, p. 289–320, 2007.

KLOOSTERMAN, W. P.; PLASTERK, R. H. A. The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. **Developmental Cell**, v. 11, n. 4, p. 441–450, 2006.

LEE, R. C. Lee Feinbaum Ambros the C Elegans Heterochronic Gene Lin4 Encodes Small Rnas With Antisense Complementarity To Lin14. v. 75, p. 843–854, 1993.

LEVENSON, J. M.; SWEATT, J. D. Epigenetic mechanisms in memory formation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 108–118, 2005.

MAZZIO, E. A.; SOLIMAN, K. F. A. Basic concepts of epigenetics impact of environmental signals on gene expression. **Epigenetics**, v. 7, n. 2, p. 119–130, 2012.

RAMOS, A. M. et al. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, 2009.

REN, Z. et al. Enhancement of porcine intramuscular fat content by overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase in skeletal muscle. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–7, 2017.

SONG, Z. et al. Expression and Regulation Profile of Mature MicroRNA in the Pig: Relevance to Xenotransplantation. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–9, 2018.

TAK, Y. G.; FARNHAM, P. J. Making sense of GWAS: Using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. **Epigenetics and Chromatin**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015.

WANG, Y. fang; HUANG, J. jiao; ZHAO, J. guo. Gene engineering in swine for agriculture. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 12, p. 2792–2804, 2017.

CAPITULO 2. IDENTIFICAÇÃO DE SNPS EM SEQUÊNCIAS DE microRNAs DE SUÍNOS E OS POSSÍVEIS EFEITOS NA PREDIÇÃO DE RNAm ALVO

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes (20- 22 nucleotídeos) que exercem uma função de controle pós-transcricional em RNA mensageiro (RNAm), regulando a produção de proteínas. Variações genéticas, como o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), quando estão presentes em sequências de miRNA, podem alterar o controle pós-transcricional, que baseia-se em similaridade aos seus respectivos alvos. Na produção de suínos, a identificação de elementos responsáveis por fenótipos, em especial marcadores genéticos para crescimento e características da carne, é vital. O objetivo do presente estudo foi identificar SNPs em sequências genômicas que dão origem a miRNAs, bem como investigar, *in silico*, possíveis alterações na regulação de alvos que poderiam estar relacionados a fenótipos de produção em suínos. A montagem Sscrofa10.2 foi utilizada como genoma de referência, possibilitando a localização dos SNPs e dos miRNAs descritos em suínos. Adaptamos em Python o pacote miRMap para a predição de alvos, usando sequências de suínos 3'UTR obtidas da base de dados UTRdb. Do total de alvos preditos para miRNAs contendo SNPs, 20% foram exclusivos para sequências de miRNAs maduros contendo a sequência alternativa de SNP, indicando a criação de novas interações entre miRNAs e RNAm alvos também 20% foram perdidos em consequência dos SNPs. Além disso, identificamos esses SNPs e miRNAs que se localizam em regiões de locus de características quantitativas (QTL). Nossos resultados indicam que os SNPs afetam a predição de alvos para miRNAs em suínos.

Palavras-chave: SNP, miRNA, suíno.

INTRODUÇÃO

Várias vias gênicas podem ser afetadas pela desregulação de microRNAs (miRNA) e podem se ligar a centenas de genes alvos na mesma ou em diferentes vias, apresentando um efeito profundo no controle da produção e proteínas (NAZAROV et al., 2013). Os miRNAs representam um caminho para diversidades fenotípica, através de variações no controle pós-transcricional da expressão gênica de RNAm-alvos (PENSO-DOLFIN et al., 2018).

Com relação à produção animal nas últimas décadas, a demanda crescente por proteína animal, aliada à necessidade de um melhor aproveitamento das áreas destinadas à criação, gerou a necessidade de se empregar ferramentas de melhoramento genético, visando à melhoria nas características desejáveis para a produção animal segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal em 2015.

