UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PÂMELA ALMEIDA ALEXANDRE

**Caracterização do perfil de expressão gênica hepática global
associada à eficiência alimentar em bovinos Nelore**

Pirassununga
2015

PÂMELA ALMEIDA ALEXANDRE

**Caracterização do perfil de expressão gênica hepática global
associada à eficiência alimentar em bovinos Nelore**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade de Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Joanir Pereira Eler

Pirassununga
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

A382c Alexandre, Pâmela Almeida
Caracterização do perfil de expressão gênica hepática global associada à eficiência alimentar em bovinos Nelore / Pâmela Almeida Alexandre. -- Pirassununga, 2015. 143 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Joanir Pereira Eler.

1. RNA-seq 2. Co-expressão 3. Consumo alimentar residual 4. Consumo e ganho residual 5. Inflamação 6. Fígado. I. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Heleni e Wanderlei, meus exemplos de dedicação, disposição, amor e honestidade com tudo que se propõe a fazer. Pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo e pela segurança que sempre me proporcionaram.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À **minha família** agradeço imensamente o apoio e me desculpo pela ausência nos fins de semana com meus pais e irmão, no crescimento dos meus primos e no convívio com meus tios e avós. Obrigada por mesmo de longe pensarem em mim e me apoiarem nesta caminhada.

Ao professor **Joanir** pela orientação. Ter por trás do meu trabalho um nome tão respeitado pelos vários anos de trabalho sério e dedicação sempre foi um grande conforto e inspiração.

Ao professor **Heidge** por me apresentar a vida acadêmica e estar sempre presente durante os últimos 5 anos de iniciação científica e mestrado. Uma ideia ruim nunca vai virar um bom trabalho, já as boas ideias são um presente que nos leva além... Obrigada por confiar a mim algumas de suas boas ideias.

Ao professor **José Bento**, meu guru desde muito antes de me decidir pela vida acadêmica, pelo apoio, pelos conselhos, por sempre tornar meus problemas mais fáceis de resolver e pela inestimável amizade.

À **Camila** e a **Yonara**, mais do que amigas, minhas irmãs de pós! Pelas inúmeras vezes que desviaram de seus caminhos pra me dar uma carona, fazer um favor ou me socorrer de um imprevisto, pelos conselhos e palavras de conforto, pela paciência nas longas conversas nos momentos de crise existencial, pelas tantas risadas e tantos bons momentos que nunca sairão da minha memória e pela companhia fundamental nesses anos de mestrado.

À todos que me ajudaram no confinamento, um grande desafio pessoal: **Ricardo, João, Dione** e Sr. **Cláudio**, funcionários sempre prestativos que me ensinaram e me ajudaram muito; professores **Saulo** e **Paulo Leme**, que ajudaram no planejamento e no desenvolvimento do experimento; alunos de estágio obrigatório **Ana, Juliana** e **César**, que levaram o confinamento junto comigo, suavizando o trabalho e tornando-o mais divertido - a ajuda de vocês foi fundamental; **Miguel**, que me orientou e me ensinou muito do pouco que eu sei sobre confinamento, além de ter realizado todas as análises de ultrassonografia de carcaça; **Marreco**, que com sua calma e amizade me ajudou em vários momentos; **Nilton, Cury** e **Atanásio**, que prontamente me ajudaram na coleta de amostras no abate; **Madeline**, que ajudou no abate e na

coleta de dados; **Henrique**, que fez as análises de carcaça e maciez de carne como parte de seu trabalho de conclusão de curso; aos estagiários **Bruna Macedo**, **Brunna Maia**, **Débora**, **Evelize**, **Felipe**, **Fernanda**, **Gabriella**, **Giovana**, **Giuliana**, **Guilherme Carlomanho**, **Guilherme Branco**, **Guilherme Bueno**, **Eduardo**, **Joyce**, **Lenadro**, **Lis**, **Lorena**, **Marcela**, **Maria Eduarda Demiciano**, **Maria Eduarda Groto**, **Maria Luisa**, **Melina**, **Pedro**, **Renan**, **Verônica**, **Viviane Lima** e principalmente **Gil** pelo carinho e amizade.

Aos **colegas do GMA** pelo apoio e companheirismo, em especial **Gerson** e **Francisco**, as pessoas com quem eu passo mais tempo, que me aguentam nos dias bons e nos de TPM, que ouvem minhas ideias e minhas reclamações, minhas companhias nesse caminho muitas vezes solitário de pós; obrigada pela ajuda e amizade. E à **Elisângela**, um anjo colocado no GMA para cuidar de todos e que por tantas vezes me socorreu durante o mestrado.

À **Mulan**, minha gêmea de coração, pela amizade e companheirismo. Tivemos a sorte de seguir caminhos muito parecidos ainda que separados e caminhar ao mesmo tempo por eles foi como te ter ao meu lado.

Ao professor **Flávio** por sempre ter aberto as portas de seu laboratório para que pudéssemos trabalhar e aos **colegas do LMMD** pela receptividade e ajuda sempre que precisei. Em especial a **Ana** pela amizade e companhia.

Aos colegas do LOCT **Arina**, **Pedro**, **Tati** e **Públio**. Que o grupo continue crescendo forte e unido. E a **Lídia** pelo envolvimento e pronta disponibilidade em ajudar nas análises histopatológicas.

Ao professor **Haja Kadarmideen** pela oportunidade de morar por 5 meses na Dinamarca e aprender algumas das mais recentes abordagens na análise de dados transcriptômicos. Aos colegas do *Group of Animal Breeding, Quantitative Genetics and Systems Biology* da Universidade de Copenhagen, **Sameer**, **Gianluca**, **Duy**, **Gilda**, **Thomas** e **Simona** por terem me recebido tão bem e sido grandes companhias. Agradeço em especial à **Lisette** pela disponibilidade e paciência de me ensinar. Foram os meses mais incríveis da minha vida e a realização de um sonho.

Aos colegas que apareceram pelo caminho para me ajudar: **Gisele**, **Priscila**, **Alana**, **Aline César** e **Dani Passarelli**.

Ao professor **Raul** pelas análises de líquido ruminal.

À **FAPESP** pela bolsa de mestrado e de estágio de pesquisa no exterior.

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos** da USP pela oportunidade de me formar Zootecnista e Mestre.

“Toda a biologia é um contraponto de dois temas: a admirável variedade em particularidades individuais e a admirável constância dos mecanismos fundamentais”

Bruce Alberts

RESUMO

ALEXANDRE, P. A. **Caracterização do perfil de expressão gênica hepática global associada à eficiência alimentar em bovinos Nelore.** 143 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

A seleção de bovinos de corte para eficiência alimentar (EA) é bastante vantajosa não só do ponto de vista produtivo e econômico como também por ajudar a diminuir o impacto ambiental da produção pecuária. Por ser uma característica multifatorial e de mensuração onerosa, objetivou-se com esse trabalho, a partir da expressão gênica global hepática de animais com alta eficiência alimentar (AEA) e baixa eficiência alimentar (BEA), identificar novos genes, funções biológicas e genes reguladores associados a esse fenótipo. Para isso, 98 bovinos Nelore foram avaliados quanto ao desempenho em confinamento, medidas de EA, ultrassonografia de carcaça, bioquímica sérica, biometria, rendimento de carcaça, maciez de carne e avaliação de líquido ruminal. Além disso, 8 animais de AEA e 8 animais de BEA, selecionados pela medida de consumo e ganho residual ao final do confinamento, tiveram dados de perfil transcriptômico hepático analisados por 3 abordagens: expressão gênica diferencial, co-expressão e co-expressão diferencial. Foi observado que os grupos de AEA e BEA apresentaram desempenho igual quanto ao peso inicial e final, ganho de peso, rendimento de carcaça e área de olho de lombo. Por outro lado, os animais de BEA tiveram maior consumo de alimentos e maior deposição de gordura subcutânea e visceral. Além disso, os animais de BEA apresentaram níveis elevados de colesterol e de GGT e a análise de perfil transcriptômico mostrou estar relacionada à resposta imunológica, inflamação e metabolismo de lipídeos. Baseado nesses resultados e em pesquisas em humanos criou-se a hipótese de que os animais de BEA são mais susceptíveis a infecção bacteriana no fígado em resposta à mudança da dieta a pasto para a dieta de confinamento.

Palavras-chave: RNA-seq, co-expressão, consumo alimentar residual, consumo e ganho residual, inflamação, fígado

ABSTRACT

ALEXANDRE, P. A. **Characterization of global hepatic gene expression profile associated with feed efficiency in Nelore cattle.** 143 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The selection of beef cattle to feed efficiency (FE) traits is very important not only from the productive and economic perspective but also for helping to reduce the environmental impact of livestock production. Being a multifactorial and expensive to measurement trait, the aim of this work was to analyze the liver global gene expression profile of animals with high feed efficiency (HFE) and low feed efficiency (LFE), to identify new genes, biological functions and regulatory genes associated to this phenotype. For this purpose, 98 Nelore cattle were evaluated regarding feedlot performance, FE measures, carcass ultrasound, serum biochemistry, biometric measures, carcass evaluation, meat tenderness and evaluation of ruminal fluid. In addition, 8 animals of HFE and 8 animals of LFE, selected by the measure of residual intake and body weight gain at the end of feeding trial, had liver transcriptomic profile data analyzed by three approaches: differential gene expression, co-expression and differential co-expression. It was observed that HFE and LFE groups showed equal performance for initial and final weight, weight gain, carcass yield and rib eye area. On the other hand, the animals of LFE had higher feed intake and increased deposition of subcutaneous and visceral fat. In addition, animals of LFE showed higher levels of cholesterol and GGT and transcriptomic profile analysis showed to be related to immune response, inflammation and lipid metabolism. Based on these results and research in humans we created the hypothesis that the LFE animals are more susceptible to bacterial infection in the liver in response to the change of pasture diet to feedlot diet.

Keywords: RNA-seq, co-expression, residual feed intake, residual intake and body weight gain, inflammation, liver

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferença esperada de progênie (DEP) média para requerimento de energia de manutenção de bovinos maduros na raça Red Angus por ano de nascimento (adaptado de Evans; Golden; Hough, 2002)	25
Figura 2 - Plano em duas dimensões do consumo alimentar predito baseado no peso vivo metabólico e no ganho de peso médio diário (GMD); os círculos representam animais comendo acima do esperado e são positivos para CAR (ineficientes) enquanto que triângulos representam animais comendo menos do que o esperado e são negativos para CAR (eficientes). Adaptado de Berry e Pryce (2014).....	26
Figura 3 - Destino e atividades dos nutrientes nas células. Os nutrientes podem agir diretamente como ligantes para receptores de fatores de transcrição (A); podem ser metabolizados por vias metabólicas primárias ou secundárias, alterando a concentração de substratos e intermediários envolvidos na regulação gênica ou na sinalização celular (B); ou alterando vias de transdução de sinal e sinalização (C). Adaptado de Kaput e Rodriguez (2004).	32
Figura 4 - Exemplo de rede com nódulos (círculos pretos) e arestas. As arestas podem ser direcionadas (setas pretas), indicando o sentido da interação, ou podem ser não direcionada (arestas vermelhas), indicando relação simétrica. (DE LA FUENTE, 2010)	44
Figura 5 - Confinamento de baias individuais.....	46
Figura 6 - Confinamento com portão do tipo <i>Calan Broadbent</i>	47
Figura 7 - Medição de largura de garupa com auxílio de hipômetro.	49
Figura 8 - Diagrama mostrando o ponto para a introdução da agulha de biópsia. No 11º espaço intercostal direito, aproximadamente 20 cm abaixo da linha do dorso, no cruzamento de duas linhas imaginárias: uma que vai da tuberosidade do íleo à escápula (A-B) e outra perpendicular ao 11º espaço intercostal (C-D).	53
Figura 9 - Agulha de biópsia sendo inserida para coleta de fígado.....	53
Figura 10 - Cronograma do período experimental e coletas de dados e amostras biológicas.....	54
Figura 11 - Resumo das três diferentes abordagens utilizadas na análise dos dados de expressão gênica.....	60

Figura 12 - Distribuição dos animais nos grupos de baixa eficiência alimentar (BEA), média eficiência alimentar (MEA) e alta eficiência alimentar (AEA) por pai.	62
Figura 13 - Distribuição dos animais nos grupos de baixa eficiência alimentar (BEA), média eficiência alimentar (MEA) e alta eficiência alimentar (AEA) filhos dos touros 9,10 e 16.....	63
Figura 14 - Gráfico da média de consumo de matéria seca proporcional ao peso (CMSp) por período de confinamento nos animais e alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). *p<0,05, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.....	67
Figura 15 - Média de conversão alimentar (CA) acumulada ao longo do período de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). *p<0,05, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.	68
Figura 16 - Nível de colesterol ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). *p<0,05, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.	71
Figura 17 - Nível de gama-glutamil transferase (GGT) ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). *p<0,05, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.	71
Figura 18 - Peso de gordura pélvica (A) e renal (B) proporcional ao peso final dos animais de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). *p<0,05, Teste t de Student (gordura pélvica) e Teste Mann-Whitney-Wilcoxon (gordura renal).....	72
Figura 19 - Nível de colesterol ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=8) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=8). *p<0,05, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.	74
Figura 20 - Nível de gama-glutamil transferase (GGT) ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). *p<0,05, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.	74
Figura 21 - Fotomicrografia de fígado de bovino. Infiltrado mononuclear periductal (seta). HE, 100X	75
Figura 22 - Fotomicrografia de fígado de bovino. Infiltrado mononuclear periductal (seta). HE, 400X	76

Figura 23 – Gráfico de dispersão das porcentagens de espaços-porta com infiltrado inflamatório mononuclear nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA) e baixa eficiência alimentar (BEA). Teste Mann-Whitney-Wilcoxon, $p=0,1$.	77
Figura 24 - Isoformas expressas do gene LDB3, em destaque a isoforma TCONS_00049442 expressa diferencialmente entre os grupos de alta e baixa EA.	80
Figura 25 - Dendograma de genes e cores dos módulos. O dendograma é resultado da clusterização hierárquica dos valores de sobreposição topológica entre os genes, os ramos são identificados para o corte em função da sua forma, definindo assim os módulos e atribuindo-lhes cores.	84
Figura 26 - Correlações entre módulo eigengene e medidas de consumo alimentar residual (CAR) e consumo e ganho residual (CGR). Em destaque, os módulos marrom e cinza que apresentam correlação $> 0,4$ com ambas as características.	85
Figura 27 - Módulo Marrom. Os nódulos representam os genes e os vértices o valor de correlação entre genes. Para facilitar a visualização, valores baixos de correlação não foram representados na figura. O valor de conectividade dentro do módulo é calculado pela soma das correlações entre um gene e todos os demais genes da rede.	94
Figura 28 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes do módulo <i>Marrom</i> . As figuras 26 e 27 mostram respectivamente as regiões A e B destacadas nessa figura.	95
Figura 29 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes do módulo <i>Marrom</i> (região A). Pode-se ressaltar o enriquecimento para tradução (<i>translation</i>).	96
Figura 30 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes do módulo <i>Marrom</i> (região B). Pode-se ressaltar o enriquecimento para regulação positiva da proliferação de células T ativadas (<i>positive regulation of activated T cell proliferation</i>) e regulação positiva de migração de células T (<i>positive regulation of T cell migration</i>).	97
Figura 31 - Módulo Cinza. Os nódulos representam os genes e os vértices o valor de correlação entre genes. Para facilitar a visualização, valores baixos de correlação não foram representados na figura.	100
Figura 32 - Expressão gênica (FPKM) dos genes reguladores nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, $n=8$) e baixa eficiência alimentar (BEA, $n=8$). * $p<0,05$, teste t de Student (dados paramétricos).	103

Figura 33 – Enriquecimento modular dos genes diferencialmente co-expressos entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar.....	104
Figura 34 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar. As figuras 31, 32 e 33 mostram respectivamente as regiões A, B e C destacadas nessa figura.	105
Figura 35 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar, região A. Pode-se destacar “resposta celular à moléculas de origem bacteriana”, “resposta inflamatória”, “resposta de imunidade inata” e “processamento de antígeno e apresentação de peptídeo via MHC de classe 1”.....	106
Figura 36 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar, região B. Pode-se destacar “regulação negativa do armazenamento de lipídeos”, “regulação positiva de processo metabólico de triglicerídeos” e “regulação positiva de processos do sistema imune”.....	107
Figura 37 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar, região C. Pode-se destacar “regulação da produção de citocinas” e “ativação de integrinas”.....	108
Figura 38 - Visão geral dos mecanismos de controle da CYP7A1 reportados na literatura (NORLIN; WIKVALL, 2007).	121
Figura 39 – Modelo esquemático dos resultados observados (azul) e hipóteses (vermelho).	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores associados com CAR em trabalhos de GWAS (continua).	37
Tabela 2 - Composição da dieta.....	47
Tabela 3 - Média dos piquetes coletivos (n=46) e das baias individuais (n=52) e valor significância da diferença entre as médias para as medidas coletadas no confinamento.....	64
Tabela 4 - Médias, desvios padrão, valores máximos e valores mínimos das medidas fenotípicas coletadas no confinamento (n=96).	64
Tabela 5 – Avaliação de correlação entre características de consumo, ganho de peso e medidas de eficiência alimentar (n=96).	65
Tabela 6 - Correlação entre características de peso inicial, final e médio; consumo de matéria seca, ganho de peso e medidas de eficiência alimentar com medidas de ultrassonografia de carcaça e biometria (n=96).	66
Tabela 7 - Média dos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) para as medidas de peso vivo inicial e final, ingestão de matéria seca, ganho de peso e medidas de eficiência alimentar; e valor de significância da diferença entre as médias dos grupos...	67
Tabela 8 - Média dos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) e valor de significância da diferença da média dos grupos para medidas de ultrassonografia de carcaça.	69
Tabela 9 - Média de parâmetros séricos nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) nos dias 0 e 70 de confinamento; e valor de significância da diferença entre as médias.....	70
Tabela 10 – Média de contagem de protozoários nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) e valor de significância da diferença entre a média dos grupos.....	73
Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre os grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=8) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=8) (continua).	78
Tabela 12 - Anotação dos novos transcritos (continua).	81
Tabela 13 - Genes contidos no módulo <i>Marrom</i> (continua).	87

Tabela 14 - Genes contidos no módulo <i>Cinza</i> (continua).....	98
Tabela 15 - Genes candidatos como centrais no metabolismo hepático associado à eficiência alimentar.....	101
Tabela 16 - Genes diferencialmente co-expressos e diferencialmente expressos.....	109

LISTA DE SIGLAS

AEA	Alta eficiência alimentar
AG	Altura de garupa
ALT	Alanina transaminase
ANOVA	Análise de variância
AOL	Área de olho de lombro
AST	Asparato transaminase
BEA	Baixa eficiência alimentar
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CA	Conversão alimentar
CAR	Conversão alimentar residual
CG	Comprimento de garupa
CGR	Consumo e ganho Residual
CMS	Consumo de matéria seca
CMSp	Consumo de matéria seca proporcional ao peso
CNA	<i>Copy number variation</i>
DE	Diferencialmente expresso
DEP	Diferença esperada de progênie
DP	Desvio padrão
EA	Eficiência alimentar
ED	Expressão gênica diferencial
EGP	Espessura de gordura na picanha
EGS	Espessura de gordura subcutânea
FA	Fosfatase alcalina
FAO	<i>Food and agriculture organization</i>
FM	Filiação ao módulo
FPKM	<i>Fragments per kilobases per million reads</i>
GGT	Gama-glutamil transferase
GMD	Ganho de peso médio diário
GO	Gene ontology
GPR	Ganho de peso residual
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>