Em suínos, os estudos genômicos se concentram principalmente no crescimento e nas características da carne desses animais, e mais de 16.000 loci de características quantitativas (QTLs) foram identificados no genoma do porco até o momento (JIANPING et al., 2018). Mais de 58 milhões SNPs estão atualmente disponíveis em banco de dados online de suínos, o dbSNP.

Uma alteração funcional é esperada para SNPs localizados em regiões codantes, que alterem aminoácidos na proteína final. No entanto, em torno de 93% de SNPs funcionais, ou seja, que estão relacionados com mudanças fenotípicas, estão localizados em regiões não-codificadoras de proteínas em humanos ((TAK; FARNHAM, 2015), (BOYLE; LI; PRITCHARD, 2017)).

SNPs em regiões codificadores de miRNAs, bem como em sítios-alvo dos miRNAs na região 3'-UTR de RNAs alvo, podem influenciar a ligação miRNA-RNA, uma vez que essa ligação baseia-se em complementariedade das sequências, interferindo assim na regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs (JIANPING et al., 2018)

Os SNPs em miRNAs (ou seus alvos) podem, portanto, afetar fenótipos, processos fisiológicos e patológicos, conforme demonstrado em humanos (revisado por MOSZYŃSKA et al., 2017). No entanto, o possível efeito de SNPs nesses controladores pós-transcricionais (miRNAs) é ainda desconhecido em suínos. Contudo, os possíveis efeitos dos SNPs no controle pós-transcricionais (miRNAs) ainda é desconhecido na espécie suína.

MATERIAL E MÉTODOS

Bases de dados

A sequência genômica Sscrofa10.2 (Swine Genome Sequencing Consortium) foi utilizada como genoma de referência para este estudo. Foram utilizados os dados de posicionamento de ~58 milhões de SNPs provenientes do banco dbSNP (Build 145: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Mapeamento de SNPs em sequências de miRNAs suínos

Foi utilizado um script na linguagem Python (versão 2.7) para mapear os SNPs que se localizam nas sequências de miRNAs de suínos disponíveis no miRBase database (<http://www.mirbase.org>).

Análise do potencial de ligação dos miRNAs

A identificação dos alvos para os miRNAs com as sequências referência e alterada foi realizada através de um script da biblioteca do Mirmap (<https://mirmap.ezlab.org/>), adaptado para adequação ao genoma suíno, usando sequências 3`UTR de suínos, obtidas da base de dados UTRdb (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/>).

Análise de Energia mínima livre

O programa RNAfold (HOFACKER, 2003) foi empregado para analisar a variação da frequência mínima de energia ($\Delta\Delta G$) e verificar a influência de SNPs sobre as estruturas secundárias dos miRNAs que alteraram transcritos alvos, observando a estabilidade da estrutura de hairpin, verificando a quantidade de energia usada para chegar ao estado de miRNA maduro.

Mapeamento de SNPs em regiões de QTL

O banco de dados QTLdb foi usado para coletar todos os dados de mapeamento dos loci de características quantitativas Qtl (Quantitative trait loci) disponíveis, para analisar a posição de SNPs dentro da sequência observando a variação fenotípica. Mostrando assim quais SNPs de regiões de miRNA, podem influenciar nos traços fenotípicos de suínos.

Montagem do conjunto de dados

Após o mapeamento dos SNPs, bem como da análise *in silico* de possíveis alterações no poder de ligação com seus alvos, realizamos a elaboração de um banco de dados que permite a associação desses SNPs às regiões de interesse relacionadas a produção em suínos.

RESULTADOS

Identificação de SNPs em sequências de miRNAs de suínos

Dos 58.640.368 SNPs descritos no genoma suíno (release 89, dbSNP), 366 estão localizados em sequências de miRNAs primários, e 84 estão em miRNAs maduros, (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Número de SNPs identificados em regiões de miRNA primário e maduro por cromossomo.

Chr	SNP	miRNA primário	SNP em miRNA primário	miRNA maduro	SNP em miRNA maduro
1	6125959	35	43	42	12
2	3981530	28	13	38	2
3	3491724	18	27	23	9
4	3484609	15	18	17	3
5	2781329	18	23	23	7
6	3633875	26	13	34	0
7	3462401	22	25	28	9
8	3596168	10	14	12	5
9	3818653	21	16	26	4
10	2545025	11	2	17	0
11	2409721	9	9	12	1
12	1716198	28	23	34	2
13	4639892	17	29	21	5
14	3610096	15	14	19	3
15	3437074	15	68	17	17
16	2302251	7	1	10	0
17	1896969	17	19	22	4
18	1706894	13	9	19	1
TOTAL	58640368	325	366	414	84

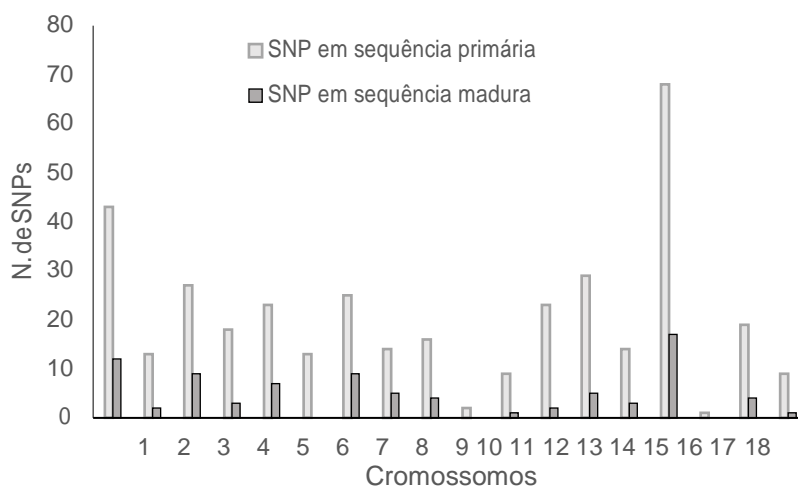


FIGURA 1. Número de SNPs por cromossomo identificados em miRNAs primários e maduros.

Efeito dos SNPs em regiões *seeds* na predição de alvos

A predição de genes alvos para os miRNAs maduros, com SNPs em regiões denominadas *seed*, ou seja na sequência conservada que está situada principalmente nas posições 2-7 da extremidade 5' do miRNA, utilizamos uma adaptação da biblioteca do pacote mirMap, feita em python 2.7, para a espécie suína. Aproximadamente 32.000 regiões 3'UTR na espécie foram obtidas na base UTRdb (<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/>) e utilizadas para essa predição. Dos alvos preditos, 26.770 não foram alterados pela presença do SNP no miRNA maduro, enquanto 448 e 1.352 alvos foram preditos exclusivamente nos miRNAs referência (genoma de referência) e alterado, respectivamente (Figura 2).

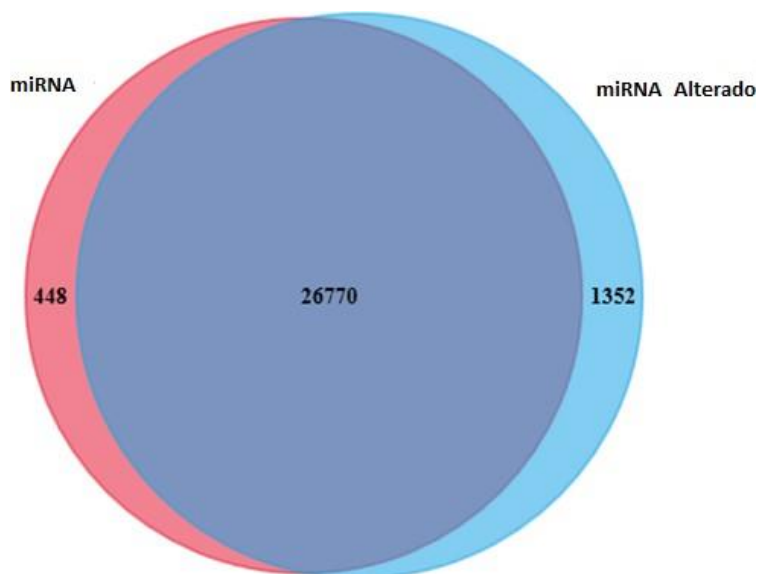


FIGURA 2. Diagrama de Venn dos alvos preditos para os miRNAs com a sequência referência e com a sequência alterada pelo SNP.