INDEL	Inserção/deleção
K	Conectividade
LG	Largura de garupa
MEA	Média eficiência alimentar
PC	Profundidade de costela
PVF	Peso vivo final
PVI	Peso vivo inicial
PVM	Peso vivo metabólico
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
SG	Significância do gene
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TOM	<i>Topological overlap measure</i>
US	Ultrassonografia
WBSF	Força de cisalhamento de warner
WGCNA	<i>Weighted correlation network analysis</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Novos desafios da pecuária.....	22
2.2. Eficiência alimentar	24
2.3. Bases biológicas para variação da eficiência alimentar	27
2.4. Genômica nutricional	29
2.5. Características e funções do fígado, órgão central do metabolismo	32
2.6. Estudos genômicos da eficiência alimentar	35
2.7. Análise de transcriptoma	39
2.8. Genética de sistemas e redes de genes	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. Confinamento experimental - consumo alimentar e ganho de peso.....	46
3.2. Medidas de eficiência alimentar	47
3.3. Avaliação de carcaça por ultrassonografia	48
3.4. Análise sérica de colesterol, triglicérides, globulinas, AST, ALT, GGT, FA, albumina e proteína.....	48
3.5. Biometria	49
3.6. EPMURAS	49
3.7. Dados fenotípicos de abate e desossa	50
3.8. Maciez de carne.....	50
3.9. Coleta de líquido ruminal	51
3.10. Avaliação histopatológica	51
3.11. Coleta de amostras biológicas e extração de RNA.....	52
3.12. Preparação e sequenciamento de bibliotecas de RNA.....	54
3.13. Alinhamento de <i>reads</i> e análise de expressão gênica diferencial.	55
3.14. Anotação de novos transcritos diferencialmente expressos.....	55
3.15. Análise de enriquecimento funcional.....	56
3.16. Análise de redes de co-expressão gênica	57
3.17. Detecção de genes reguladores	58
3.18. Análise de co-expressão diferencial	59

3.19. Análise estatística	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1. Caracterização da eficiência alimentar	62
4.1.1. PATERNIDADE DOS ANIMAIS.....	62
4.1.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM CONFINAMENTO E CARACTERÍSTICAS DE CARÇA.....	63
4.2. Caracterização dos grupos de alta e baixa eficiência alimentar	66
4.3. Ultrassonografia de carça	68
4.4. EPMURAS	69
4.5. Parâmetros séricos.....	69
4.6. Características avaliadas no abate e desossa	72
4.8. Caracterização dos animais de alta e baixa eficiência alimentar selecionados para análise de perfil transcriptômico.....	73
4.9. Avaliação histopatológica	75
4.10. Expressão gênica diferencial.....	77
4.11. Co-expressão e genes reguladores.....	84
4.12. Genes reguladores.....	102
4.13. Co-expressão diferencial	103
5. DISCUSSÃO	110
6. CONCLUSÃO	130
REFERÊNCIAS.....	131

1. INTRODUÇÃO

O atual desafio de atender a demanda por alimento para suprir a crescente população mundial e ao mesmo tempo diminuir o impacto ambiental da pecuária gera novos objetivos de seleção animal, como por exemplo, a identificação de indivíduos que aproveitem melhor alimentos de baixa qualidade que não são utilizados na alimentação humana ou indivíduos que produzam menos dejetos e metano por quilograma de carne produzido, consequentemente gerando menos gases do efeito estufa. Uma maneira de conseguir isso é identificando animais superiores quanto à eficiência alimentar (EA), ou seja, que produzam mais consumindo menos. Além de poluírem menos e serem mais produtivos, convertendo melhor o alimento em carne, esses animais também elevam a lucratividade do sistema, já que as despesas com alimentação são a maior porcentagem do custo de produção.

Existem várias medidas de eficiência alimentar, sendo a mais utilizada o chamado consumo alimentar residual (CAR), que é calculado pela diferença entre o consumo alimentar observado e o consumo alimentar previsto baseado no peso vivo médio e na velocidade de ganho de peso. Porém, por essa medida não apresentar correlação com a velocidade de ganho de peso, ela pode acabar selecionando animais com crescimento lento. Dessa forma, uma medida chamada consumo e ganho residual (CGR) foi recentemente proposta para apresentar correlação mais favorável tanto com o consumo alimentar quanto com o ganho de peso.

Apesar de se mostrar importante, a seleção para EA é demorada, onerosa e complicada do ponto de vista molecular, já que é uma característica complexa e se espera que seja regulada por não apenas um, mas vários mecanismos biológicos diferentes, relacionados principalmente com ingestão, digestão, metabolismo, atividade e termorregulação. Para lidar com essa questão, o enorme avanço nas tecnologias “ômicas” observado nas últimas décadas, como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica trouxe ferramentas e abordagens inovadoras, que visam elucidar a complexa relação entre genótipo e fenótipo, bem como a interação entre genótipo e ambiente. Nesse contexto, surgiu a genômica nutricional que tem como objetivo tanto determinar as variações genéticas dentro de uma mesma

população que levam os indivíduos a diferirem em sua resposta à dieta, quanto os mecanismos pelos quais os sinais dietéticos influenciam a expressão gênica, proteica e em última instância, a produção de metabólitos. Apesar de ser ainda bastante recente, a genômica nutricional pode ter várias aplicações na área animal como a formulação de dietas personalizadas em função de raça, linhagem ou grupos específicos de animais para aumento de produção ou mesmo prevenção/tratamento de doenças; seleção de animais com desempenho superior ingerindo alimentos específicos disponíveis em uma região; e aumento de precisão de medidas de biodisponibilidade.

Diversos trabalhos utilizaram abordagens diferentes para localizar regiões relacionadas à EA no genoma bovino, porém, populações diferentes de animais apresentam diferentes processos biológicos como sendo principais para essa característica, além de apresentarem características específicas no genoma, como o padrão de desequilíbrio de ligação, que dificultam a validação e utilização dos resultados de uma população em outra. Por isso atualmente, vem se discutindo a seleção genômica funcional, na qual variantes causais ou genes reguladores centrais são identificados, com a intenção de chegar a resultados que podem ser usados entre populações e até entre raças diferentes. Uma metodologia bastante utilizada para se conseguir isso é o estudo da expressão gênica diferencial (ED) entre grupos de animais com fenótipos divergentes. A ED pode gerar resultados importantes, todavia, também tem suas limitações, por exemplo, por não identificar genes que apesar de não mudarem sua expressão entre duas condições, apresentam variações estruturais que alteram a proteína gerada ou por não considerar o efeito da mudança de expressão de um gene sobre os outros genes.

A genética de sistemas é uma ciência que tem como propósito estudar as complexas e dinâmicas interações entre genes, proteínas, metabólitos, células e tecidos através de redes de correlação. Quando aplicada a transcriptômica, podem-se determinar conjuntos de genes altamente conectados e com padrão de expressão coordenado, levando ao descobrimento de mecanismos biológicos associados à característica fenotípica estudada. Até o momento da conclusão desse trabalho, não foram localizados na literatura trabalhos utilizando essa abordagem para estudar EA em bovinos.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a eficiência alimentar em bovinos Nelore através de medidas de desempenho em confinamento, bioquímica sérica, características de carcaça, avaliação de líquido ruminal e expressão gênica global hepática a fim de identificar funções biológicas, novos genes e genes reguladores associados a esse fenótipo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Novos desafios da pecuária

A seleção animal tem sido feita para atender às necessidades da população humana desde a domesticação das primeiras espécies, sendo que essas necessidades vêm se modificando ao longo do tempo e atualmente, enfrentam-se novos desafios na produção pecuária. Entre os atuais objetivos de seleção podem-se destacar a identificação de animais superiores para características complexas e de mensuração onerosa, a redução da intensidade de emissão de poluentes como o gás metano para diminuir o impacto ambiental da pecuária, a adaptação ao aumento de temperatura e umidade causado pelo aquecimento global, e a melhora do desempenho dos animais com menor consumo de nutrientes para diminuir a competição com a alimentação humana (HAYES; LEWIN; GODDARD, 2013).

A constante preocupação com a melhora da produtividade para aumentar a disponibilidade de energia e proteína para nossa alimentação se deve às estimativas de crescente aumento populacional. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas (ONU, 2011), a população mundial, hoje estimada em pouco mais de 7 bilhões, chegará a metade do século atingindo cerca de 9,1 bilhões de pessoas. Esse crescimento está previsto para acontecer principalmente em países em desenvolvimento, onde os habitantes cada vez mais deixam o trabalho no campo e migram para as grandes cidades, melhorando o padrão de vida e consumindo mais. Para atender a essa demanda, a FAO (*Food and Agriculture Organization*) calcula que a produção de alimentos deverá crescer 70%, aumentando o requerimento por carne de 200 milhões para 470 milhões de toneladas ao ano. Este fato confere a pecuária mundial um grande desafio em termos de produtividade, já que a dificuldade de incorporação de novas áreas pela agropecuária e as crescentes preocupações relacionadas ao meio ambiente, principalmente ao aquecimento global, geram a necessidade de produzir mais consumindo menos recursos ambientais (CHIZZOTTI; LADEIRA; NETO, 2012).

A produção de gases do efeito estufa vindos da produção pecuária é responsável por 14,5% do total emitido por atividades humanas (7,1 giga

toneladas de equivalente de CO₂ por ano) e a maior contribuição é da produção de gado de corte, representando 65% das emissões do setor (GERBER et al., 2013). Esses gases têm como fonte principal o cultivo e processamento de grãos e a fermentação entérica de ruminantes (45% e 39%, respectivamente), assim como estoque e processamento de esterco (10%). Na América Latina e Caribe, estima-se que um terço das emissões da produção de carne estão relacionadas à expansão de pasto para áreas de floresta (GERBER et al., 2013). Dentre as estratégias propostas pela FAO para mitigar as emissões de metano estão a manipulação da dieta e uso de aditivos, porém, sugere-se que a efetividade desses métodos pode ser substancialmente aumentada pela melhora da eficiência alimentar e produtividade animal.

O Brasil encontra-se no centro desta discussão acerca do aumento de produtividade com redução do impacto ambiental da produção de carne, pois ocupa um papel de destaque na produção pecuária mundial. Segundo a ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne) é o segundo maior produtor e maior exportador de carne, responsável por pouco mais de 20% do total de carne bovina comercializada mundialmente. Além disso, possui o maior rebanho comercial bovino do mundo estimado em 209 milhões de cabeças, sendo 80% de *Bos indicus* e destes, 90% da raça Nelore (ABIEC, 2014). A raça Nelore apresenta características produtivas e adaptativas muito interessantes, que vão ao encontro de algumas das principais necessidades atuais do sistema brasileiro de pecuária. São animais resistentes ao calor por possuir maior número de glândulas sudoríparas e grande superfície corporal; são mais resistentes a insetos sugadores e parasitas devido à pele escura, fina e resistente, às características dos pelos e a produção natural de secreção oleosa repelente (ACNB, 2014). Além disso, têm uma grande capacidade de transformar alimentos de baixa qualidade em carne e leite e, por apresentarem trato digestivo 10% menor em relação ao *Bos taurus*, possuem metabolismo mais baixo o que leva à menor perda por produção de calor (ACNB, 2014).

Considerando o exposto nos parágrafos acima, uma alternativa para aumentar a produtividade e lucratividade da produção de bovinos de corte e ao mesmo tempo diminuir seu impacto ambiental é selecionar animais para eficiência alimentar. A eficiência alimentar é a capacidade do animal de transformar o alimento ingerido em produto, no caso de gado de corte em

carne. Cerca de 8 a 14% da energia digestível ingerida por bovinos é eliminada via gás metano (HERD; ARTHUR, 2009) e a diferença de emissão entre animais de alta e baixa eficiência é de 28% (NKRUMAH et al., 2006). Além disso, animais mais eficientes produzem menos esterco o que diminui a formação de gases resultante de sua degradação. Portanto, medidas de eficiência alimentar podem identificar animais que produzem mais carne por quilograma de alimento ingerido e geram menos esterco e metano por quilograma de carne produzido.

2.2. Eficiência alimentar

Em décadas passadas, a seleção de bovinos para ganho de peso médio diário (GMD) fez com que o tamanho desses animais aumentasse ao longo dos anos. Esses animais maiores, tem maior exigência de manutenção e consomem mais alimento, elevando os custos da produção (Figura 1). Em revisão, Ferrell e Jenkins (1985) sugerem que 70 a 75% do requerimento de energia de bovinos é utilizado para funções de manutenção e que variações na energia de manutenção entre os animais parecem ser maiores do que as variações nos requerimentos para crescimento, gestação ou lactação. Os autores sugerem ainda que, em geral, variações em exigências nutricionais de manutenção estão positivamente relacionadas com o potencial genético de medidas de produção como taxa de crescimento e produção leiteira. Essa variabilidade nos requerimentos de energia dos animais significa um potencial para seleção de animais que necessitam de menos energia de manutenção e podem deslocar mais energia para a produção.

Figura 1 - Diferença esperada de progênie (DEP) média para requerimento de energia de manutenção de bovinos maduros na raça Red Angus por ano de nascimento (adaptado de Evans; Golden; Hough, 2002)

A seleção somente para características relacionadas ao objetivo final da produção como ganho de peso, fertilidade ou características de carcaça não é eficiente uma vez que a lucratividade é uma função de ambas as saídas (produção) e entradas (custos) do sistema, o que leva a uma melhor noção de eficiência produtiva (ARCHER et al., 1999). Considerando que as despesas com alimentação ocupam a maior porcentagem dos gastos da produção (ARTHUR; ARCHER; HERD, 2004), a partir de 1950 diversas medidas e definições de eficiência alimentar surgiram na tentativa de encontrar uma relação entre consumo alimentar e ganho de peso (MARKUS et al., 2014). As duas medidas mais utilizadas foram a conversão alimentar (CA), que é calculada pela divisão entre o consumo de matéria seca (CMS) e o GMD, e o oposto desta medida, a eficiência alimentar bruta (GMD/CMS). Porém, trabalhos demonstram que animais com melhores taxas de CA apresentam alto potencial genético para taxa de crescimento, mas também para peso adulto, levando a um maior gasto com energia de manutenção, o que significa que a CA pode não estar necessariamente ligada à melhora da eficiência de utilização do alimento (CREWS JR, 2005).

Uma medida de EA bastante aceita por não ter correlação com ganho de peso e apresentar valores moderados de herdabilidade (ARCHER et al., 1999) é o consumo alimentar residual (CAR), inicialmente proposto por Koch et al.

(1963) e calculado pela diferença entre o consumo alimentar observado e o consumo alimentar predito com base no peso vivo médio metabólico do animal (PVM) e GMD em um determinado período (Figura 2). A ideia do cálculo do CAR é particionar o consumo em porções requeridas nos diferentes estágios e níveis de produção, e uma porção residual relacionada à verdadeira eficiência metabólica (CREWS JR, 2005). Nesse caso, o PVM representa os requerimentos para manutenção e o GMD representa a produção. Por definição, o CAR é fenotipicamente independente das características de produção utilizadas para calcular o consumo alimentar predito, o que permite comparações entre animais com diferentes níveis de produção durante o período de teste. Porém, o fato do CAR não apresentar correlação com GMD, pode levar a seleção de animais eficientes, mas que ganham peso lentamente.

Figura 2 - Plano em duas dimensões do consumo alimentar predito baseado no peso vivo metabólico e no ganho de peso médio diário (GMD); os círculos representam animais comendo acima do esperado e são positivos para CAR (ineficientes) enquanto que triângulos representam animais comendo menos do que o esperado e são negativos para CAR (eficientes). Adaptado de Berry e Pryce (2014).

Considerando este percalço, uma medida proposta por Berry e Crowley (2012), o consumo e ganho residual (CGR), combina o CAR e ganho de peso residual (GPR - diferença entre a taxa de crescimento observada e a taxa de crescimento predita baseada no peso vivo metabólico e consumo) para gerar uma medida que apresenta correlação mais favorável tanto com consumo quanto com ganho de peso. Nesse trabalho, os autores demonstram que animais ranqueados por CGR comem menos para atingir a quantidade de peso

desejada em comparação com animais ranqueados tanto por CAR quanto por GPR. Há ainda pouca informação na literatura sobre CGR, provavelmente porque é uma medida recentemente proposta. Santana et al. (2012), trabalhando com bovinos Nelore, encontraram alta correlação genética de CMS com CAR (0,95) e CGR (-0,87) e baixa correlação genética de ambas as características com GMD (0,11 e 0,20; respectivamente) e características de carcaça como espessura de gordura subcutânea (0,02 e -0,03), espessura de gordura na picanha (0,17 e 0,03) e área de olho de lombo (0,02 somente no caso do CGR), o que sugerem que o CAR e CGR podem ser usados para selecionar animais com menor consumo de ração, sem comprometer o seu desempenho. Além disso, o CGR apresentou maior herdabilidade do que o CAR, o que significa que o primeiro pode responder melhor a seleção animal e, portanto, pode ser uma medida mais interessante de EA. Retallick, Faulkner, Rodriguez-Zas (2013) mostraram que uma melhoria de 10% no CGR poderia gerar lucro de \$ 21,66 / boi enquanto CAR apenas \$ 11,47 / boi.

Apesar de sua relevância, a seleção para eficiência alimentar em bovinos de corte é um desafio em programas de melhoramento, uma vez que é necessário medir o consumo alimentar e ganho de peso de cada animal durante um período não inferior a 70 dias (ARCHER et al., 1997). Além disso, a EA é uma característica complexa, portanto não se espera que uma única via metabólica seja responsável pela variação fenotípica, mas um conjunto de processos biológicos diferentes.

2.3. Bases biológicas para variação da eficiência alimentar

Embora a base biológica para a variação individual da EA ainda não tenha sido completamente elucidada, é de senso comum que a regulação fisiológica dessa característica está sob o controle de centenas de genes e, pelo menos, cinco processos principais foram identificados: ingestão, digestão, metabolismo, atividade e termorregulação (HERD; ODDY; RICHARDSON, 2004). Nessa revisão, Richardson et al. (2004) identificaram diversos mecanismos fisiológicos que poderiam explicar a variação na EA sendo a maior contribuição atribuída ao *turnover* de proteínas, metabolismo tecidual e estresse, respondendo por 37% da variação. Outras contribuições importantes

são a composição corporal, atividade, digestibilidade, padrão de alimentação e incremento calórico da fermentação. Em outra revisão, o *turnover* de proteína, bombeamento de íons e vazamento de prótons aparecem contribuindo com 67% da variação da EA (HERD; ODDY; RICHARDSON, 2004). Em ambos os trabalhos, os autores revisam as evidências que demonstram a contribuição desses mecanismos para a EA:

- Ingestão – O aumento do consumo leva também a um aumento da energia gasta para digerir o alimento, em parte, por causa do aumento os órgãos do trato digestivo e aumento da energia gasta para manutenção dos próprios tecidos. Outros determinantes para o custo energético da alimentação parecem ser a taxa de ingestão e duração das refeições.
- Digestão – Conforme o nível de ingestão relativo à manutenção aumenta a digestão dos alimentos tende a diminuir. Apesar disso, a dificuldade de precisar pequenas diferenças na digestibilidade sugere cautela ao considerar esse fator como um dos principais para explicar diferenças na EA. Diferenças no suprimento de aminoácidos devido a variações na eficiência de produção de proteína microbiana no rúmen também podem contribuir para a variação da EA.
- Composição corporal e metabolismo – O custo energético para depositar a mesma quantidade de tecido magro (proteína) e gordura é bastante diferente. Existe maior variação na eficiência de depósito de tecido magro devido ao *turnover* proteico, com grande variação inclusive entre diferentes órgãos. Além disso, já fora demonstrado que o consumo de oxigênio por órgãos do trato gastrointestinal está correlacionado com a ingestão de alimentos em bovinos de corte (HUNTINGTON et al., 1988). As mitocôndrias produzem aproximadamente 90% da energia celular e são numerosas em tecidos metabolicamente ativos como no fígado, rins, músculo e cérebro. Variações nos aspectos de eficiência energética da função mitocondrial podem explicar diferenças fenotípicas na taxa de crescimento e eficiência alimentar de bovinos. Existem muitas evidências que apontam vários possíveis mecanismos de variação do metabolismo, porém eles sugerem uma regulação a nível tecidual (HERD; ODDY; RICHARDSON, 2004).