A Figura 3 ilustra os genes alvos preditos dos 27 miRNAs de referências e os que tiveram alteração pela presença do SNP. No total, 450.332 alvos potenciais foram preditos para miRNAs de referências e 460.266 para miRNAs alterados com SNPs. Como representado na Figura 3A, 102175 alvos foram criados com a presença de SNPs, e 92241 foram perdidos (Figura 3B). Ao analisar as relações entre os miRNAs que ganharam e os que perderam genes alvo, descobrimos que alguns miRNAs, como o ssc-miR-10384, com a presença do SNP rs346107827 e localizado no cromossomo 2, por exemplo, criou 6162 potenciais genes alvos novos. Notavelmente na Figura 3B, com relação ao número de alvos perdidos em relação ao miRNA referência, o ssc-miR-9793-5p, com a presença do SNP rs339140007 e localizado no cromossomo 1, foi o que perdeu mais alvos após a variação, no total de 5212 alvos.

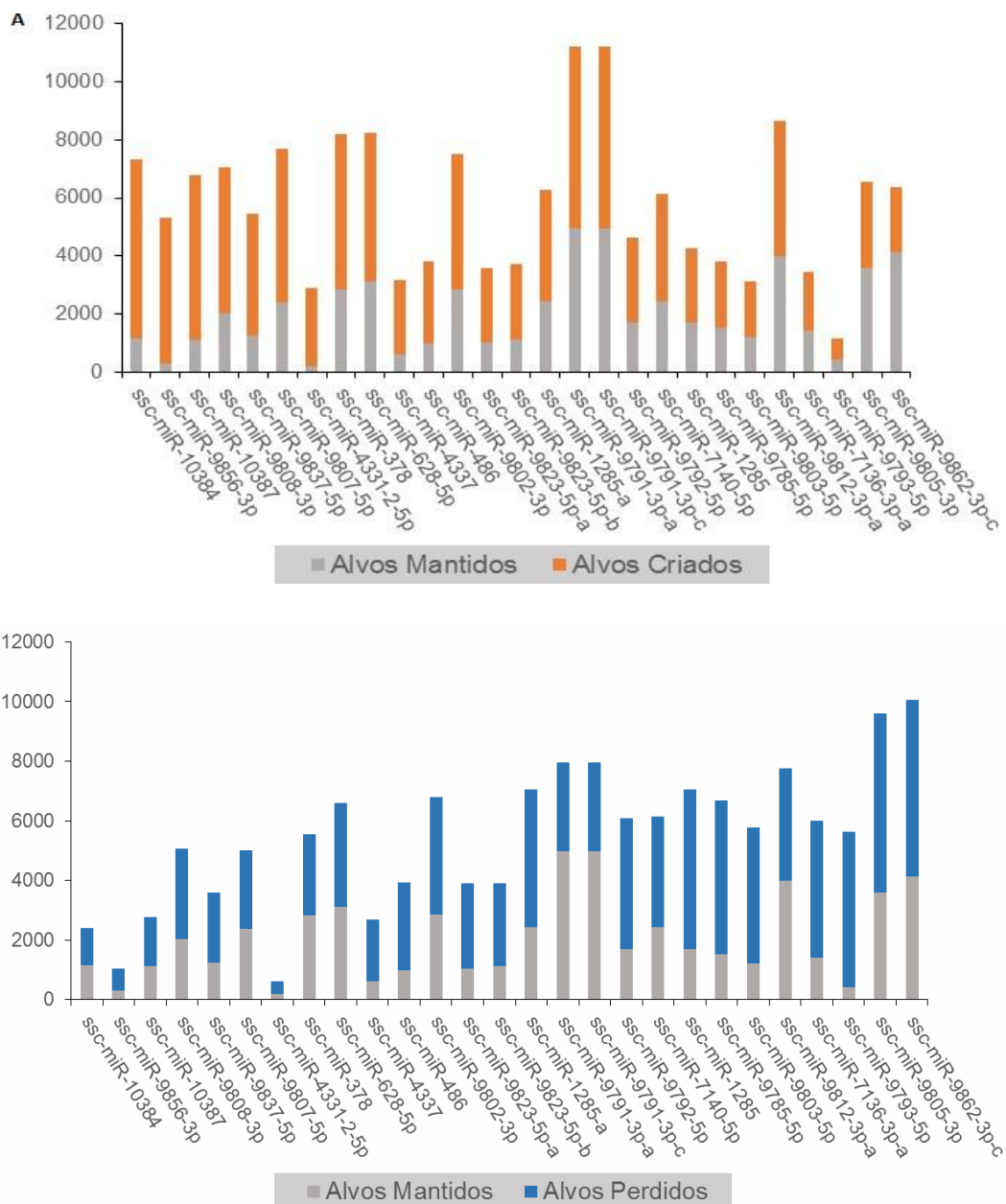


FIGURA 3. Número de alvos preditos ganhos (A) e perdidos (B) por miRNA afetado pela presença de SNP.

Efeitos de SNPs na estabilidade da estrutura de miRNAs

As estruturas secundárias dos miRNAs selecionados apresentaram frequências de energia mínima diferentes, com alteração no nível de energia, 63% dos miRNAs com alteração de SNPs apresentaram aumento em seus gastos de energia, 22,2% apresentaram diminuição no gasto de energia e 14,8% dos miRNAs não apresentaram variação de energia como consequência da presença do SNP (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência mínima de energia da estrutura secundária ($\Delta\Delta G$) de miRNAs naturais e alterados com SNP.