- Estresse – Já foi demonstrado que a resposta ao estresse difere entre animais de alta e de baixa EA, através da relação entre a concentração de cortisol plasmático e CAR, assim como contagem de células brancas e vermelhas do sangue (RICHARDSON et al., 2004). Considerando que a resposta fisiológica ao estresse inclui aumento na taxa metabólica, consumo de energia, lipólise e degradação de proteínas, esta é uma característica que pode contribuir bastante para o desempenho dos animais.
- Atividade física – Vários mecanismos estão associados com variações na atividade como o gasto envolvido na alimentação, ruminação e locomoção em várias velocidades. Variações na produção de calor também acontecem como consequência do gasto energético associado à atividade física.
- Termorregulação – A perda de calor por evaporação é a principal rota para perda de energia em ruminantes. Apesar de não haver estudos relacionando taxa de respiração com EA, esta é a principal forma de regulação da perda de calor.

Considerando que a variação biológica da EA está sob o controle de diversas vias metabólicas com muitos genes reguladores, tecnologias que avaliem globalmente o perfil de determinadas moléculas biológicas (DNA, RNAs, proteínas, lipídeos ou metabólitos) representam importantes ferramentas para nos ajudar a entender essas características complexas.

2.4. Genômica nutricional

Nas últimas décadas, o conhecimento sobre a informação genética contida no DNA, bem como a tecnologia para estudá-las evoluíram rapidamente, permitindo com que os bancos públicos acumulassem um grande volume de informações sobre a sequência de nucleotídeos do genoma de diversas formas de vida como plantas, bactérias, vírus, fungos, protozoários e animais. Contudo, somente os dados obtidos nos projetos de sequenciamento não são suficientes para compreendermos o papel dos genes, dos RNAs e das proteínas no funcionamento dos organismos. Um novo campo de estudo, a genômica funcional, surgiu então visando determinar as funções individuais dos

genes e de seus produtos (RNAs e proteínas) dentro do contexto global do organismo, através do padrão de expressão gênica e proteica em células e tecidos e da interação entre essas moléculas para formar organismos complexos e dinâmicos, que podem se adaptar ao ambiente e a diversas situações fisiológicas diferentes (STEINMETZ; DAVIS, 2004). As abordagens utilizadas no estudo da genômica funcional incluem a transcriptômica, que estuda a relação entre o genoma e a expressão gênica global através da abundância de mRNAs; a proteômica, que estuda o conjunto de proteínas, moléculas centrais em diferentes funções biológicas; a metabolômica, que representa a análise qualitativa e quantitativa do total de metabólitos (peptídeos, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e outros) em um dado organismo e em um momento específico; e várias outras ciências “ômicas” (FIALHO; MORENO; ONG, 2008). Os campos de bioinformática e biologia computacional também são ferramentas imprescindíveis para o desenvolvimento da genômica funcional.

O impressionante desenvolvimento das ferramentas “ômicas” se deve a um dos mais ambiciosos projetos científicos da história, o Projeto Genoma Humano, resultado da cooperação entre 18 países, 250 laboratórios e 5000 cientistas (FIALHO; MORENO; ONG, 2008). No pós-genoma humano, o resultado de pesquisas nessa área, principalmente aqueles que envolvem indivíduos geneticamente diferentes ou submetidos a condições contrastantes, têm permitido um entendimento mais rápido e preciso das relações gene-fenótipo, assim como das interações genótipo-ambiente que geram alterações importantes nas características fenotípicas dos animais (FURLAN; FERRAZ; BORTOLOSSI, 2007). Assim, abriu-se espaço para o surgimento de uma série de novas áreas de estudo dentre as quais a Genômica Nutricional, já que talvez a alimentação seja o componente ambiental mais persistente e por isso, um dos que mais contribuem para moldar as variações do genoma e de sua expressão (STOVER, 2004).

Definida como a interação entre os componentes químicos da dieta e o material genético dos indivíduos, a genômica nutricional visa compreender os efeitos da alimentação na saúde e na doença. A dieta reflete a complexa combinação de vários nutrientes e não-nutrientes. Segundo a (ANVISA, 2015), nutrientes são substâncias químicas consumidas como componentes de um

alimento, que: (1) proporcionam energia; (2) são necessários ou contribuem para o crescimento, desenvolvimento e a manutenção da saúde e da vida; e/ou (3) cuja carência pode ocasionar mudanças químicas ou fisiológicas características. Exemplos de nutrientes são os carboidratos, proteínas, lipídeos e fibras. Os componentes da dieta que não se encaixam nessa definição são considerados não-nutrientes, como por exemplo, licopeno, luteína, zeaxantina, fitoesteróis, polióis, probióticos e cafeína. Os antinutrientes limitam a disponibilidade biológica de nutrientes, como os inibidores de proteases, polissacáridos não amiláceos, lectinas, ácido fítico, aminoácidos não proteicos, saponinas e compostos fenólicos (SIDDHURAJU; BECKER; MAKKAR, 2000). Todos os componentes da dieta podem interagir entre si e com o organismo, tendo impacto na condição sanitária e produtiva dos animais.

Dentro do conceito global de genômica nutricional, dois termos são comumente utilizados: “nutrigenômica” e “nutrigenética”. A nutrigenômica avalia os efeitos da dieta sobre a expressão do genoma e seus efeitos no proteoma e metaboloma. Dessa perspectiva, os nutrientes e não nutrientes são sinais dietéticos que podem ser detectados por receptores nucleares que influenciam a expressão gênica e posteriormente a produção de RNAs, proteínas e metabólitos (MÜLLER; KERSTEN, 2003). Assim, através desses padrões de expressão, a nutrigenômica pode nos ajudar a entender como a nutrição pode influenciar as vias metabólicas e o controle homeostático em animais hígidos e doentes. A nutrigenômica costuma ser confundida com a nutrigenética. Essa última está focada nos efeitos das variações gênicas sobre a utilização dos componentes da dieta e seus efeitos sobre o fenótipo (ORDOVAS; CORELLA, 2004). Nesse caso, a abordagem inclui a identificação e caracterização de variantes genéticas associadas às diferentes respostas aos componentes da dieta como, por exemplo, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - *single nucleotide polymorphism*) que são a troca de um único par de bases nitrogenadas na sequência de DNA; os INDELs, que são inserções ou deleções de bases nitrogenadas na sequência de DNA; as variações no número de cópias dos genes (CNA – *copy number variation*); entre outros. Variações genéticas dentro de uma mesma população podem levar indivíduos a terem respostas diferentes à mesma dieta. Os mecanismos pelos quais os

nutrientes influenciam o funcionamento das células podem ser diretos ou indiretos e estão resumidos na figura 3.

Figura 3 - Destino e atividades dos nutrientes nas células. Os nutrientes podem agir diretamente como ligantes para receptores de fatores de transcrição (A); podem ser metabolizados por vias metabólicas primárias ou secundárias, alterando a concentração de substratos e intermediários envolvidos na regulação gênica ou na sinalização celular (B); ou alterando vias de transdução de sinal e sinalização (C). Adaptado de Kaput e Rodriguez (2004).

A genômica nutricional na área animal ainda é uma ciência recente, mas podem-se propor várias aplicações futuras como a formulação de dietas personalizadas em função de raça, linhagem ou grupos específicos de animais para aumento de produção ou mesmo prevenção/tratamento de doenças; seleção de animais com desempenho superior ingerindo alimentos específicos disponíveis em uma região; e aumento de precisão de medidas de biodisponibilidade. Essas aplicações podem influenciar diretamente na diminuição do custo de produção e do impacto ambiental da produção animal, bem como no aumento da lucratividade do produtor.

2.5. Características e funções do fígado, órgão central do metabolismo

O fígado é o maior órgão interno do corpo e em ruminantes está deslocado para o lado direito da cavidade abdominal cranial. O suprimento de

sangue desse órgão é recebido principalmente pela veia porta, que drena o trato gastrointestinal, e em menor porcentagem (cerca de 30 a 40%) pela artéria hepática (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). O sangue deixa o fígado pela veia hepática. Com relação à estrutura, o órgão está dividido em subunidades funcionais chamadas lóbulos hepáticos, que são hexagonais e apresentam uma veia (vênula hepática terminal) no centro. Na periferia dos lóbulos estão localizados nervos, vasos linfáticos e ramos do ducto biliar, da veia porta e da artéria hepática, circundados por matriz extracelular colagenosa que forma uma fronteira com os hepatócitos. De outro ponto de vista, o da secreção de bile, a subunidade anatômica hepática é chamada ácino. Nesse caso, ramos da veia porta e da artéria hepática estão no centro do ácino e a vênula hepática localiza-se na periferia, recebendo sangue de vários ácinos ao redor. A bile produzida pelos hepatócitos flui por canalículos biliares até os ductos biliares no centro dos ácinos.

Os hepatócitos são organizados em placas unicelulares que se estendem radialmente a partir da vênula hepática terminal. Essas placas são separadas por sinusóides vasculares que permitem que os hepatócitos captem os constituintes do plasma como bilirrubina e aminoácidos e também secretem produtos do metabolismo hepático, como lipoproteínas e fatores de coagulação. O sangue vindo da artéria hepática e da veia porta mistura-se nos sinusóides e flui para a vênula hepática terminal. As células de Kupffer são macrófagos hepáticos e estão localizadas no lúmen dos sinusóides, retirando agentes infecciosos e células senescentes do sangue sinusoidal através de fagocitose e depuração de complexos imunes. Essas células não são estáticas, podendo migrar para áreas de dano tecidual e linfonodos. Elas são derivadas de recrutamento e replicação *in situ* de monócitos do sangue. Outro tipo celular do fígado são as células estreladas, também conhecidas como lipócitos ou células de Ito, que se localizam numa região chamada espaço de Disse, entre os hepatócitos e as células endoteliais que fazem fronteira com o sinusóide. Essas células são responsáveis por estocar vitamina A, porém, durante um dano hepático elas têm sua função e morfologia alteradas, perdem seu conteúdo de vitamina A e passam a sintetizar colágeno e outros componentes da matriz extracelular que levam à fibrose hepática.

As funções hepáticas são várias e cruciais, incluindo metabolismo de bilirrubina, ácidos biliares, carboidratos, lipídeos, xenobióticos, síntese de proteínas e imunidade.

- **Metabolismo de bilirrubina:** A bilirrubina é um dos maiores componentes da bile e é produzida pela degradação de hemoglobinas e outras substâncias com grupamento heme, como os citocromos, e pela quebra extra-hepática de eritrócitos senescente. A bile também é composta por água, colesterol, ácidos biliares, íons inorgânicos e outros constituintes. Uma das funções da bile é a excreção de substâncias que não são aproveitadas pelo organismo como o colesterol excedente, a bilirrubina e os xenobióticos metabolizados.
- **Metabolismo de ácidos biliares:** Os ácidos biliares são sintetizados a partir do colesterol e suas principais funções são a manutenção da homeostase do colesterol, o estímulo para fluxo de bile e digestão, e a absorção de vitaminas e gorduras lipossolúveis. Eles são absorvidos pelo íleo e reciclados continuamente no fígado, já que a necessidade de ácidos biliares excede um muito a capacidade do fígado de produzi-los. Problemas nesse processo de reciclagem levam a má absorção de gorduras e deficiência de vitaminas lipossolúveis.
- **Metabolismo de carboidratos:** Uma importante função do fígado é a regulação dos níveis plasmáticos de glicose. O fígado remove os carboidratos do plasma e o armazena na forma de glicogênio ou ácidos graxos. Quando é necessário, o balanço energético se dá pela glicólise ou gliconeogênese.
- **Metabolismo de lipídeos:** O fígado está envolvido na produção e degradação de colesterol, triglicérides, fosfolipídios e lipoproteínas. Os hepatócitos sintetizam ácidos graxos quando os níveis de energia estão altos e os oxidam quando é necessário liberar energia.
- **Metabolismo de xenobióticos:** Substâncias estranhas ao organismo tanto exógenas, como fármacos e inseticidas, quando endógenas, como esteroides lipofílicos, são hidrolisados no fígado para posterior eliminação. Essa metabolização ocorre principalmente pelas enzimas do citocromo P450 do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos.

- Síntese de proteínas: Diversas proteínas plasmáticas são produzidas pelo fígado como a albumina, lipoproteínas, fatores de coagulação, proteínas da fibrinólise e componentes do sistema complemento.
- Função imune: O fígado tem função imune importante, participando da resposta à inflamação sistêmica através da síntese e liberação de proteínas da fase aguda. Na maioria das espécies, esse órgão contém a maior quantidade de fagócitos mononucleares e células destruidoras naturais do corpo. As células de Kupffer processam a maior parte do material estranho transportado pelo sangue em todas as espécies domésticas, exceto suínos, caprinos e bovinos, que têm essa função realizada por macrófagos intravasculares nos capilares dos alvéolos pulmonares.

2.6. Estudos genômicos da eficiência alimentar

Há cinco anos, foi publicada a versão mais completa do genoma bovino, tendo seu tamanho estimado em 2,87 Gpb (Giga pares de bases) com pelo menos 22.000 genes que codificam proteínas, além de outros 496 microRNAs (ELSIK et al., 2009). Hoje, a última versão (Ensembl V78) de anotação do genoma bovino apresenta 19.994 genes codificadores de proteínas, 3.825 genes codificadores de RNAs pequenos não-codificantes, 797 pseudogenes e um total de 26.740 diferentes transcritos. A partir destes dados, espera-se que ocorra a identificação de novas funções e sistemas regulatórios importantes para os bovinos, podendo facilitar a descoberta de novas ferramentas tanto para o melhoramento genético quanto para a produção de carne e leite (ELSIK et al., 2009).

Diversos estudos de mapeamento de QTL (*quantitative trait loci*) identificaram regiões do genoma bovino associadas com EA (MÁRQUEZ et al., 2009; NKRUMAH et al., 2007; SHERMAN et al., 2009). Na base de dados *CattleQTLdb* (HU et al., 2013) existem registros de 82 QTL para CA e 330 QTL para CAR, espalhados por todos os 29 cromossomos autossômicos. Porém, os intervalos compreendidos dentro dos QTL são muito grandes para serem usados na seleção assistida por marcadores moleculares, sendo muito difícil identificar genes causais da variação na EA em regiões onde podem estar

localizadas centenas de genes. A criação de chips SNPs de alta densidade, com marcadores espaçados ao longo de todo o genoma, permitiu estudos de associação ampla (GWAS – *genome wide association studies*) entre SNPs e características de interesse. Nesse caso, assume-se que os polimorfismos associados com o com fenótipo estão em desequilíbrio de ligação (DL) com genes responsáveis por ele e que a densidade de marcadores é suficiente para representar o QTL inteiro (ESPIGOLAN et al., 2013).

Com relação às medidas de EA, alguns estudos de GWAS reportaram diversos SNPs e regiões genômicas que poderiam explicar parte da variação dessa característica. Sherman, Nkrumah e Moore (2010) analisaram a associação de 2.633 SNPs em 464 animais das raças Angus, Charolês ou híbridos com o CAR e encontraram 150 SNPs com efeito de substituição alélica significativo. Dois métodos foram utilizados para selecionar esses SNPs e criar painéis de marcadores. O primeiro, criado utilizando-se modelo multivariado, apresentou 32 SNPs que representaram 36,5% da variação fenotípica do CAR. Já o segundo, utilizando o método de valor genético molecular sequencial, identificou 79 SNPs que explicaram 37,3% da variação fenotípica da característica. Rolf et al. (2011) utilizaram um painel comercial de 50k para genotipar 698 animais da raça Angus e testar a associação com CMS, CAR e GMD. Um total de 53, 66, 68 SNPs explicaram 54,12%, 62,69% e 55,13% do valor genético de CMS, CAR e GMD, respectivamente. Uma avaliação de vias metabólicas mostrou que vários desses SNPs estão localizados em regiões que contém genes relacionados com funções metabólicas como proliferação celular e apoptose, desordens metabólicas e transdução de sinal. Mais recentemente, em estudo do grupo, SantanA et al. (2014) realizaram um GWAS para CMS e CAR com 720 bovinos Nelore e encontraram apenas 5 marcadores significativos, 3 associados com CMS e 2 com CAR. Esses marcadores estão próximos de genes relacionados ao transporte iônico e à regulação do apetite. Já Oliveira, et al., 2014 usou chip comercial de alta densidade (770k) em 593 bovinos Nelore para testar a associação de janelas de 1 Mb com GMD, CMS, CA, EAB, CAR, eficiência de manutenção, eficiência de ganho, eficiência parcial de crescimento e taxa relativa de crescimento. O total de 36 QTLs (janelas) foram identificadas e explicaram individualmente de 0,5% a 9,07% da variância genética. Os genes contidos nessas janelas parecem

estar relacionados à resposta imune e inflamatória, metabolismo iônico e de cálcio, proteólise, metabolismo de lipídios e ácidos graxos, glicólise, sistema de ubiquitinação, geração de energia, crescimento e desenvolvimento. Com relação ao CAR, 4 regiões genômicas foram identificadas e explicaram, individualmente, entre 1 e 1,50% da variação genética da característica. Nessas regiões, 3 genes candidatos foram selecionados, 2 relacionados à proteólise (DEPP1 e TUBB3) e um relacionado ao metabolismo de ácidos graxos (PTGS1).

Tabela 1 - Marcadores associados com CAR em trabalhos de GWAS (continua).

Marcador	Crom.	Posição	Autor	Subespécie	Genes próximos
rs47703977	1	13350652	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29025433	1	95997539	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	FNDC3B
rs29014082	2	134281005	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
ss61489474	3	7052779	Rolf et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29017229	4	30202937	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs110188299	5	32861996	Rolf et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs43710085	6	87878904	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	RUFY3
rs109373082	6	103133828	Rolf et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs41660853	8	458919	Santana et al.	<i>Bos indicus</i>	ANXA10, DDX60
rs132846819- rs136767848	8	43001055- 43994362	Oliveira et al.	<i>Bos indicus</i>	
rs41793507	8	53334416	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs43705534	8	90553133	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	SHC3
rs43705629	10	16562010	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs41605841	10	-	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29011971	11	52491236	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29013423	11	58208950	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs109365529- rs132654030	11	93000777- 93986308	Oliveira et al.	<i>Bos indicus</i>	PTGS1
rs110643661	12	78694446	Rolf et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29012348	12	80892258	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	PCCA
rs29015791	15	48068911	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs109918426	15	62428148	Rolf et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs41636597	17	27808938	Rolf et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs109535395- rs134508640	18	14008775- 14999189	Oliveira et al.	<i>Bos indicus</i>	DEPP1, TUBB3

Tabela 1 - Marcadores associados com CAR em trabalhos de GWAS (conclusão).

Marcador	Crom.	Posição	Autor	Subespécie	Genes próximos
rs42536809	18	21509622	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29009652	18	54470798	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	ARHGAP35
rs29015137	18	56121920	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	TRPM4
rs43708449	18	82260685	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	CLP1
rs41570611	18	-	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29015011	19	54287604	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs41973640	21	31443165	Rolf et al.	<i>Bos taurus</i>	PSMA4
rs136295413- rs41980878	21	35004352- 35999673	Oliveira et al.	<i>Bos indicus</i>	
rs135777172	21	71091607	Santana et al.	<i>Bos indicus</i>	GPR132, CDCA4, AHNK2, BRF1
rs29014055	23	7810956	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	UQCC2
rs29027245	24	18730719	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29013464	25	37958335	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29013727	26	8221270	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	PRKG1
rs43708521	26	33605534	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	
rs29011694	28	19731619	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	REEP3, 7SK
rs17872022	29	43205758	Sherman et al.	<i>Bos taurus</i>	GPR137, KCNK4, BAD

Apesar de encontrarmos alguma concordância entre os resultados de trabalhos estudando regiões genômica associadas à EA (vide tabela acima), é possível perceber que para cada população analisada, diferentes processos biológicos parecem ser mais importantes, o que é esperado dado a complexidade da característica. Além disso, todos os estudos concluem que os resultados precisam ser validados em outras populações (DE OLIVEIRA et al., 2014; SANTANA et al., 2014a; ROLF et al., 2011; SHERMAN; NKRUMAH; MOORE, 2010). Isso porque a densidade dos marcadores e a consistência dos padrões de DL entre a população de treino (população com fenótipo e genótipo, usada para identificar marcadores importantes) e a população de teste, afetam as correlações entre marcadores e os QTLs desconhecidos, assim como a herdabilidade e o número de indivíduos na população de treino afetam a acurácia da estimativa dos efeitos dos marcadores (SNELLING et al., 2013). Esta consideração implica que entre diferentes raças, que apresentam variações no padrão de DL, os efeitos estimados dos marcadores em uma raça podem não ser aplicados a outra raça (SNELLING et al., 2013). Sobre a adoção de marcadores moleculares na seleção para EA, Moore, Mujibi e

Sherman (2009) listam duas principais barreiras; a primeira sendo a falta de conhecimento sobre a interação entre genes afetando a EA com relação a outras características, e a segunda sendo o número de animais com estimativas de qualidade para EA, que ainda é pequeno.

Mesmo não conhecendo as variantes funcionais responsáveis pela característica, a incorporação de informações genotípica em sistemas de avaliação genética existentes aumentou a acurácia do valor genético de animais jovens para características de interesse dentro de raças (LÔBO et al., 2011). Agora, sob uma nova abordagem chamada seleção genômica funcional, os pesquisadores procuram identificar variantes mais susceptíveis de ter efeitos funcionais para que eles possam melhorar a portabilidade das previsões genômicas entre raças e em populações cruzadas (SNELLING et al., 2013). Para isso, o conhecimento das funções dos genes e de suas expressões é importante para indicar quais genes e elementos regulatórios poderiam afetar o fenótipo, permitindo com que as avaliações genômicas foquem em alterações causais, que teriam maior probabilidade de afetarem mecanismos em comum entre raças e mesmo entre espécies diferentes (SNELLING et al., 2013).

2.7. Análise de transcriptoma

Uma alternativa para identificar genes candidatos responsáveis direta ou indiretamente pelas alterações fisiológicas que fazem os animais diferirem em seu fenótipo é através da análise de transcriptoma. O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos expressos em uma célula, tecido, órgão ou organismo e representa uma ligação importante entre a informação contida no DNA e o fenótipo. Há muitos anos estão disponíveis ferramentas para a análise de expressão gênica como Northern Blots, RT-PCR, ESTs e SAGE, porém, a análise de transcriptoma se tornou rápida e abrangente com a invenção dos microarranjos de expressão gênica (MALONE; OLIVER, 2011). A técnica consiste em extrair os transcritos da amostra que se deseja analisar, marcá-los com fluoróforos, hibridizá-los nos microarranjos que contém sondas complementares aos transcritos, lavá-los e escanear o microarranjo com um laser. Os transcritos expressos fluorescem e a intensidade da luz emitida é convertida em valor de expressão. Essa tecnologia gerou uma grande

quantidade de informações importantes, Malone e Oliver (2011) listam algumas, como o perfil de expressão gênica de diferentes tipos de células e tecidos, a mudança de expressão gênica em diferentes estados do desenvolvimento e em doenças, e diferenças dentro e entre espécies, além de estimar o quanto do genoma é transcrito em RNA não codificantes. Buscando-se por “*gene expression microarray*” no PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) encontra-se mais de 45.000 citações (em 14/01/2015). Isso mostra que essa técnica foi largamente utilizada o que levou a um grande aprimoramento tanto da tecnologia envolvida quanto das metodologias de normalização para controlar os artefatos da análise (MALONE; OLIVER, 2011).

Apesar de muito bem padronizados, com o desenvolvimento das plataformas de sequenciamento de nova geração os microarranjos estão sendo substituídos pelo chamado RNAseq ou sequenciamento de RNAs. Este consiste em fragmentar todos os transcritos de uma amostra e depois sequenciá-los paralelamente. Os produtos desse sequenciamento, chamados *reads*, são então alinhados com base no genoma de referência (quando disponível) ou montados *de novo*, como uma espécie de quebra-cabeças onde se espera que a abundância dos *reads* esteja correlacionada com o valor de expressão do respectivo gene. O RNAseq tem diversas vantagens sobre o microarranjo como a capacidade de detectar novos genes, diferentes isoformas do mesmo gene e até mesmo polimorfismos que podem gerar medidas de expressão alelo-específicas. Além disso, ele pode ser utilizado para espécies que não tem seu genoma completo disponível. Há também algumas desvantagens associadas à técnica, por exemplo, a grande magnitude dos arquivos gerados, fazendo-se necessário um suporte de bioinformática, já que arquivos tão grandes precisam ser manipulados em linha de comando. Para driblar esse problema, já existem algumas interfaces como o Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) ou o IPlant (<http://www.iplantcollaborative.org/>) que são mais amigáveis para pesquisadores que não estão familiarizados com linguagens de programação. Outra desvantagem é que o conhecimento sobre os vieses da técnica, como a baixa detecção de genes pouco expressos e a heterogeneidade de cobertura em algumas regiões; e as metodologias para lidar com eles ainda não estão bem definidas como nas análises de microarray.

A principal abordagem utilizada nas análises de transcriptoma é a identificação de genes diferencialmente expressos em animais geneticamente divergentes para uma característica. Existem diversos *softwares* livres utilizados nessas análises como o Cuffdiff (TRAPNELL et al., 2013), edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010) e DESeq (ANDERS; HUBER, 2010) e elas geralmente consistem da normalização das contagens, seguida da estimação de parâmetros dos modelos estatísticos e finalmente o teste de expressão diferencial (RAPAPORT et al., 2013). Para cada um dos 3 passos citados, cada software adota diferentes estratégias para lidar com os diferentes vieses de cada etapa. Diversos trabalhos revisaram o desempenho desses softwares e apesar de nenhum ser apontado como melhor em todas as etapas da análise, os baseados em distribuição negativa binomial como o edgeR e o DEseq parecem apresentar performance satisfatória, com um bom controle de falsos positivos, enquanto o CuffDiff parece apresentar uma alta taxa de falsos positivos (ANDERS; HUBER, 2010; DILLIES et al., 2013; MAZA et al., 2013; RAPAPORT et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Apesar disso, o Cuffdiff é o único capaz de calcular a expressão a nível de transcrito e não de gene, levando em consideração as diferentes isoformas formadas a partir de *splicing* alternativo, umas das vantagens do RNAseq. É importante comentar que apesar do custo do sequenciamento ter diminuído com o tempo, este ainda é um fator limitante, que leva os pesquisadores a tomarem uma importante decisão entre aumentar a profundidade do sequenciamento ou aumentar o número de replicatas biológicas. Rapaport et al. (2013) demonstra que o número de replicatas biológicas tem maior efeito na acurácia de detecção de genes diferencialmente expressos pelos *softwares* do que a profundidade de sequenciamento, sendo a primeira a melhor opção na hora de planejar um experimento de ED.

A abordagem de expressão diferencial para estudo da EA foi utilizada em um experimento com bovinos da raça Angus, onde grupos de alta e baixa eficiência alimentar tiveram amostras de fígado analisadas pela técnica de microarray com 24.000 sondas. Cento e sessenta e um genes foram diferencialmente expressos, a maioria deles relacionados com organização, proliferação e sinalização celular, metabolismo de xenobióticos, síntese proteica e metabolismo de lipídeos e carboidratos (CHEN et al., 2011). Apesar

de gerar importantes informações sobre os potenciais mecanismos envolvidos na regulação da EA, a análise da expressão diferencial por si só não nos dá informações sobre o comportamento de genes reguladores num sistema complexo, porque quando se compara a expressão de um gene com ele mesmo em duas condições (estudos de caso e controle, por exemplo), o contexto dessa expressão pode ser perdido (HUDSON; DALRYMPLE; REVERTER, 2012). Além disso, genes podem ter papel importante para o fenótipo por apresentarem polimorfismos na região codificadora que alteram sua função, mas não necessariamente apresentam mudança na expressão gênica (DE LA FUENTE, 2010). Outro ponto é que o enriquecimento funcional, utilizando vias metabólicas já conhecidas, também gera uma perda de informações sobre os mecanismos fisiológicos que ainda não são conhecidos (HUDSON; DALRYMPLE; REVERTER, 2012). Hoje, uma abordagem mais global tem sido empregada não apenas fazendo surgir o campo da biologia de sistemas, mas também unindo áreas que antes eram definidas como disciplinas individuais de pesquisa como informática, estatística, biologia molecular, patologia, nutrição e outras (PAREEK; SMOCZYNSKI; TRETYN, 2011).

2.8. Genética de sistemas e redes de genes

A genética de sistemas é uma abordagem recentemente descrita e que pode trazer informações importantes para a compreensão dos mecanismos que regulam a eficiência alimentar, possibilitando sua modulação pela dieta, ambiente ou mesmo pela seleção de marcadores genéticos responsáveis pelos efeitos em questão. A genética de sistemas é uma versão especializada da biologia de sistemas, focada em populações, que visa elucidar as complexas interações entre genes, proteínas, metabólitos, células e tecidos que se manifestam como variações fenotípicas, a fim de identificar as variantes genéticas relacionadas ao fenótipo de interesse (VOY 2011). Quando aplicada à nutrição, a genética de sistemas permite determinar os mecanismos que levam indivíduos a diferir em sua resposta à dieta (VOY 2011), associando-se a nutrigenômica. Estas abordagens baseiam-se no fato de que os genes e produtos de genes podem interagir uns com os outros numa rede complexa e

por isso, o efeito da mudança no comportamento de um gene pode ser propagada através das interações e afetar outros genes (CHO; KIM; PRZYTICKA, 2012). Esses estudos de redes, quando aplicados aos dados de transcriptoma, podem revelar uma regulação mais complexa da transcrição, detectando conjuntos de genes altamente co-expressos (FULLER et al., 2007). O resultado são "módulos" de genes representando redes de co-expressão que recuperam a informação estrutural e funcional do tecido, que foi perdida durante a preparação da amostra para a extração de RNA (HUDSON; DALRYMPLE; REVERTER, 2012). Esta estratégia pode ser particularmente útil para revelar a função biológica de novos genes, uma vez que se espera que os módulos de genes co-expressos trabalhem coordenadamente para uma função biológica.

A arquitetura genética por trás de características complexas envolve uma variedade enorme de genes sensíveis a mudanças ambientais e, portanto, determinar os mecanismos responsáveis por elas representa um grande desafio (SWAMI, 2009). Sistemas biológicos complexos são regulados por milhares de espécies de moléculas de diferentes naturezas químicas. Esses sistemas regulatórios são chamados de "redes", podendo ser redes metabólicas, redes de interação de proteínas e redes de regulação transcricional (redes de genes) (BARABÁSI; OLTVAI, 2004). Nessas redes, as espécies biomoleculares, como metabólitos, proteínas e genes, são representadas por nós e as interações entre elas são representadas por arestas (figura 4). O grau de conectividade (K) de um nó é calculado pela soma das arestas ligadas a ele. Espera-se, que as redes contenham muitos nós com poucas conexões e poucos nós centrais com muitas conexões (DE LA FUENTE, 2010).

Figura 4 - Exemplo de rede com nódulos (círculos pretos) e arestas. As arestas podem ser direcionadas (setas pretas), indicando o sentido da interação, ou podem ser não direcionada (arestas vermelhas), indicando relação simétrica. (DE LA FUENTE, 2010)

Uma das maneiras de analisar como as variações nos dados moleculares e características fenotípicas poderiam se relacionar seria verificar a correlação entre 2 conjuntos de dados diferentes, determinando a relação entre eles. Neste caso, as interpretações poderiam ser de que a característica molecular influencia a característica fenotípica (característica molecular é causal), a característica fenotípica influencia as características moleculares (característica fenotípica é causal) ou ambas são influenciadas por um fator confundidor (as características molecular e fenotípica são independentes) (CIVELEK; LUSIS, 2014).

Abordagens de redes, como por exemplo, a co-expressão, podem identificar grupos de moléculas que compartilham características, no caso de expressão gênica, grupos de genes que apresentam padrão coordenado de expressão e que, portanto, estão altamente conectados. Esses grupos, chamados de módulos, podem ser então testados para sua relação com características fenotípicas. Padrões de coexpressão são comumente representados por correlações entre pares de genes (DE LA FUENTE, 2010). Um exemplo de metodologia para esse tipo de análise é o WGCNA (*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*) implementado como pacote do programa R. O melhor desempenho desse método sobre o método chamado PCIT (*Partial Correlation and Information Theory*) foi demonstrado por (KADARMIDEEN; WATSON-HAIGH, 2012) que verificaram que o primeiro

manteve mais genes centrais biologicamente relevantes e suas conexões. Mais informações sobre a metodologia envolvida no WGCNA podem ser encontradas em Fuller et al. (2007), Langfelder e Horvath (2008) e na seção 3.15. deste trabalho.

Outra abordagem interessante é a comparação da estrutura de duas sub-redes de co-expressão em condições fenotípicas diferentes. Essa comparação pode mostrar alterações em sistemas regulatórios através da diferença na conectividade de um gene nas duas condições, já que podemos admitir que genes com grande alteração de conectividade têm um papel importante para o fenótipo (DE LA FUENTE, 2010). Como prova da importância da abordagem de co-expressão diferencial, Hudson, Reverter e Dalrymple (2009) estudando bovinos com e sem uma mutação no gene da miostatina que leva à dupla musculatura, não encontraram o gene como sendo diferencialmente expresso, mas puderam identificá-lo baseando-se na análise de co-expressão diferencial. Apesar da abordagem de co-expressão já ter sido utilizada para analisar diversos fenótipos em diferentes animais como camundongo (LIU; YE, 2014), peixe (FILTEAU et al., 2013) e suínos (PONSUKSILI et al., 2013), não foram encontrados trabalhos utilizando essa metodologia para estudar EA em bovinos, sendo esta uma grande oportunidade de elucidar melhor a dinâmica de regulação dessa característica importante.

Hipótese

Animais de alta e baixa eficiência alimentar diferem fenotipicamente de forma que é possível identificar, através de expressão gênica global hepática, funções biológicas e genes reguladores que expliquem essa característica.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a eficiência alimentar em bovinos Nelore através de medidas de desempenho em confinamento, bioquímica sérica, características de carcaça, avaliação de líquido ruminal e expressão gênica global hepática a fim de identificar funções biológicas, novos genes e genes reguladores associados a esse fenótipo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Confinamento experimental - consumo alimentar e ganho de peso

Foram utilizados 98 bovinos machos inteiros da raça Nelore com aproximadamente 18 meses de idade e média de 401 ± 31 kg de peso vivo, provenientes do rebanho da prefeitura do Campus da USP de Pirassununga (PUSP-P) e instalados no Confinamento Experimental do Departamento de Zootecnia. Do total de animais, 52 foram alojados em baias individuais (Figura 5) e 46 divididos em quatro piquetes dotados de cochos individuais com portão do tipo *Calan Broadbent* (American Calan Inc, Northwood, NH, USA) que possibilitam a avaliação do consumo individual dos animais (Figura 6). Todos os animais foram vermifugados no início do período de adaptação.

Figura 5 - Confinamento de baias individuais.

Figura 6 - Confinamento de baias coletivas com portão do tipo *Calan Broadbent*.

A dieta foi fornecida na forma de ração total misturada (RTM) duas vezes ao dia, sempre as 8 e 16 horas e as sobras de alimentação foram retiradas e pesadas diariamente para cálculo do consumo de matéria seca diário. Pesagens foram realizadas ao início, ao fim e a cada 14 dias do período experimental que teve duração de 70 dias precedidos de 21 dias de adaptação à dieta e às instalações. A composição da dieta pode ser vista na Tabela 2. Esta teve proporção de 75% de concentrado e 25% de volumoso, com 79% de nutrientes digestíveis totais e 17% de proteína bruta, sendo formulada no software RLM 3.0.

Tabela 2 - Composição da dieta.

Ingrediente	% Matéria seca
Milho grão seco	50,91
Silagem de milho (35% grão)	27,02
Farelo de soja 45%	13,72
Polpa citrica peletizada	5,98
Uréia	0,98
Calcário	0,60
Sal mineral Minerthal80S®	0,60
Cloreto de potássio	0,18

3.2. Medidas de eficiência alimentar

Os animais foram caracterizados quanto as variáveis: ganho de peso diário (GMD), consumo médio diário de matéria seca (CMS), peso vivo médio

metabólico ($PVM^{0,75}$). A eficiência alimentar (EA) foi estimada pelas variáveis: conversão alimentar (CMS/GMD), consumo alimentar residual (CAR) e consumo e ganho residual (CGR), sendo esta última uma medida caracterizada recentemente que leva em consideração o consumo alimentar residual e o ganho de peso residual (GPR) (BERRY; CROWLEY, 2012). O CAR foi calculado como a diferença entre o CMS observado e o CMS predito. Os valores preditos de consumo de matéria seca (CMS_{pred}) foram obtidos pela regressão do CMS observado no GMD e no $PVM^{0,75}$. O GMD no período foi determinado como o coeficiente angular da regressão linear dos PV obtidos nas diferentes pesagens e os respectivos dias experimentais. O GPR foi estimado como o resíduo da equação de regressão do GMD sobre o $PVM^{0,75}$ e o CMS. O CGR foi calculado como: $CGR = -1 \times CAR + GPR$. A multiplicação do CAR por -1 foi realizada para que o CAR (onde o valor negativo é favorável) seja comparável com o GPR (onde o valor positivo é favorável). Dois animais apresentaram ganho de peso extremamente baixo no período e foram descartados das análises, restando 96 animais.

3.3. Avaliação de carcaça por ultrassonografia

Os animais foram avaliados por ultrassonografia (US) na região do músculo *Longissimus dorsi* (contrafilé), coletada na altura da 12ª e 13ª costelas para medidas de área de olho de lombo (AOL) e espessura de gordura (EGS); e do músculo *Biceps femoris* (picanha), para medida de espessura de gordura (EGP), nos manejos de pesagem do dia 0 (primeiro) ao dia 56, utilizando o equipamento Aloka SSD500 (vide Figura 10).

3.4. Análise sérica de colesterol, triglicérides, globulinas, AST, ALT, GGT, FA, albumina e proteína.

Durante todos os manejos de pesagem, sangue foi colhido da veia jugular de todos os animais em tubos a vácuo para sorologia, contendo ativador de coágulo jateado na parede do tubo que acelera o processo de coagulação (vide Figura 10). Os tubos foram centrifugados a 4°C a 3.500 rpm durante 15 minutos para separação do soro. Foram feitas três alíquotas de soro

para cada animal em microtubos de 1,5ml e armazenados em freezer -80°C . A análise sorológica foi realizada para os 20 animais mais eficientes e os 20 animais menos eficientes, classificados pelo CGR, nas amostras do dia 0 (primeiro) e do dia 70 (último) de confinamento. Foram avaliados os níveis de colesterol, triglicérides, globulinas, AST, ALT, GGT, FA, albumina e proteína. Nas amostras das demais coletas (dias 14, 28, 42 e 56) foram avaliados os níveis de GGT e colesterol.

3.5. Biometria

Durante as três últimas pesagens, foram feitas mensurações biométricas de comprimento corporal (CC), altura de garupa (AG), largura de garupa (LG, Figura 7), comprimento de garupa (CG) e profundidade de costela (PC), utilizando de uma fita métrica e um hipômetro (OLIVEIRA, BONIN e FERRAZ, 2012) e depois foi feita uma média das 3 medições (vide Figura 10).