miRNA	ΔG miRNAs REFERÊNCIA	ΔG miRNAs AFETADOS	$\Delta\Delta G$
ssc-miR-10384	-46,90	-38,50	8,4
ssc-miR-9856-3p	-24,70	-20,80	3,9
ssc-miR-10387	-29,20	-30,40	-1,2
ssc-miR-9808-3p	-25,30	-23,10	2,2
ssc-miR-9837-5p	-21,60	-23,10	-1,5
ssc-miR-9807-5p	-21,20	-22,50	-1,3
ssc-miR-4331-5p	-37,80	-36,20	1,6
ssc-miR-378	-24,70	-24,70	0
ssc-miR-628-5p	-31,20	-29,70	1,5
ssc-miR-4337	-54,90	-52,70	2,2
ssc-miR-486	-40,20	-40,50	-0,3
ssc-miR-9802-3p	-22,10	-19,30	2,8
ssc-miR-9823-5p-a	-23,20	-19,10	4,1
ssc-miR-9823-5p-b	-23,20	-22,30	0,9
ssc-miR-1285-a	-21,40	-21,40	0
ssc-miR-9791-3p-a	-20,40	-20,40	0
ssc-miR-9791-3p-2-c	-29,30	-28,60	0,7
ssc-miR-9792-5p	-31,00	-29,00	2
ssc-miR-7140-5p	-37,40	-42,00	-4,6
ssc-miR-1285	-21,40	-21,40	0
ssc-miR-9785-5p	-33,20	-33,80	-0,6
ssc-miR-9803-5p	-29,30	-27,00	2,3
ssc-miR-9812-3p-a	-19,20	-17,40	1,8
ssc-miR-7136-3p-a	-26,00	-19,40	6,6
ssc-miR-9793-5p	-43,30	-42,40	0,9
ssc-miR-9805-3p	-34,60	-34,50	0,1
ssc-miR-9862-3p-c	-24,40	-24,10	0,3

No processo de alteração dos miRNAs de estrutura secundária para a produção de um miRNA maduro, os valores da energia seguem um padrão, que contém um valor médio de 1,21. Os miRNAs apresentaram uma distribuição normal da frequência de intervalos de classes pela presença de SNPs (Figura 4).