Figura 7 - Medição de largura de garupa com auxílio de hipômetro.

3.6. EPMURAS

Na intenção de testar se o método EPMURAS poderia ser utilizado para identificação de animais mais eficientes em um rebanho de maneira rápida e menos onerosa, 20 animais de alta eficiência alimentar (AEA) e 20 de baixa eficiência alimentar (BEA), selecionados como extremos de CGR, foram avaliados pelo método EPMURAS pelo técnico e desenvolvedor dessa ferramenta, William Koury Filho. Para tanto, os bovinos foram dispostos em

baías coletivas, em grupos aleatórios de cinco animais, onde foram colocados em movimento pelo técnico de forma que ele pudesse dar notas de 1 a 6 para as características de Estrutura Corporal (E), Precocidade (P), Musculosidade (M) e Umbigo (U) e notas de 1 a 4 para as características de: Caracterização Racial (R), Aprumo (A) e Sexualidade (S).

3.7. Dados fenotípicos de abate e desossa

Os 40 animais selecionados como extremos de EA através da medida de CGR foram abatidos no abatedouro escola da prefeitura do campus de Pirassununga (PUSP-P) em dois dias, com seis dias de intervalo. Nos dias dos abates e desossas (dia posterior), foram coletados dados como peso vivo, peso da carcaça quente, peso da carcaça fria, peso de gordura pélvica e renal, peso do fígado, peso do dianteiro da meia carcaça, peso do traseiro da meia carcaça, peso do dianteiro e traseiro dividido em gordura, músculo e osso, e peso de alguns cortes principais do posterior, como contrafilé, picanha, patinho e alcatra.

3.8. Maciez de carne

Após 24h de refrigeração, duas amostras de músculo *Longissimus* foram coletadas de cada animal, embaladas a vácuo e maturadas por 0 e 7. Foi então avaliado cor (L^* , a^* , b^*), perdas por cocção e força de cisalhamento de Warner-Bratzler (WBSF). Depois de retirados dos pacotes, as amostras ficaram em descanso por 20 minutos e em seguida, foram medidos os valores L^* , a^* e b^* por espectrofotometria Minolta (CM2500d, Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japão) no espaço CIELAB. A fonte de luz foi definida como D65 com ângulo de observação ajustada para 10° e o tamanho da abertura de 30 mm. O instrumento foi previamente calibrado de acordo com as especificações do fabricante. As medições foram replicadas em diferentes porções das amostras e a média de três medidas foi considerada como o valor de cor. O WBSF foi analisado de acordo com a *American Meat Science Association* (1995). A perda por cocção foi calculada pela diferença de peso das amostras antes e

depois da cozedura e foram expressas em percentagem. As análises descritas foram realizadas junto ao Laboratório de Carnes da FZEA/USP.

3.9. Coleta de líquido ruminal

No momento da evisceração, foi feita uma incisão no rúmen por onde foi coletado o conteúdo ruminal com auxílio de um becker. Foram coletadas amostras para análises de contagem de protozoários e determinação de N-amoniaco realizadas junto ao Laboratório de Metabolismo Ruminal da FZEA/USP. Para a contagem de protozoários foi coletada uma medida padrão de conteúdo ruminal, homogeneizado com ajuda de um bastão e adicionada a mesma medida de formol 1:2, em vidro transparente fechado por batoque e tampa. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até o momento da análise. Para a determinação de N-amoniaco, o conteúdo ruminal foi filtrado com auxílio de gazes para retirada das partículas e em seguida, 2ml do filtrado foram colocados em vidro âmbar acrescidos de 1 ml de H_2SO_4 a 1N. O vidro foi fechado com batoque e tampa, armazenado em caixa térmica com gelo durante o abate e posteriormente mantido a $-20^{\circ}C$ até o momento da análise. A contagem dos protozoários *Entodinium spp.*, *Diplodinium spp.*, *Epidinium spp.*, *Isotricha spp.* e *Dasytricha spp.* em número de protozoários/mL de conteúdo ruminal foi realizada conforme técnica descrita por Dehority (1993). A quantificação do nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) foi realizada por colorimetria, pelo método de reação hipoclorito-fenol, segundo método proposto por Weatherburn (1967).

3.10. Avaliação histopatológica

Imediatamente após o abate, foram coletados fragmentos de fígado para avaliação histopatológica de 8 animais de AEA e 8 animais de BEA. Estes animais não são os 8 extremos de cada grupo, mas sim os próximos 8 animais da sequência. Os tecidos, fixados em solução de formaldeído a 10% por 48 horas, sofreram processamento histológico de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina de nosso laboratório (FZEA-USP). Cortes de

aproximadamente 4 µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE) (PROPHET et al., 1992).

A avaliação quantitativa procedeu-se pela determinação da porcentagem de espaços-porta acometidos por infiltrado mononuclear à objetiva de 10x. Todos os espaços-porta presentes nos cortes histológicos foram considerados. As imagens foram obtidas por microscópio Leica ICC50 HD acoplado a um sistema de câmera de vídeo e computador utilizando-se o software LAS EZ.

3.11. Coleta de amostras biológicas e extração de RNA

Ao final do período experimental, amostras de fígado foram coletadas por biópsia hepática de 20 animais de cada extremo de CGR. Os animais foram levados ao tronco de contenção em grupos, de forma que não ficaram sem acesso a dieta por mais de 2 horas. A biópsia foi realizada conforme Gröhn e Lindberg (1982) com pequenas modificações, sendo realizada no 11º espaço intercostal do lado direito dos animais, em uma área delimitada de 10x10 cm. Nesta área foi feita tricotomia, seguida de antissepsia e aplicação lidocaína sem vaso constritor (2% [C] = 5mL/animal) no tecido subcutâneo e na musculatura abdominal até completa anestesia local. Nesse mesmo local, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm, no cruzamento de duas linhas imaginárias sendo: uma da tuberosidade do íleo à escápula e outra perpendicular ao 11º espaço intercostal (figura 8). Foi inserida uma agulha de biópsia semi-automática na direção dorso ventral, guiada por ultrassonografia até atingir o fígado (Figura 9). O procedimento foi realizado pelo Médico Veterinário Paulo Fantinato Neto (CRMV-SP 22.692). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas posteriormente em freezer - 80°C.

Figura 8 - Diagrama mostrando o ponto para a introdução da agulha de biópsia. No 11º espaço intercostal direito, aproximadamente 20 cm abaixo da linha do dorso, no cruzamento de duas linhas imaginárias: uma que vai da tuberosidade do íleo à escápula (A-B) e outra perpendicular ao 11º espaço intercostal (C-D).

Figura 9 - Agulha de biópsia sendo inserida para coleta de fígado.

Oito animais de cada extremo foram selecionados para serem sequenciados. Para tanto, utilizou-se o mini kit RNeasy (QIAGEN, Crawley, West Sussex, UK), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, para extrair RNA total de aproximadamente 30mg das amostras de biópsia de fígado. A qualidade e concentração das amostras de RNA foram avaliadas utilizando-se eletroforese capilar em gel no equipamento Bioanalyzer 2100 com *Labchips RNA 6000 Nano* de acordo com as orientações do fabricante (Agilent Technologies Ireland, Dublin, Ireland). Amostras que apresentaram valor de integridade de RNA (*RNA integrity number* – RIN) menor do que 8,0 foram descartadas e extraídas novamente.

Figura 10 - Cronograma do período experimental e coletas de dados e amostras biológicas.

3.12. Preparação e sequenciamento de bibliotecas de RNA

As livrarias de RNA foram construídas utilizando-se o kit *TruSeq™ RNA Sample Prep* de acordo com o guia *TruSeq® RNA Sample Preparation v2* (Illumina, USA, 2012, Part # 15026495 Rev. D). Brevemente, os RNAs com cauda poliA foram isolados do total de 1µg de RNA total com *beads* de oligo-dT usando-se duas rodadas de purificação, e depois foram fragmentados. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se *primers* hexâmeros randômicos e transcriptase reversa. A segunda fita de cDNA foi então sintetizada em substituição à fita de RNA. O reparo das extremidades foi realizado pela ação de 3'-5' exonucleases que removem nucleotídeos sobressalentes na extremidade 3' e a atividade da polimerase que preenche a extremidade 5', seguido da poliadenilação da extremidade 3' para prevenir que os fragmentos se liguem uns aos outros durante a ligação dos adaptadores. Adaptadores de *reads paired-end* foram ligados à extremidade poliadenilada dos fragmentos. As bibliotecas foram então sequenciadas no equipamento Illumina HiSeq 2500 utilizando-se o kit *TruSeq PE Cluster* e *TruSeq SBS Kit* (2x100pb). As amostras foram sequenciadas em duas *lanes*, cada uma contendo 4 amostras do grupo de AEA e 4 amostras do grupo de BEA. Uma média de 27,7 milhões de *reads paired-end* com 100pb foram sequenciados por amostra.

3.13. Alinhamento de *reads* e análise de expressão gênica diferencial

A qualidade do sequenciamento foi avaliada através de software *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Caudas PoliA/T e adaptadores foram removidos utilizando-se o software *Seqclean* (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>) e apenas bases com qualidade ≥ 20 e *reads* com comprimento ≥ 50 pb foram mantidos para análise posterior. O alinhamento e a análise de expressão diferencial (ED) foram realizadas utilizando-se os softwares *TopHat2/Bowtie2* e *Cufflinks2* como descrito por Trapnell et al. (2012). Resumidamente, o *TOPHAT 2.0.9. (BOWTIE 2.1.0)* foi usado para alinhar cada amostra contra o genoma de referência *Bos taurus* UMD3.1, permitindo dois *mismatches* por *read*. *Cufflinks2* foi aplicado para montar arquivos de anotação para cada amostra com base na anotação de genes/transcritos conhecidos (ENSEMBL V67) bem como nos *reads* que alinharam em outras partes do genoma. Os 16 arquivos de anotação gerados foram então compilados juntamente com a anotação de referência pelo *Cuffmerge*, gerando um arquivo final de anotação que pode representar o transcriptoma de células hepáticas de bovinos Nelore. Os dados de sequenciamento foram mapeados usando o arquivo de anotação compilado e os níveis de expressão dos transcritos foram estimados usando a normalização de fragmentos por kilobases por milhão de *reads* (*Fragments Per Kilobases per Million reads* - FPKM). FPKM é um método de normalização que corrige os dados não apenas para diferenças de tamanho da biblioteca, mas também para o comprimento do gene (MORTAZAVI et al., 2008). Além disso, *Cuffdiff* foi escolhido porque é capaz de identificar os genes que não anotados o que pode levar a resultados interessantes quando se utiliza um genoma sub-espécie diferente (*Bos taurus*) como referência. Transcritos com um valor absoluto de $q < 0,05$ foram considerados como diferencialmente expressos (DE).

3.14. Anotação de novos transcritos diferencialmente expressos

Genes não anotados foram anotados usando-se a ferramenta de análise funcional Blast2GO (CONESA et al., 2005). Em primeiro lugar, as sequências de todos os novos transcritos foram identificadas utilizando-se as coordenadas

no arquivo de anotação gerado pelo *Cuffmerge* e a sequência do genoma de referência (*Bos taurus* UMD3.1). Então a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) foi usada para encontrar sequências semelhantes utilizando os parâmetros padrão do *BLASTX* e valor de e de $1,0 \times 10^{-3}$. O passo subsequente de mapeamento atribuiu termos do *Gene Ontology* (GO) às sequências similares encontradas. Com base nesses resultados, a etapa de anotação foi usada para selecionar termos significativos do GO e atribuí-los aos novos transcritos. Sequências que não retornaram resultados no *BLAST* foram analisados com *InterProScan* (EMBL-EBI) para determinar suas possíveis funções.

3.15. Análise de enriquecimento funcional

Genes conhecidos considerados diferencialmente expressos foram utilizados na análise de enriquecimento funcional no *GeneCodis* (TABAS-MADRID; NOGALES-CADENAS; PASCUAL-MONTANO, 2012). De acordo com Huang, Sherman e Lempicki (2009), os algoritmos de enriquecimento funcional podem ser divididos em: análise de enriquecimento singular, análise de enriquecimento de conjunto de genes e análise de enriquecimento modular. A ferramenta *on-line GeneCodis* foi utilizada para análise de enriquecimento modular integrando informações de diversas bases de dados (GO, KEGG, PubMed, InterPro). A análise de enriquecimento modular pode fornecer resultados interessantes, pois analisa as relações termo-termo que fornecem um significado mais específico do conjunto escolhido de genes e aumentam a qualidade dos resultados, detectando termos significativos adicionais (TABAS-MADRID; NOGALES-CADENAS; PASCUAL-MONTANO, 2012). Valores de significância para cada termo foram obtidos através da análise hipergeométrica e corrigidos pelo método de taxa de falso positivo (*false discovery rate* – FDR). Termos e vias moleculares foram considerados significativos quando o valor p ajustado foi $<0,05$. Outra ferramenta *online*, chamada GOEAST (ZHENG; WANG, 2008), foi utilizada para enriquecimento singular de termos do GO (*Gene Ontology*) por apresentar os resultados em forma gráfica de acordo com a hierarquia e relação entre os termos, facilitando a interpretação dos resultados. Esta ferramenta também calcula valores de significância para cada

termo através de análise hipergeométrica, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$. As mesmas abordagens foram utilizadas para todas as análises enriquecimento neste trabalho.

3.16. Análise de redes de co-expressão gênica

A análise de redes de genes co-expressos foi realizada utilizando o pacote WGCNA (Weighted Correlation Network Analysis) do R (Langfelder e Horvath 2008). Por razões computacionais, as contagens de FPKM resultantes do *Cufflinks* foram primeiramente reduzidas. Como controle de qualidade, foram excluídos genes que apresentam muitos valores faltando (mais de 8 amostras sem contagem) e genes que apresentam média $< 0,5$ e DP $< 0,2$ entre as amostras, já que genes que apresentam baixas contagens são menos confiáveis e genes que variam pouco fornecem informações limitadas numa análise de co-expressão (LABAJ et al., 2011). Além disso, a partir do conjunto resultante de genes, foram selecionados os 3.500 genes mais conectados para análise de co-expressão já que se espera que genes altamente conectados tenham função biológica importante (ZHANG; HORVATH, 2005). A medida de conectividade é calculada pela soma das correlações entre um gene e todos os outros genes na rede. Para estes 3,500 genes selecionados, uma matriz de adjacência foi gerada por meio de correlação de Pearson entre todos os genes, elevada a um expoente β (limiar suave) de 3, escolhido utilizando-se um critério de topologia de escala livre ($R^2 = 0,95$). Em seguida, para definir conjuntos de genes com base em grau de sobreposição de genes compartilhados entre vizinhos, uma medida sobreposição topológica (*topological overlap measure* - TOM) foi calculada e um valor entre 1 e 0 foi atribuído a cada par de genes. Um valor de 1 significa que dois genes compartilham os mesmos vizinhos e um valor de 0 significa que eles não compartilham nenhum vizinho. A matriz TOM foi então usada como entrada para uma clusterização hierárquica, que resulta em um dendrograma, cujos ramos são identificados para o corte em função da sua forma usando um algoritmo de corte dinâmico de árvore (LANGFELDER; ZHANG; HORVATH, 2008). Os módulos que continham pelo menos 30 genes foram identificados e tiveram um nome de cor atribuído. Outras informações

sobre a metodologia e os seus méritos relativos podem ser encontrados em (KADARMIDEEN; WATSON-HAIGH; ANDRONICOS, 2011; ZHANG; HORVATH, 2005).

A fim de escolher módulos biologicamente interessantes para posterior análise, calculamos a correlação de Pearson entre o módulo *eigengene* e as medidas de EA (CAR e CGR). O *eigengene* é o primeiro componente principal de um dado módulo e é uma medida representativa do perfil de expressão gênica do módulo. Um módulo foi escolhido para análise posterior se apresentou correlação entre módulo e característica fenotípica $> 0,4$ para ambos CAR e CGR. Além disso, os genes nos módulos selecionados foram utilizados para análise de enriquecimento funcional apenas se sua conectividade intra-modular no módulo foi $> 0,6$ e a conectividade intra-modular em todos os outros módulos foi $< 0,6$. A medida conectividade intra-modular mede o quão co-expresso um dado gene é com os outros genes dentro do módulo, e também pode ser chamado de filiação ao módulo (FM). A análise enriquecimento funcional foi realizado como descrito anteriormente.

3.17. Detecção de genes reguladores

A fim de detectar genes reguladores para os módulos de genes identificados como relacionados com as características de EA pelo *WGCNA*, usamos o software *Lemon-Tree* (BONNET; CALZONE; MICHOEL, 2014). O *Lemon-Tree* utiliza modelos gráficos probabilísticos para determinar, dentre uma lista de genes pré-selecionados, genes reguladores de módulos de genes co-expressos (MICHOEL et al., 2007; SEGAL et al., 2003). Para isso, os mesmos 3500 genes selecionados como entrada para o *WGCNA* foram utilizados. Os dados de expressão foram centralizados e escalonados para terem média 0 e desvio padrão 1. Então, o algoritmo de clusterização foi executado 10 vezes para gerar vários conjuntos de soluções que foram em seguida combinadas usando o algoritmo de agrupamento difuso para gerar uma única solução final robusta. Para identificar os genes reguladores de cada módulo foi selecionada uma lista de genes a partir dos 3.500 genes de entrada, com base nos seus termos GO correspondentes a "atividade de transdução de sinal", "atividade de quinase" e "atividade de fator de transcrição". Isto gerou

um total de 656 potenciais genes reguladores que foram atribuídos aos nós da árvore hierárquica por regressão logística gerando escores probabilísticos para cada regulador. A significância desses escores probabilísticos foi calculada pelo teste t da média dos reguladores atribuídos por regressão logística com a média dos reguladores atribuídos aleatoriamente.

3.18. Análise de co-expressão diferencial

O objetivo da análise de co-expressão diferencial é descobrir diferenças de conectividade dos genes entre duas sub-redes, uma gerada por dados de expressão dos animais de BEA e outra gerada por dados de expressão dos animais de AEA. O conjunto de genes para esta análise foi selecionado através da combinação dos 2.500 genes mais conectados para cada condição, após o controle de qualidade já descrito anteriormente para co-expressão, gerando um conjunto final de 3.751 genes. Duas sub-redes foram geradas elevando-se as correlações de Pearson entre os genes nos grupos de AEA e BEA aos expoentes $\beta = 20$ e $\beta = 4$, respectivamente. A conectividade (K) na rede completa foi calculada para cada condição e, em seguida, um valor de conectividade diferencial (K_{Diff}) foi atribuído a todos os genes. A K_{Diff} foi calculada primeiramente dividindo-se o valor de conectividade de cada gene pela máxima conectividade da respectiva rede e, em seguida, subtraindo os valores de conectividade dos genes em uma sub-rede dos valores de conectividade do mesmo gene na outra sub-rede.

$$K_{Diff}(i) = K_{BEA}(i) - K_{AEA}(i)$$

Onde i é o *iésimo* gene

O resultado foi uma distribuição normal de valores entre -1 e 1, com valores negativos significando que os genes foram altamente conectados na sub-rede de AEA e pouco conectados na sub-rede de BEA e os valores positivos significando que os genes foram altamente conectados na sub-rede de BEA e pouco conectados na sub-rede de AEA. Genes que apresentam $K_{Diff} > |0,6|$ foram considerados diferencialmente conectados e foram utilizados para análise de enriquecimento funcional como descrito anteriormente. Esses genes tiveram posteriormente sua expressão nas duas condições avaliadas por

teste t para determinadas diferenças nos níveis de expressão. Esta metodologia está em conformidade com (FULLER et al., 2007).

Figura 11 - Resumo das três diferentes abordagens utilizadas na análise dos dados de expressão gênica.

3.19. Análise estatística

Para testar se houve influência de pai sobre a eficiência alimentar dos animais avaliados no confinamento, foi analisado o efeito de touro sobre o CAR e o CGR em delineamento inteiramente casualizado no *software* SAS 9.3. O modelo matemático utilizado foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

onde:

Y_{ij} = observação (CAR) do $j^{\text{ésimo}}$ indivíduo, filho do $i^{\text{ésimo}}$ touro

μ = média geral

T_i = efeito do $i^{\text{ésimo}}$ touro

e_{ij} = erro inerente a cada observação, $\sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$

σ_e^2 = variância residual

As demais análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* GRAPHPAD PRISM 5.0. As características fenotípicas coletadas em todos os 98 animais foram avaliadas em uma análise de correlação de Pearson. As demais medidas, avaliadas apenas nos 40 animais extremos de EA, foram

primeiramente testadas quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e posteriormente, tiveram a diferença entre as médias dos grupos de AEA e de BEA avaliadas por teste t de Student, para dados com distribuição normal, e teste Mann-Whitney-Wilcoxon, para dados não paramétricos, considerando 5% de significância. O mesmo procedimento foi utilizado para testar se houve influência da instalação no consumo, ganho de peso e eficiência alimentar dos animais e se houve diferença significativa de idade, peso inicial, peso final, ingestão, ganho de peso e eficiência alimentar entre os grupos de AEA e de BEA selecionados para avaliação do perfil transcritoômico. Para testar CA, CMS proporcional ao peso médio, nível de colesterol e nível de GGT nos diferentes dias de coleta (0, 14, 28, 42, 56 e 70) foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Fisher com 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da eficiência alimentar

4.1.1. PATERNIDADE DOS ANIMAIS

Primeiramente, foi observado que os 98 animais utilizados neste trabalho são filhos de 16 touros diferentes. A figura 12 mostra a proporção de filhos de cada touro por grupos de AEA, média eficiência alimentar (MEA) e BEA.

Figura 12 - Distribuição dos animais nos grupos de baixa eficiência alimentar (BEA), média eficiência alimentar (MEA) e alta eficiência alimentar (AEA) por pai.

Notou-se que 3 dos touros apresentaram maior número de filhos, sendo o Touro 9 (17 filhos), Touro 10 (20 filhos) e Touro 16 (15 filhos). A distribuição dos filhos desses touros nos grupos de AEA, MEA e BEA podem ser vistas na Figura 13.

Figura 13 - Distribuição dos animais nos grupos de baixa eficiência alimentar (BEA), média eficiência alimentar (MEA) e alta eficiência alimentar (AEA) filhos dos touros 9,10 e 16.

Não houve efeito significativo de touro para as medidas tanto de CAR quanto CGR ($F > 0,05$), representando a EA dos animais.

4.1.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM CONFINAMENTO E CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA

A partir dos dados obtidos no confinamento foi verificado que houve diferença significativa ($p < 0,05$) no peso inicial (PVI) e no peso final (PVF) entre os animais nas baias individuais e nos piquetes coletivos (Tabela 3), porém, não houve diferença no CMS, GMD e nas medidas de eficiência alimentar (CA, CAR, GPR e CGR) entre os dois grupos. Dessa forma, foi considerado que não houve efeito de instalação no desempenho dos animais em confinamento no que tange a eficiência alimentar, objeto deste trabalho.

Tabela 3 - Média dos piquetes coletivos (n=46) e das baias individuais (n=52) e valor significância da diferença entre as médias para as medidas coletadas no confinamento.

	Média piquetes	Média baias	Valor de p
PVI (kg) ^o	409,56 ±33,6	391,10 ±24,7	2,96x10 ⁻³ *
PVF (kg) ^o	542,04 ±45,8	516,31 ±33,9	1,14x10 ⁻³ *
CMS (kg)*	10,86 ±1,4	10,66 ±1,3	0,46
GMD (kg)*	1,87 ±0,4	1,81 ±0,4	0,41
CA*	5,96 ±0,9	6,04 ±0,9	0,67
CAR (kg/dia)*	-0,17 ±0,9	0,15 ±0,39	0,07
GPR (kg/dia)*	0,01 ±0,3	-0,01 ±0,3	0,72
CGR*	0,18 ±1,1	-0,16 ±1,0	0,12

*p<0,05

*Teste t de Student (dados paramétricos)

^oTeste Mann-Whitney-Wilcoxon (dados não-paramétricos)

O peso inicial, peso final, consumo de matéria seca, ganho de peso e medidas de eficiência alimentar de todos os animais podem ser vistos na Tabela 4. Do total de 98 animais, 2 apresentaram ganho de peso extremamente baixo (0,7 e 0,8 kg/dia) e foram retirados das análises.

Tabela 4 - Médias, desvios padrão, valores máximos e valores mínimos das medidas fenotípicas coletadas no confinamento (n=96).

	Média	Máximo	Mínimo
PVI (kg)	400 ±30	328	496
PVF (kg)	528 ±42	424	676
CMS (kg/d)	10,75 ±1,37	13,95	7,30
GMD (kg/d)	1,83 ±0,37	2,93	1,01
CA	6,00 ±0,91	8,90	4,00
CAR (kg/d)	0,00 ±0,88	2,40	-2,01
GPR (kg/d)	0,00 ±0,28	0,79	-0,71
CGR	0,00 ±1,07	2,29	-2,76

Na tabela 5 são demonstrados os valores de correlações entre ganho de peso, consumo e características de EA. Foi possível observar alta correlação inversa entre CA e GMD (-0,77). Além disso, como esperado, não há correlação entre CAR e GMD e entre GPR e CMS. Por outro lado, o CAR apresenta moderada correlação positiva com CMS (0,64), e GPR apresenta alta correlação também positiva com GMD (0,75). CAR e GPR tem moderada correlação inversa (-0,56) e ambos são combinados para calcular CGR.

Encontrou-se alta correlação entre CGR e todas as outras características de EA, sendo maior para CAR (-0,97) do que para GPR (0,72).

Tabela 5 – Avaliação de correlação entre características de consumo, ganho de peso e medidas de eficiência alimentar (n=96).

	PVI	PVF	CMS	GMD	CA	CAR	GPR	CGR
PVI	-	0,73*	0,37*	0,02	0,29*	-0,02	-0,32*	-0,06
PVF		-	0,72*	0,67*	-0,28*	0	0,25*	0,06
CMS			-	0,66*	-0,06	0,64*	0	-0,54*
GMD				-	-0,77*	0	0,75*	0,20
CA					-	0,50*	-0,97*	-0,67*
CAR						-	-0,56*	-0,97*
GPR							-	0,72*
CGR								-

*p<0,05, Correlação de Pearson.

Foram avaliadas as correlações entre peso inicial, final e médio; consumo de matéria seca, ganho de peso e medidas de EA com medidas de ultrassonografia e biometria (Tabela 6). Nota-se que existe moderada correlação entre pesos dos animais e medidas biométricas (0,29 a 0,46). Por outro lado, as medidas biométricas não apresentam correlação com nenhuma medida de eficiência alimentar. Os pesos dos animais também estão moderadamente correlacionados com a AOL tanto inicial (0,34 a 0,36) quanto final, mas não com o ganho no período avaliado. Já a espessura de gordura no *Longissimus dorsi* (músculo cujo corte comercial corresponde ao contrafilé) e no *Biceps femoris* (músculo cujo corte comercial corresponde à picanha), tanto final quanto ganho, apresentam moderada correlação com o CMS (entre 0,29 e 0,33) a espessura de gordura final em ambos os cortes apresenta moderada correlação com CAR e CGR (entre 0,34 e 0,38).

Tabela 6 - Correlação entre características de peso inicial, final e médio; consumo de matéria seca, ganho de peso e medidas de eficiência alimentar com medidas de ultrassonografia de carcaça e biometria (n=96).

	PVI	PVF	PM	PVM	CMS	GMD	EA	CA	CAR	GPR	CGR
AOLi	0,35*	0,34*	0,36*	0,36*	0,16	0,08	-0,02	0,02	-0,05	-0,04	0,03
AOLf	0,28*	0,42*	0,43*	0,43*	0,35*	0,28*	0,09	-0,07	0,05	0,06	-0,03
AOLg	0,00	0,15	0,14	0,14	0,22*	0,21*	0,10	-0,08	0,09	0,09	-0,05
EGSi	0,07	-0,02	0,03	0,03	0,07	-0,13	-0,23*	0,22*	0,19	-0,23*	-0,22*
EGSf	0,12	0,13	0,14	0,14	0,31*	0,05	-0,19	0,16	0,35*	-0,21*	-0,34*
EGSg	0,08	0,16	0,14	0,14	0,29*	0,14	-0,06	0,04	0,26*	-0,08	-0,24*
EGPi	-0,08	-0,12	-0,10	-0,10	0,08	-0,10	-0,18	0,18	0,26*	-0,20*	-0,27*
EGPf	0,05	0,06	0,07	0,07	0,30*	0,06	-0,17	0,15	0,38*	-0,19	-0,37*
EGPg	0,15	0,22*	0,21*	0,21*	0,33*	0,19	-0,03	0,01	0,23*	-0,03	-0,20*
CC	0,37*	0,38*	0,40*	0,40*	0,31*	0,15	-0,07	0,08	0,10	-0,08	-0,10
PC	0,36*	0,35*	0,39*	0,39*	0,28*	0,12	-0,07	0,10	0,09	-0,09	-0,10
LG	0,29*	0,35*	0,30*	0,30*	0,24*	0,23*	0,11	-0,10	0,01	0,09	0,02
AG	0,38*	0,42*	0,46*	0,45*	0,22	0,23*	0,11	-0,10	-0,13	0,11	0,14
CG	0,42*	0,30*	0,35*	0,35*	0,03	0,01	-0,02	0,03	-0,19	-0,03	0,15

*P<0,05, Correlação de Pearson.

4.2. Caracterização dos grupos de alta e baixa eficiência alimentar

Como pode ser visto na Tabela 7, não houve diferença significativa no peso vivo inicial (PVI) e final (PVF) entre os grupos de animais definidos como alta eficiência alimentar (AEA) e baixa eficiência alimentar (BEA), bem como no desempenho de ganho de peso (GMD) no período. Todavia, observa-se diferença significativa ($p<0,05$) no consumo de matéria seca (CMS), sendo maior nos animais de BEA, bem como nas medidas de EA (CA, CAR, GPR e CGR).

Os animais selecionados como extremos de CGR apresentaram valor de p da diferença entre a média dos grupos de AEA e BEA para GMD de 0,06. Se tivessem sido selecionados como extremos de CAR a média da AEA seria $1,81\pm0,5$ e a média da BEA seria $1,77\pm0,2$, com valor de p para diferença entre as médias de 0,73 (teste t de Student).

Tabela 7 - Média dos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) para as medidas de peso vivo inicial e final, ingestão de matéria seca, ganho de peso e medidas de eficiência alimentar; e valor de significância da diferença entre as médias dos grupos.

	Média AEA	Média BEA	Valor de p
PVI (kg) [♦]	403,10 ±35,6	409,50 ±23,0	0,50
PVF (kg) [°]	542,10 ±46,9	533,90 ±25,2	0,47
CMS (kg/d) [♦]	9,99 ±1,3	12,00 ±0,7	1,03x10⁻⁶*
GMD (kg/d) [♦]	1,97 ±0,5	1,76 ±0,2	0,06
CA[♦]	5,22 ±0,8	6,90 ±0,8	2,84x10⁻⁸*
CAR (kg/d) [°]	-1,14 ±0,4	1,24 ±0,5	6,79x10⁻⁸*
GPR (kg/d) [♦]	0,27 ±0,3	-0,29 ±0,2	3,00x10⁻⁹*
CGR[°]	1,40 ±0,4	-1,53 ±0,6	6,77x10⁻⁸*

*p<0,05

[♦]Teste t de Student (dados paramétricos)

[°]Teste Mann-Whitney-Wilcoxon (dados não-paramétricos)

Ao analisar o consumo de matéria seca proporcional ao peso médio (CMSp) em cada período de 14 dias de confinamento nos grupos de AEA e de BEA foi possível notar que os animais menos eficientes apresentaram maior consumo durante todo o período de avaliação em confinamento (Figura 14). Notou-se também que a diferença de consumo entre os grupos começou maior e diminuiu ao longo do tempo. Houve diferença significativa entre os grupos em todos os tempos exceto no dia 70 (p<0,05).

Figura 14 - Gráfico da média de consumo de matéria seca proporcional ao peso médio (CMSp) por período de confinamento nos animais e alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). *p<0,05, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.

Ao observar os valores de conversão alimentar acumulado ao longo do tempo de confinamento nos grupos de AEA e de BEA (Figura 15), percebe-se que os animais mais eficientes têm estatisticamente menor conversão alimentar a partir do dia 28 ($p < 0,05$).

Figura 15 - Média de conversão alimentar (CA) acumulada ao longo do período de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, $n=20$) e de baixa eficiência alimentar (BEA, $n=20$). * $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.

4.3. Ultrassonografia de carcaça

Nas avaliações por ultrassonografia, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos de AEA e de BEA para AOL inicial (AOLi), AOL final (AOLf) e ganho de AOL no período (AOLg), bem como para EGS inicial (EGSi). Porém, foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) para EGS final (EGSf), ganho de EGS no período (EGSg) e EGP inicial (EGPi), final (EGPf) e ganho no período (EGSg); sendo que os animais de BEA apresentaram maior média (Tabela 8).

Tabela 8 - Média dos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) e valor de significância da diferença da média dos grupos para medidas de ultrassonografia de carcaça.

	Média AEA	Média BEA	Valor de p
AOLi (cm ²)	66,81 ±4,9	66,11 ±5,5	0,67
AOLf (cm ²)	83,08 ±6,8	83,94 ±4,4	0,64
AOLg (cm ²)	16,27 ±8,6	17,83 ±4,8	0,48
EGSi (mm)	1,14 ±1,0	1,60 ±1,2	0,16
EGSf (mm)	4,05 ±2,0	5,76 ±1,5	3,5x10⁻³*
EGSg (mm)	2,91 ±2,0	4,16 ±1,4	0,03*
EGPi (mm)	2,64 ±1,5	3,84 ±1,8	0,03*
EGPf (mm)	5,90 ±2,4	8,35 ±2,1	1,4x10⁻³*
EGPg (mm)	3,27 ±2,1	4,51 ±1,6	0,04*

*p<0,05, Teste t de Student (dados paramétricos)

4.4. EPMURAS

Analisando-se as sete características avaliadas no EPMURAS (estrutura corporal, precocidade, musculosidade, umbigo, caracterização racial, aprumo e sexualidade), não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos AEA e BEA para nenhum parâmetro. O mesmo aconteceu para as medidas de biometria (comprimento corporal, altura de garupa, largura de garupa, comprimento de garupa e profundidade de costela).

4.5. Parâmetros séricos

Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os animais de alta e de baixa EA para nenhum dos parâmetros séricos no início do período de confinamento (Tabela 9). Já no dia 70 (final do período experimental), não houve diferença significativa para triglicérides, globulinas, AST, ALT, FA, Albumina e proteína, porém, houve diferença entre os grupos para GGT e colesterol ($p<0,05$).

Tabela 9 - Média de parâmetros séricos nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) nos dias 0 e 70 de confinamento; e valor de significância da diferença entre as médias.

Dia	Parâmetro	Referência [§]	Média AEA	Média BEA	Valor de p
0	Colesterol (mg/dL) [*]	80-120	112,33 ±20,6	122,22 ±25,9	0,1904
	Triglicérides (mg/dL) [°]	0-14	14,51 ±5,6	12,62 ±5,2	0,1675
	Globulinas (g/dL) [°]	3,00-3,48	3,71 ±0,5	3,51 ±0,4	0,1045
	AST (U/L) [°]	78-132	82,25 ±16,9	78,50 ±42,8	0,5606
	ALT (U/L) [°]	11-40	20,25 ±6,8	21,20 ±5,0	0,6058
	GGT (U/L) [*]	6,1-17,4	17,35 ±5,1	18,15 ±4,7	0,6084
	FA (U/L) [°]	0-488	308,25 ±89,4	322,35 ±115,7	0,4818
	Albumina (g/dL) [*]	3,03-3,55	2,78 ±0,2	2,82 ±0,2	0,4793
	Proteína (g/dL) [°]	6,74-7,46	6,49 ±0,5	6,33 ±0,4	0,1894
70	Colesterol (mg/dL)[*]	80-120	123,15 ±26,5	147,45 ±17,7	0,0017*
	Triglicérides (mg/dL) [°]	0-14	11,61 ±4,6	12,63 ±3,4	0,6455
	Globulinas (g/dL) [°]	3,00-3,48	3,41 ±0,4	3,41 ±0,3	0,5074
	AST (U/L) [°]	78-132	86,50 ±12,6	82,30 ±13,7	0,2179
	ALT (U/L) [°]	11-40	29,05 ±5,2	28,45 ±3,5	0,3149
	GGT (U/L)[°]	6,1-17,4	15,25 ±5,2	18,95 ±3,3	0,0150*
	FA (U/L) [*]	0-488	443,30 ±96,8	382,30 ±143,2	0,6560
	Albumina (g/dL) [°]	3,03-3,55	3,03 ±0,2	3,07 ±0,1	0,2284
	Proteína (g/dL) [°]	6,74-7,46	6,44 ±0,4	6,48 ±0,3	0,9892

*p<0,05

[§]KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008

^{*}Teste t de Student (dados paramétricos)

[°]Teste Mann-Whitney-Wilcoxon (dados não-paramétricos)

Para melhor caracterização dos resultados observados para GGT e colesterol obtidos no experimento, realizou-se avaliação do nível de colesterol e GGT ao longo do período completo de experimentação. (Figs. 18 e 19). Para o colesterol, como dito anteriormente, não houve diferença significativa entre os grupos no início do confinamento, porém a partir do dia 14 há diferença significativa em todos os dias de coleta (p<0,05). Já para o GGT não há diferença significativa entre os grupos até o dia 56, havendo diferença significativa apenas no dia 70 (p<0,05), mesmo o grupo BEA tendo sempre médias superiores aos do grupo AEA.

Figura 16 - Nível de colesterol ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). * $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.

Figura 17 - Nível de gama-glutamil transferase (GGT) ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). * $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.

4.6. Características avaliadas no abate e desossa

Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) no peso do fígado dos animais de AEA e de BEA, mas houve diferença significativa para peso de gordura pélvica e peso de gordura renal ($p<0,05$) (Figura 18).

Figura 18 - Peso de gordura pélvica (A) e renal (B) proporcional ao peso final dos animais de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). * $p<0,05$, Teste t de Student (gordura pélvica) e Teste Mann-Whitney-Wilcoxon (gordura renal).

Para as avaliações de carcaça e maciez de carne, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos de AEA e de BEA para maciez, cor e perda por cocção tanto no dia 0 quanto no dia 7 de maturação; rendimento de carcaça, peso de carcaça quente e fria, peso total de músculo, gordura e ossos; e peso de todos os cortes exceto ponta de agulha, que apresentou média de peso maior no grupo de BEA ($25,15 \pm 2,3$ kg) do que no de AEA ($23,72 \pm 1,9$ kg).

4.7. Avaliação de parâmetros ruminais

Nas análises de componentes do líquido ruminal, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) no nível de nitrogênio amoniacal. Já quanto aos diferentes gêneros de protozoários analisados (*Entodinium spp.*, *Diplodinium spp.*, *Epidinium spp.*, *Isotricha spp.* e *Dasytricha spp.*), o único que apresentou diferença significativa entre os grupos foi *Isotricha spp.* ($p<0,05$). Apesar disso,

o grupo de AEA apresentou em média menor contagem de todos os protozoários analisados (Tabela 10).