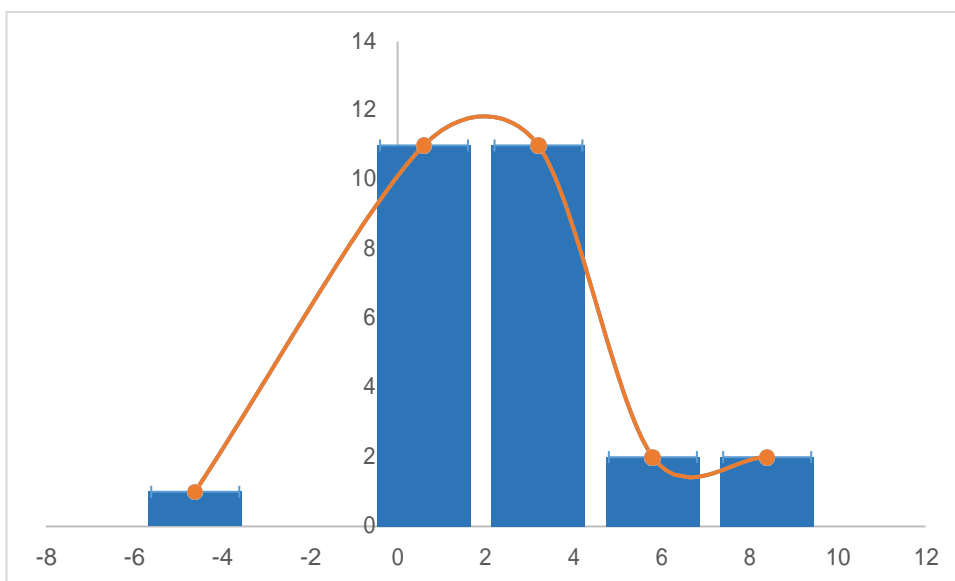


FIGURA 4. Distribuição da frequência de $\Delta\Delta G$ de estruturas secundárias de miRNAs naturais e alterados com SNP.

Localização de SNPs em regiões de QTL

Os SNPs identificados em regiões de QTL estão representados na tabela 3.

Tabela 3. Número de SNPs e de miRNAs em regiões de QTL

Traço de QTL	Nº de SNP	Nº de miRNAs	%
Oleic acid content	2	1	2,38
Muscle moisture percentage	8	5	9,52
Drip loss	4	2	4,76
Creatine kinase level	2	1	2,38
Polyunsaturated fatty acid content	3	1	3,57
Percentage giant fibers	1	1	1,19
Gadoleic acid content	2	1	2,38
Shear force	3	2	3,57
Loin muscle area	1	1	1,19
Average daily gain	2	2	2,38
Teat number	7	3	8,33
Shear force	2	1	2,38
Number of stillborn	1	1	1,19
Salmonella count in liver	4	2	4,76
Total number born alive	3	2	3,57
Meat color score	1	1	1,19
Shoulder subcutaneous fat thickness	1	1	1,19
Nonfunctional nipples	2	1	2,38
Litter size	1	1	1,19
backfat above muscle dorsi	3	2	3,57
Melanoma susceptibility	2	2	2,38
Actinobacillus pleuropneumoniae susceptibility	7	6	8,33
Linoleic acid content	1	1	1,19
pH 24 hr post mortem (ham)	17	6	20,24
Body weight (weaning)	4	3	4,76
TOTAL	84	50	100,00

DISCUSSÃO

Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) em microRNAs, ou em seus sítios de reconhecimento nos RNAs alvos, podem levar a defeitos graves nas funções dos miRNAs (HAN et al., 2013), uma vez que podem influenciar a ligação miRNA com seus alvos. Essa influência se dá através de alteração de complementaridade das sequências, interferindo assim na regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs. Um estudo anterior em animais de produção obteve SNPs em miRNAs e locais de ligação de RNA alvo com apenas 27,4 milhões de SNPs de vários animais de produção, entre eles o suíno (LI et al., 2015). Neste estudo, utilizamos uma base de dados atualizada com 58,7 milhões de SNPs em regiões de miRNAs, aumentando de forma significativa o banco, e trazendo, pela primeira vez, análises sobre as alterações preditas em alvos, força de ligação e possíveis regiões fenotípicas que poderiam ser influenciadas.

A localização desses miRNAs, que resultam em alteração de alvos, dentro de regiões previamente relacionadas com fenótipos, as regiões QTL, abrem portas para a busca de alvos específicos, que possam explicar funcionalmente parte das variações fenotípicas (RUIZ-NARVÁEZ, 2011).

A mudança de energia das estruturas secundárias dos 27 pré-miRNAs que criaram ou destruíram novos alvos transcritos, mostrou que 6 microRNAs analisados no presente estudo, podem ter gasto de energia diminuído com a presença de SNP. As mudanças na energia mínima relatadas podem afetar a formação de miRNAs maduros (SOMMER et al., 2009). Essas mudanças causadas pelos SNPs, encontram-se na média de 1,21 kcal/mol nos suínos, valor inferior a encontrada no genoma humano (2,1 kcal/mol) (GONG et al.,

2012).

Nosso banco de dados fornece uma ferramenta para a identificação de SNPs localizados em regiões de origem de miRNAs, e sua localização cromossômica, os genes alvos dos miRNAs de referência e alterados, e ainda, contribui para experimentos que visem entender a influência nas características fenotípicas.

CONCLUSÃO

Concluimos que SNPs podem afetar a predição de alvos dos miRNAs, podendo estar associados as diferenças nas características fenotípicas de suínos, especialmente as relacionadas à produção. Estas descobertas contribuirão com o enriquecimento das informações disponíveis no conjunto de dados de base genética e epigenética para estudos em melhoramento na produção de suínos.

REFERÊNCIAS

- BOYLE, E. A.; LI, Y. I.; PRITCHARD, J. K. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1177–1186, 2017.
- GONG, J. et al. Genome-wide identification of SNPs in MicroRNA genes and the SNP effects on MicroRNA target binding and biogenesis. **Human Mutation**, v. 33, n. 1, p. 254–263, 2012.
- HAN, J. et al. Identification of miRNAs and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.) by EST analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3793–3805, 2013.
- HOFACKER, I. L. Vienna RNA secondary structure server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3429–3431, 2003.

JIANPING, Q. et al. Genome-wide association study reveals genetic loci and candidate genes for average daily gain in Duroc pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 4, p. 480–488, 2018.

LI, A. et al. Genome-scale identification of miRNA-mRNA and miRNA-lncRNA interactions in domestic animals. **Animal Genetics**, v. 46, n. 6, p. 716–719, 2015.

MOSZYŃSKA, A. et al. SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. **Open Biology**, v. 7, n. 4, 2017.

NAZAROV, P. V. et al. Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: Linking dynamic expression changes to function. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 5, p. 2817–2831, 2013.

PENSO-DOLFIN, L. et al. The evolutionary dynamics of microRNAs in domestic mammals. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

RUIZ-NARVÁEZ, E. A. What is a functional locus? Understanding the genetic basis of complex phenotypic traits. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 5, p. 638–642, 2011.

SOMMER, S. S. et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. **Rna**, v. 15, n. 9, p. 1640–1651, 2009.

TAK, Y. G.; FARNHAM, P. J. Making sense of GWAS: Using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. **Epigenetics and Chromatin**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2015.