Tabela 10 – Média de contagem de protozoários nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=20) e valor de significância da diferença entre a média dos grupos.

Protozoário	Média AEA	Média BEA	Valor de p
<i>Entodinium</i>	580.550 ±412.665	586.500 ±437.818	0,3646
<i>Diplodinium</i>	53.400 ±89.290	140.120 ±220.150	0,0761
<i>Epidinium</i>	89.580 ±84.737	136.780 ±165.570	0,7964
<i>Isotricha</i>	18.520 ±17.912	36.480 ±26.785	0,0131*
<i>Dasytricha</i>	480 ±2.147	880 ±3.262	0,5737
Total	626.420±477.367	900.760±555.037	0,1135

*p<0,05, Teste Mann-Whitney-Wilcoxon (dados não-paramétricos)

4.8. Caracterização dos animais de alta e baixa eficiência alimentar selecionados para análise de perfil transcriptômico

Assim como nos grupos de 20 animais de AEA e 20 animais de BEA definidos anteriormente, os dois grupos de 8 animais cada, extremos para cada condição e utilizados para a análise de perfil transcriptômico hepático, não apresentaram diferenças significativas para a idade média, peso no início e peso no final do período de teste e apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) para todas as características de eficiência alimentar (CA, CAR, GPR e CGR). Os grupos também apresentaram diferenças significativas para a CMS, mas não para GMD ($p>0,05$). As medidas e AOL também não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$) e as de espessura de gordura, apresentaram diferença significativa também para EGSf, EGSg, EGPI e EGPIf ($p>0,05$). O efeito de condição (AEA e BEA) em relação tanto ao colesterol quanto ao GGT ao longo do tempo foi significativo ($p<0,05$).

Figura 19 - Nível de colesterol ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=8) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=8). * $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.

Figura 20 - Nível de gama-glutamil transferase (GGT) ao longo dos dias de confinamento nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=20) e de baixa eficiência alimentar (BEA, n=20). * $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste de Fisher.

4.9. Avaliação histopatológica

Todos os 16 fígados apresentaram infiltração mononuclear na tríade portal, principalmente na região periductal (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Fotomicrografia de fígado de bovino. Infiltrado mononuclear periductal (seta). HE, 100X

Figura 22 - Fotomicrografia de fígado de bovino. Infiltrado mononuclear periductal (seta). HE, 400X

Não foram encontradas diferenças significativas ($p=0,1$) para porcentagem de espaços-porta acometidos pelo infiltrado mononuclear entre os grupos de AEA e de BEA (Figura 23).

Figura 23 – Gráfico de dispersão das porcentagens de espaços-porta com infiltrado inflamatório mononuclear nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA) e baixa eficiência alimentar (BEA). Teste Mann-Whitney-Wilcoxon, $p=0,1$.

4.10. Expressão gênica diferencial

A fim de considerar possíveis diferenças no nível de expressão de diferentes isoformas de um mesmo gene a análise da expressão diferencial entre os grupos de AEA e de BEA foi realizada em nível de transcrito e não a nível gene. No total, 76.793 transcritos foram expressos nas amostras de fígado, sendo que 7.635 (ou cerca de 10%) eram transcritos de genes não anotados. Estes transcritos corresponderam a 25.695 genes expressos nos fígados dos animais avaliados. Do total de transcritos, foram identificados 43 transcritos como sendo diferencialmente expressos entre os grupos, 23 correspondendo a transcritos de genes conhecidos, quatro à proteínas não caracterizadas ou pseudogenes e 16 novos transcritos (Tabela 11). Novos transcritos foram identificados com a palavra “transcrito” seguida por um número variando entre 1 a 16. Do total, 22 e 21 transcritos tiveram respectivamente maior e menor expressão no grupo AEA em relação ao BEA.

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre os grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=8) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=8) (continua).

Nome do Gene	Descrição	Locus	AEA FPKM	BEA FPKM	Log2 (AEA/BEA)	Valor de p	Valor de q
Transcrito15	-	X:84490108-84490755	0,23	5,18	-4,51	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
HBB	Hemoglobin, beta	15:49022977-49024619	35,73	4,20	3,09	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
LDB3	LIM domain binding 3	28:41657194-41716580	0,41	3,05	-2,90	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
NEFH	Neurofilament, heavy polypeptide	17:70821077-70828226	0,57	0,09	2,69	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito09	-	26:50545760-50548035	0,25	1,43	-2,52	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
CYP2E1	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	26:50550574-50561259	40,52	227,92	-2,49	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
E1BEQ3	Uncharacterized protein	11:47050710-47051142	4,24	21,27	-2,33	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2	17:3829538-3838136	3,57	14,50	-2,02	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito06	-	19:62251231-62255607	0,29	1,12	-1,97	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito07	-	19:63219641-63220814	2,97	11,62	-1,97	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
TNNC1	Troponin C type 1	22:48988983-48991875	6,72	22,68	-1,76	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
PON1	Paraoxonase 1	4:12389566-12423546	31,70	91,23	-1,52	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
IGFBP1	Insulin-like growth factor binding protein 1	4:76720422-76725322	78,39	27,84	1,49	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
PCDH7	Protocadherin 7	6:51536784-52011900	0,55	1,54	-1,48	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
ENSBTAG00000039664	Novel processed pseudogene	22:49660684-49661474	23,87	9,14	1,39	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	8:90017452-90018996	13,86	34,77	-1,33	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
ENSBTAG00000038430	Novel processed pseudogene	23:34219297-34219825	68,69	170,92	-1,32	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
EBPL	Emopamil binding protein-like	13:54623916-54631595	3,46	8,26	-1,25	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito02	-	11:85515574-85522199	1,40	0,59	1,24	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito10	-	29:44337488-44344995	2,08	4,86	-1,23	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
VNN2	Vanin 2	9:71884617-71916013	3,14	7,34	-1,22	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
NR0B2	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	2:126892478-126895734	6,80	3,03	1,17	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre os grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=8) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=8) (conclusão).

Nome do Gene	Descrição	Locus	AEA FPKM	BEA FPKM	Log2 (AEA/BEA)	Valor de p	Valor de q
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	16:52714626-52715724	115,56	52,59	1,14	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
IFI27	Putative ISG12(a) protein	21:59330011-59336774	124,85	58,91	1,08	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
PGCP	Plasma glutamate carboxypeptidase	14:69287301-69893091	9,19	4,58	1,00	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
CYP7A1	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	14:26347769-26358798	31,07	15,62	0,99	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
ENSBTAG00000047324	Uncharacterized protein	26:16497776-16556279	75,97	38,88	0,97	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito11	-	6:88683219-88688349	2,50	4,87	-0,96	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
SNORD52	Small nucleolar RNA SNORD52	23:27319111-27326331	6,97	3,93	0,83	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito16	-	X:114171050-114171184	8286,62	4672,60	0,83	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
EEF1D	Elongation factor 1-delta	14:2313831-2326722	229,74	130,79	0,81	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	6:90811061-90813079	62,16	107,31	-0,79	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
HEBP2	Heme binding protein 2	9:77215759-77222555	23,91	14,26	0,75	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
RHOB	Ras homolog gene family, member B	11:78464205-78466417	26,68	43,55	-0,71	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
BHMT	Betaine-homocysteine S-methyltransferase	10:10127780-10151271	287,30	179,75	0,68	5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito01	-	1:141225114-141225283	101,03	0,00		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito03	-	11:17094569-17094757	0,00	17,06		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito04	-	12:17656843-17657220	1,33	0,00		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito05	-	14:209016-209718	2,57	0,00		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito08	-	26:10960415-10961177	0,70	0,00		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito12	-	7:37817208-37817409	0,00	9,15		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito13	-	7:108690859-108690980	259,12	0,00		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315
Transcrito14	-	GJ060051.1:1595-1913	1,23	0,00		5,00x10 ⁻⁰⁵	0,0315

Análise estatística realizada de acordo com TRAPNELL et al. (2012) pelo software Cuffdiff.

Curiosamente, considerando todos os transcritos diferencialmente expressos, 17 transcritos são apenas uma das diferentes isoformas expressas do mesmo gene: CYP7A1, EEF1D, ENSBTAG00000038430, ENSBTAG00000047324, HEBP2, IFI27, IGFBP1, ISG15, LDB3, NR0B2, PCDH7, PGCP, PON1, SFRP2, Transcrito 02, Transcrito 01 e VNN2. Por exemplo, o gene LDB3 apresentou 6 isoformas diferentes expressas, mas apenas a isoforma TCONS_00049442 é diferencialmente expressa (Figura 24).

Figura 24 - Isoformas expressas do gene LDB3, em destaque a isoforma TCONS_00049442 expressa diferencialmente entre os grupos de alta e baixa EA.

Os transcritos conhecidos foram usados para enriquecimento funcional. Os genes DE foram enriquecidos na análise modular ($p_{aj} < 0,05$) para ligação de grupo heme (CYP7A1, CYP2E1 e HBB), região extracelular (CPQ, ISG15, PON1, VNN2, SFRP2 e IGFBP1, ENSBTAG00000027513), citocromo P450 (CYP7A1, CYP2E1 e ENSBTAG00000047324), ligação de íon de metal (BHMT, CYP7A1, CYP2E1, CPQ, LDB3 e HBB), ligação de íons de cálcio (PCDH7, PON1 e TNNC1) e atividade de homodimerização de proteína (NR0B2, PON1 e TNNC1). Todos os transcritos sem atribuição de função foram anotados por comparação de suas sequências com banco de dados NCBI, os resultados podem ser vistos na Tabela 12.

Tabela 12 - Anotação dos novos transcritos (continua).

Nome do Gene	Descrição	Comprimento	Hits	Min. valor de e	Similaridade média	GOs ou InterProScan
Transcrito01	<i>line-1 reverse transcriptase-like protein</i>	170	20	$1,28 \times 10^{-12}$	97,00%	-
Transcrito02	<i>membrane protein fam159a isoform x2</i>	152	20	$1,21 \times 10^{-39}$	83,65%	F: ligação iônica; C: componente celular; C: mitocôndria; F: atividade de ATPase; F: atividade transportador transmembrana; P: processo homeostático; C: matriz extracelular; C: membrana plasmática; P: transporte
Transcrito03	-	188	0			-
Transcrito04	<i>bitter taste receptor bota-t2r65a</i>	377	17	$1,02 \times 10^{-31}$	80,24%	P: formação da estrutura anatômica envolvido na morfogênese; P: motilidade celular; F: função molecular; F: atividade transdutora de sinal; P: processo de sistema neurológico; C: espaço extracelular; C: componente celular; F: ligação iônica; P: adesão celular; C: centro organizador de microtúbulos; P: a diferenciação de células; P: locomoção; P: transdução de sinal
Transcrito05	<i>liprin-alpha-1-like isoform x1</i>	233	20	$4,77 \times 10^{-13}$	83,10%	-
Transcrito06	<i>peroxisomal n-acetyl-spermine spermidine oxidase isoform x5</i>	4376	20	$3,01 \times 10^{-18}$	76,10%	F: função molecular; P: processo homeostático; F: atividade transdutora de sinal; P: processo de sistema neurológico; F: atividade de oxidoreductase; C: mitocôndria; C: componente celular; C: peroxisomo; P: processo de biossíntese; P: processo metabólico composto de nitrogênio celular; P: processo catabólico; F: atividade de ATPase; F: atividade transportador transmembrana; F: ligação iônica; P: transdução de sinal; P: transporte
Transcrito07	-	1174	0			Peptídeo de sinal região N, peptídeo de sinal região C, peptídeo de sinal região H, domínio citoplasmático, transmembrana, domínio não citoplasmático, peptídeo de sinal
Transcrito08	-	762	0			-
Transcrito09	<i>craniofacial development protein 2-like</i>	2275	20	$2,97 \times 10^{-76}$	67,10%	C: citoplasma; C: núcleo
Transcrito10	-	8319				

Tabela 12 - Anotação dos novos transcritos (continuação).

Nome do Gene	Descrição	Comprimento	Hits	Min. valor de e	Similaridade média	GOs ou InterProScan
Transcrito11	<i>transcription factor iib 90 kda subunit isoform x1</i>	5130	20	$1,40 \times 10^{-19}$	77,65%	P: formação da estrutura anatômica envolvido na morfogênese; P: motilidade celular; F: função molecular; F: atividade transdutora de sinal; P: processo de sistema neurológico; C: espaço extracelular; F: atividade de oxidoreductase; C: componente celular; C: peroxisomo; P: processo de biossíntese; P: processo metabólico composto de nitrogênio celular; F: ligação iônica; P: adesão celular; P: diferenciação de células; P: processo catabólico; P: locomoção; P: transdução de sinal
Transcrito12	<i>retrovirus-related pol polyprotein line-1</i>	201	20	$1,18 \times 10^{-34}$	98,00%	Transmembrana, domínio citoplasmático, domínio não citoplasmático
Transcrito13	<i>membrane protein fam159a isoform x2</i>	121	12	$2,67 \times 10^{-09}$	84,42%	C: componente celular; C: matriz extracelular proteico; F: ligação iônica; C: membrana plasmática
Transcrito14	<i>PREDICTED: uncharacterized protein LOC101909511 isoform X1</i>	318	1	$3,00 \times 10^{-36}$	98,00%	-
Transcrito15	<i>peroxisomal n-acetyl-spermine spermidine oxidase isoform x5</i>	647	19	$4,22 \times 10^{-11}$	80,11%	P: processo metabólico composto de nitrogênio celular; P: processo homeostático; C: mitocôndria; C: componente celular; P: processo catabólico; F: atividade de ATPase; F: atividade transportador transmembranar; F: ligação iônica; F: atividade de oxidoreductase; P: transporte
Transcrito16	<i>hCG1995175, partial</i>	134	1	$1,73 \times 10^{-01}$	69,00%	Transmembrana, domínio citoplasmático, domínio não citoplasmático
E1BEQ3	<i>40s ribosomal protein s23</i>	432	20	$1,96 \times 10^{-93}$	98,90%	P: tradução; P: processo metabólico composto de nitrogênio celular; P: processo de biossíntese; P: simbiose, mutualismo abrangente através de parasitismo; F: componente estrutural de ribossoma; C: ribossoma; C: citosol; F: função molecular; P: proteína alvo; P: organização da membrana; P: processo catabólico composto contendo nucleobase; P: biogênese do ribossomo

Tabela 12 - Anotação dos novos transcritos (conclusão).

Nome do Gene	Descrição	Comprimento	Hits	Min. valor de e	Similaridade média	GOs ou InterProScan
ENSBTAG00000038430	<i>ferritin light chain</i>	528	20	$8,34 \times 10^{-120}$	97,05%	P: processo homeostático; F: atividade de oxidoreductase; F: ligação iônica; C: complexo de proteínas; C: intracelular; P: transporte; P: processo biológico
ENSBTAG00000039664	<i>heme-binding protein 1</i>	790	20	$2,90 \times 10^{-121}$	94,40%	F: função molecular; C: citosol; C: mitocôndria
ENSBTAG00000047324	<i>cytochrome p450 2c21 isoform x3</i>	1496	20	$2,55 \times 10^{-108}$	95,95%	C: retículo endoplasmático; F: função molecular; F: ligação iônica; F: atividade de oxidoreductase; P: processo biológico

4.11. Co-expressão e genes reguladores

A análise de co-expressão identificou 35 módulos de genes co-expressos e altamente conectados (Figura 25). Espera-se que genes membros do mesmo módulo trabalhem cooperativamente em vias metabólicas relacionadas ou estão sob o controle de um conjunto comum de fator(es) de transcrição. Portanto, analisando a correlação entre os módulos *eigengene* com CAR e CGR, foram identificados dois módulos de genes que poderiam representar mecanismos biológicos envolvidos na eficiência alimentar (Figura 26). Os módulos *Marrom* e *Cinza*, apresentaram correlação positiva com CAR (0,4 e 0,53, respectivamente) e correlação negativa com CGR (-0,41 e -0,48, respectivamente). O módulo *Azul* apresentou valores interessantes de correlação com CAR (0,39) e CGR (-0,41), porém a variância explicada pelo módulo *eigengene* desse módulo (valor que representa a expressão de todos os genes do módulo) foi muito baixo, apenas 36% e, portanto, os valores de correlação não foram considerados confiáveis. A variância explicada pelo módulo *eigengene* dos módulos *Marrom* e *Cinza* foram 57% e 58%, respectivamente.

Figura 25 - Dendrograma de genes e cores dos módulos. O dendrograma é resultado da clusterização hierárquica dos valores de sobreposição topológica entre os genes, os ramos são identificados para o corte em função da sua forma, definindo assim os módulos e atribuindo-lhes cores.

Figura 26 - Correlações entre módulo eigengene e medidas de consumo alimentar residual (CAR) e consumo e ganho residual (CGR). Em destaque, os módulos marrom e cinza que apresentam correlação > 0,4 com ambas as características.

O módulo *Marrom* é composto por 155 genes e a análise modular de enriquecimento funcional mostrou que eles são, em sua maioria, constituintes estruturais de ribossomo e estão envolvidos na tradução de proteínas ($p_{aj} < 0,05$). O enriquecimento funcional singular, além de mostrar resultados significativos para tradução, mostrou também enriquecimento para regulação positiva da proliferação de células T ativadas e regulação positiva de migração de células T.

Tabela 13 - Genes contidos no módulo *Marrom* (continua).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd ^s
RPS5	<i>Ribosomal protein S5</i>	0,4068	0,1179	-0,4093	0,1154	0,9670	1,04x10 ⁻⁰⁹	73,4515
TMSB10	<i>Thymosin beta 10</i>	0,4169	0,1082	-0,4347	0,0925	0,9444	3,80x10 ⁻⁰⁸	69,1681
GNB2	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2</i>	0,4037	0,1210	-0,4128	0,1120	0,9413	5,53x10 ⁻⁰⁸	68,4870
PSMB10	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10</i>	0,4657	0,0691	-0,4527	0,0783	0,9383	7,71x10 ⁻⁰⁸	67,8220
RPS15	<i>Ribosomal protein S15</i>	0,2633	0,3244	-0,2886	0,2783	0,9312	1,63x10 ⁻⁰⁷	67,0940
RPS16	<i>Ribosomal protein S16</i>	0,4802	0,0597	-0,4854	0,0567	0,9261	2,65x10 ⁻⁰⁷	66,4014
FSCN1	<i>Fascin homolog 1, actin-bundling protein</i>	0,3427	0,1939	-0,3430	0,1934	0,9281	2,19x10 ⁻⁰⁷	65,9518
UBA52	<i>Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1</i>	0,2847	0,2852	-0,3015	0,2564	0,9212	4,09x10 ⁻⁰⁷	64,9213
IGFBP7	<i>Insulin-like growth factor binding protein 7</i>	0,0620	0,8195	-0,0675	0,8037	0,9135	7,72x10 ⁻⁰⁷	63,6788
RPL18A	<i>Ribosomal protein l18a</i>	0,4893	0,0544	-0,5119	0,0427	0,9066	1,30x10 ⁻⁰⁶	63,0687
RHOG	<i>Ras homolog gene family, member G (rho G) (RHOG)</i>	0,3521	0,1811	-0,3715	0,1565	0,9127	8,23x10 ⁻⁰⁷	62,8647
RPS28	<i>Ribosomal protein S28</i>	0,2939	0,2692	-0,3096	0,2433	0,9097	1,03x10 ⁻⁰⁶	62,8394
FBL	<i>Fibrillarin</i>	0,2932	0,2704	-0,3360	0,2033	0,9025	1,74x10 ⁻⁰⁶	62,1192
CTSZ	<i>Cathepsin Z</i>	0,2533	0,3439	-0,2725	0,3073	0,8971	2,48x10 ⁻⁰⁶	60,8767
RPL12	<i>60S ribosomal protein L12</i>	0,2922	0,2721	-0,2945	0,2681	0,8938	3,08x10 ⁻⁰⁶	59,9645
RPL12	<i>Ribosomal protein L12</i>	0,2272	0,3973	-0,2245	0,4032	0,8402	4,62x10 ⁻⁰⁵	59,9645
LEPREL1	<i>Leprecan-like 1</i>	0,3615	0,1690	-0,3962	0,1287	0,8865	4,81x10 ⁻⁰⁶	59,0754
SLX1A	<i>SLX1 structure-specific endonuclease subunit homolog A (S. Cerevisiae)</i>	0,2429	0,3647	-0,2648	0,3216	0,8835	5,71x10 ⁻⁰⁶	58,5309
RPS10	<i>Ribosomal protein S10</i>	0,4661	0,0688	-0,4682	0,0674	0,8820	6,20x10 ⁻⁰⁶	58,3804
CFP	<i>Complement factor properdin</i>	0,5339	0,0332	-0,5424	0,0300	0,8816	6,36x10 ⁻⁰⁶	58,0558
RPL18	<i>Ribosomal protein L18</i>	0,3070	0,2474	-0,3350	0,2047	0,8740	9,63x10 ⁻⁰⁶	57,8831
PPP4C	<i>Protein phosphatase 4, catalytic subunit</i>	0,2254	0,4013	-0,2645	0,3222	0,8775	7,98x10 ⁻⁰⁶	57,8321
PTH1R	<i>Parathyroid hormone 1 receptor</i>	0,2036	0,4495	-0,2286	0,3944	0,8755	8,89x10 ⁻⁰⁶	56,9797
DCN	<i>Decorin</i>	0,2257	0,4006	-0,2605	0,3299	0,8708	1,14x10 ⁻⁰⁵	56,5476
COX4I1	<i>Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1</i>	0,2993	0,2601	-0,3219	0,2241	0,8713	1,11x10 ⁻⁰⁵	56,1150

Tabela 13 - Genes contidos no módulo *Marrom* (continuação).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd ^s
IL12RB1	<i>Interleukin 12 receptor, beta 1</i>	0,2569	0,3368	-0,2731	0,3062	0,8721	1,06x10 ⁻⁰⁵	56,0615
RING1	<i>Ring finger protein 1</i>	0,0875	0,7473	-0,1216	0,6537	0,8621	1,75x10 ⁻⁰⁵	55,5744
CHMP2A	<i>Charged multivesicular body protein 2A</i>	0,3477	0,1869	-0,3444	0,1915	0,8593	2,00x10 ⁻⁰⁵	53,7490
RPL28	<i>Ribosomal protein L28</i>	0,5075	0,0448	-0,5232	0,0375	0,8592	2,01x10 ⁻⁰⁵	53,7026
TIMP1	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>	0,1353	0,6172	-0,1725	0,5230	0,8554	2,4x10 ⁻⁰⁵	53,5333
FOXS1	<i>Forkhead box S1</i>	0,3513	0,1822	-0,3475	0,1873	0,8585	2,07x10 ⁻⁰⁵	52,7797
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kda gelatinase, 72kda type IV collagenase)</i>	0,1071	0,6931	-0,1283	0,6359	0,8473	3,43x10 ⁻⁰⁵	52,6847
RAMP2	<i>Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 2</i>	0,5294	0,0350	-0,5551	0,0256	0,8526	2,72x10 ⁻⁰⁵	52,2533
PYCARD	<i>PYD and CARD domain containing</i>	0,4046	0,1201	-0,3814	0,1450	0,8428	4,15x10 ⁻⁰⁵	51,8556
RPL23A	<i>Ribosomal protein l23a</i>	0,3019	0,2558	-0,3150	0,2347	0,8421	4,28x10 ⁻⁰⁵	51,6198
SCYL1	<i>SCY1-like 1 (S. Cerevisiae)</i>	0,1961	0,4667	-0,2121	0,4303	0,8473	3,44x10 ⁻⁰⁵	51,5981
PAM	<i>Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase</i>	0,3435	0,1927	-0,3333	0,2071	0,8445	3,88x10 ⁻⁰⁵	51,2741
WDR6	<i>WD repeat domain 6</i>	0,4191	0,1061	-0,3971	0,1278	0,8411	4,46x10 ⁻⁰⁵	50,4387
RPL37	<i>Ribosomal protein L37</i>	0,4562	0,0757	-0,4336	0,0934	0,8282	0,0001	50,0413
RPLP2	<i>Ribosomal protein, large, P2</i>	0,1008	0,7104	-0,1360	0,6156	0,8321	0,0001	49,5377
RPS3	<i>Ribosomal protein S3</i>	0,3147	0,2351	-0,3296	0,2125	0,8206	0,0001	49,5325
FRZB	<i>Frizzled-related protein</i>	0,2508	0,3488	-0,2770	0,2989	0,8264	0,0001	48,4297
SLC5A12	<i>Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12</i>	0,2700	0,3118	-0,3005	0,2582	0,8215	0,0001	48,2655
ENSBTAG00000039456	<i>Uncharacterized protein</i>	0,4020	0,1227	-0,4115	0,1133	0,8141	0,0001	48,2168
VARS	<i>Valyl-trna synthetase</i>	0,4184	0,1068	-0,4478	0,0820	0,8209	0,0001	47,8305
TMED1	<i>Transmembrane emp24 protein transport domain containing 1</i>	0,2597	0,3314	-0,2392	0,3723	0,8239	0,0001	47,8301
EEF1G	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma</i>	0,5003	0,0484	-0,5035	0,0468	0,8099	0,0001	47,5790
H2AFZ	<i>H2A histone family, member Z</i>	0,3177	0,2305	-0,3131	0,2377	0,8115	0,0001	47,5257
MANSC1	<i>MANSC domain containing 1</i>	0,2532	0,3441	-0,2698	0,3123	0,8238	0,0001	47,4329
TBX21	<i>T-box 21</i>	0,1884	0,4848	-0,1838	0,4956	0,8229	0,0001	47,2765

Tabela 13 - Genes contidos no módulo *Marrom* (continuação).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd ^s
ABRACL	<i>ABRA C-terminal like</i>	0,0332	0,9027	-0,0696	0,7979	0,8122	0,0001	47,1095
REM1	<i>RAS (RAD and GEM)-like GTP-binding 1</i>	0,5513	0,0269	-0,5789	0,0188	0,8167	0,0001	46,8675
NID2	<i>Nidogen 2 (osteonidogen)</i>	0,2843	0,2859	-0,3012	0,2569	0,8097	0,0001	46,6958
EIF3K	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K</i>	0,3266	0,2170	-0,3775	0,1494	0,8075	0,0002	46,6074
IER2	<i>Immediate early response 2</i>	0,2775	0,2980	-0,3233	0,2220	0,8113	0,0001	46,1682
SERPINB8	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8</i>	0,3879	0,1377	-0,3884	0,1371	0,7968	0,0002	45,2533
CCDC71	<i>Coiled-coil domain containing 71</i>	0,2343	0,3825	-0,2029	0,4512	0,8111	0,0001	45,1551
ANXA2	<i>Annexin A2</i>	0,3659	0,1634	-0,3902	0,1352	0,7961	0,0002	45,1399
CHST14	<i>Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 14</i>	0,1912	0,4780	-0,1852	0,4924	0,8005	0,0002	44,8718
AIF1	<i>Allograft inflammatory factor 1</i>	0,4035	0,1212	-0,3990	0,1258	0,7928	0,0002	44,7418
TFPT	<i>TCF3 (E2A) fusion partner (in childhood Leukemia)</i>	0,4813	0,0591	-0,4588	0,0739	0,8018	0,0002	44,6767
DNLZ	<i>DNL-type zinc finger</i>	0,3696	0,1589	-0,3462	0,1890	0,7994	0,0002	44,5415
STXBP2	<i>Syntaxin binding protein 2</i>	0,2704	0,3111	-0,2970	0,2639	0,7883	0,0003	44,2806
CD8A	<i>CD8a molecule</i>	0,4471	0,0825	-0,3972	0,1276	0,7968	0,0002	43,9063
ARPC5L	<i>Actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like</i>	0,2494	0,3516	-0,2783	0,2967	0,7929	0,0002	43,8909
RBM4	<i>RNA binding motif protein 4</i>	0,0843	0,7561	-0,0870	0,7487	0,7885	0,0003	43,8192
RPL29	<i>Ribosomal protein L29</i>	0,3341	0,2060	-0,3353	0,2043	0,7861	0,0003	43,7727
RANBP1	<i>RAN binding protein 1</i>	0,3319	0,2092	-0,3316	0,2096	0,7847	0,0003	43,0685
PAXIP1	<i>PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1</i>	0,2032	0,4503	-0,2180	0,4174	0,7830	0,0003	42,5443
ZNHIT2	<i>Zinc finger, HIT-type containing 2</i>	0,4189	0,1064	-0,3759	0,1513	0,7901	0,0003	42,4361
SH2D3C	<i>SH2 domain containing 3C</i>	0,3613	0,1692	-0,3648	0,1647	0,7793	0,0004	42,1139
PFKFB1	<i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1</i>	0,3632	0,1667	-0,3843	0,1417	0,7772	0,0004	42,0584
IL1B	<i>Interleukin 1, beta</i>	0,2891	0,2774	-0,2874	0,2805	0,7692	0,0005	41,4857
INO80E	<i>INO80 complex subunit E</i>	0,1608	0,5519	-0,1450	0,5921	0,7792	0,0004	41,0788
U2AF1L4	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4</i>	-0,0098	0,9712	-0,0122	0,9643	0,7653	0,0006	40,9766

Tabela 13 - Genes contidos no módulo *Marrom* (continuação).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd ^s
PLAC8	<i>Placenta-specific 8</i>	0,4976	0,0498	-0,4658	0,0690	0,7684	0,0005	40,8488
SH3BGR	<i>SH3 domain binding glutamate-rich protein</i>	0,2571	0,3364	-0,2806	0,2924	0,7665	0,0005	40,8051
CCDC3	<i>Coiled-coil domain containing 3</i>	0,1057	0,6968	-0,0991	0,7149	0,7715	0,0005	40,4768
ASF1B	<i>ASF1 anti-silencing function 1 homolog B</i>	0,3708	0,1574	-0,3471	0,1878	0,7640	0,0006	40,3205
TUBGCP2	<i>Tubulin, gamma complex associated protein 2</i>	0,2228	0,4068	-0,2336	0,3840	0,7606	0,0006	39,9352
GJA1	<i>Gap junction protein, alpha 1, 43kda</i>	-0,0272	0,9204	0,0288	0,9156	0,7683	0,0005	39,9249
CRYBB1	<i>Crystallin, beta B1</i>	0,4276	0,0985	-0,4338	0,0932	0,7591	0,0006	39,8564
EHD2	<i>EH-domain containing 2</i>	0,4424	0,0862	-0,4415	0,0869	0,7571	0,0007	39,7461
RPLP0	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>	0,5657	0,0224	-0,5654	0,0225	0,7457	0,0009	39,7340
CD7	<i>CD7 molecule</i>	0,2091	0,4371	-0,2354	0,3800	0,7493	0,0008	39,7074
LPCAT4	<i>Lysophosphatidylcholine acyltransferase 4</i>	0,2253	0,4014	-0,2743	0,3038	0,7488	0,0008	39,0048
RPS13	<i>Ribosomal protein S13</i>	0,3609	0,1697	-0,3722	0,1557	0,7382	0,0011	38,6884
ENSBTAG00000032432	<i>Uncharacterized protein</i>	0,2825	0,2890	-0,2911	0,2740	0,7394	0,0011	38,4802
RPS15A	<i>Ribosomal protein S15A</i>	0,2620	0,3269	-0,2921	0,2723	0,7361	0,0012	38,4431
THBS1	<i>Thrombospondin 1 (THBS1)</i>	0,3648	0,1648	-0,3746	0,1529	0,7596	0,0006	38,3897
SCTR	<i>Secretin receptor</i>	0,1431	0,5971	-0,1637	0,5448	0,7527	0,0008	38,2465
RMI2	<i>RMI2, recq mediated genome instability 2, homolog (S. Cerevisiae)</i>	0,1589	0,5566	-0,1758	0,5148	0,7305	0,0013	36,9871
CCDC85B	<i>Coiled-coil domain containing 85B</i>	0,2284	0,3948	-0,2174	0,4187	0,7386	0,0011	36,9376
DYNC1H1	<i>Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1</i>	0,0608	0,8229	-0,0826	0,7610	0,7263	0,0014	36,7020
NENF	<i>Neudesin neurotrophic factor</i>	0,0568	0,8344	-0,0315	0,9078	0,7448	0,0009	36,6873
RPS11	<i>Ribosomal protein S11</i>	0,1143	0,6733	-0,1394	0,6067	0,7218	0,0016	36,5690
NPPC	<i>Natriuretic peptide C</i>	0,4655	0,0692	-0,4554	0,0763	0,7414	0,0010	36,5082
DRAP1	<i>DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)</i>	0,0156	0,9542	-0,0309	0,9097	0,7444	0,0009	36,3701
FAM181B	<i>Family with sequence similarity 181, member B</i>	0,1244	0,6461	-0,1281	0,6363	0,7362	0,0011	36,3639
AP2S1	<i>Adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit</i>	0,2129	0,4285	-0,2205	0,4118	0,7328	0,0012	36,0651

Tabela 13 - Genes contidos no módulo *Marrom* (continuação).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd ^s
MMP19	<i>Matrix metalloproteinase 19</i>	0,4394	0,0886	-0,4436	0,0853	0,7367	0,0011	35,9848
CD97	<i>CD97 molecule</i>	0,4611	0,0722	-0,4588	0,0739	0,7296	0,0013	35,8178
RHOD	<i>Ras homolog gene family, member D</i>	-0,0350	0,8975	0,0582	0,8305	0,7341	0,0012	35,6811
RPL24	<i>Ribosomal protein L24</i>	0,1391	0,6074	-0,1357	0,6164	0,7134	0,0019	35,5817
PTTG1	<i>Pituitary tumor-transforming 1</i>	0,4213	0,1042	-0,3912	0,1341	0,7233	0,0015	35,4594
C1QA	<i>Complement component 1, q subcomponent, A chain</i>	0,3745	0,1530	-0,3700	0,1583	0,7307	0,0013	35,3953
RHNO1	<i>Chromosome 5 open reading frame, human c12orf32</i>	0,5116	0,0428	-0,5413	0,0304	0,7315	0,0013	35,2401
C10H15ORF23	<i>Chromosome 10 open reading frame, human c15orf23</i>	0,3107	0,2415	-0,3228	0,2227	0,7177	0,0017	35,1238
VAC14	<i>Vac14 homolog (S. Cerevisiae)</i>	0,4522	0,0786	-0,4670	0,0682	0,7280	0,0014	35,0720
NELFE	<i>RD RNA binding protein</i>	0,2962	0,2653	-0,3122	0,2391	0,7106	0,0020	34,5231
SNAI2	<i>Snail homolog 2 (Drosophila)</i>	0,3184	0,2295	-0,3456	0,1899	0,7170	0,0018	34,3032
EIF3F	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F</i>	0,5395	0,0310	-0,5335	0,0333	0,7113	0,0020	33,3520
CCL14	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 14</i>	0,4802	0,0598	-0,4749	0,0630	0,7185	0,0017	33,3344
CLDN5	<i>Claudin 5</i>	0,5632	0,0231	-0,5580	0,0247	0,7038	0,0023	33,2037
RPS19	<i>Ribosomal protein S19</i>	0,3220	0,2239	-0,3646	0,1650	0,7088	0,0021	33,1744
IFRD2	<i>Interferon-related developmental regulator 2</i>	0,0493	0,8560	-0,0396	0,8841	0,7029	0,0024	32,8860
RRAS	<i>Related RAS viral (r-ras) oncogene homolog</i>	0,3231	0,2222	-0,3135	0,2370	0,7057	0,0023	32,7689
GNB2L1	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, N-terminally processed</i>	0,5606	0,0239	-0,5830	0,0178	0,6946	0,0028	32,5294
PPWD1	<i>Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1</i>	0,2683	0,3149	-0,2523	0,3459	0,7061	0,0022	32,2461
NAIF1	<i>Nuclear apoptosis inducing factor 1</i>	0,2249	0,4023	-0,2647	0,3219	0,6961	0,0027	31,6876
NAA10	<i>N-alpha-acetyltransferase 10</i>	0,3774	0,1495	-0,4048	0,1199	0,6931	0,0029	31,6521
ZMYND8	<i>Zinc finger, MYND-type containing 8</i>	0,3723	0,1556	-0,4086	0,1161	0,6935	0,0029	31,6342
TSPAN7	<i>Tetraspanin 7</i>	0,2051	0,4461	-0,2086	0,4381	0,6902	0,0031	31,3896
TFPI2	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>	0,5301	0,0347	-0,5455	0,0288	0,6933	0,0029	31,2205
HGS	<i>Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>	0,1164	0,6677	-0,1374	0,6118	0,6829	0,0035	30,7920

Tabela 13 - Genes contidos no módulo *Marrom* (continuação).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd ^s
TMC4	<i>Transmembrane channel-like 4</i>	0,2171	0,4193	-0,2223	0,4079	0,6753	0,0041	30,4703
CDKN2D	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)</i>	0,1021	0,7067	-0,1377	0,6111	0,6753	0,0041	30,3033
PYCR2	<i>Pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2</i>	0,5917	0,0158	-0,5835	0,0177	0,6817	0,0036	30,2734
PRELP	<i>Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>	0,0880	0,7459	-0,0983	0,7173	0,6709	0,0044	30,2573
ENSBTAG00000047265	<i>Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B</i>	0,3577	0,1738	-0,3505	0,1832	0,6744	0,0042	30,2393
ARMCX2	<i>Armadillo repeat containing, X-linked 2</i>	0,3948	0,1302	-0,3811	0,1452	0,6807	0,0037	30,2087
AVEN	<i>Apoptosis, caspase activation inhibitor</i>	0,3185	0,2292	-0,3257	0,2184	0,6718	0,0044	29,8304
TRMT61A	<i>Trna methyltransferase 61 homolog A (S. Cerevisiae)</i>	0,6891	0,0032	-0,6800	0,0038	0,6787	0,0038	29,3237
ENSBTAG00000047323	<i>Oncoprotein-induced transcript 3 protein precursor</i>	0,4069	0,1177	-0,4026	0,1221	0,6783	0,0039	29,3079
MRPL36	<i>Mitochondrial ribosomal protein L36</i>	0,6335	0,0084	-0,5950	0,0151	0,6704	0,0045	29,1461
SMTN	<i>Smoothelin</i>	0,0451	0,8683	-0,0966	0,7220	0,6695	0,0046	29,0389
MYEOV2	<i>Myeloma overexpressed 2</i>	0,0621	0,8194	-0,0616	0,8207	0,6648	0,0050	29,0107
KPNA2	<i>Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1</i>	0,2896	0,2766	-0,2813	0,2912	0,6636	0,0051	28,8854
FBXW5	<i>F-box and WD repeat domain containing 5</i>	0,3396	0,1982	-0,3211	0,2253	0,6710	0,0044	28,6233
PRDM11	<i>PR domain containing 11</i>	0,0216	0,9368	-0,0212	0,9380	0,6556	0,0058	28,2141
TMED3	<i>Transmembrane emp24 protein transport domain containing 3</i>	0,5306	0,0345	-0,5547	0,0257	0,6619	0,0052	27,9188
AIMP2	<i>Aminoacyl trna synthetase complex-interacting multifunctional protein 2</i>	0,4293	0,0970	-0,4107	0,1141	0,6530	0,0061	27,8973
SUPT6H	<i>Suppressor of Ty 6 homolog (S. Cerevisiae)</i>	0,4885	0,0549	-0,4891	0,0545	0,6670	0,0048	27,7415
ENSBTAG00000014857	<i>Uncharacterized protein</i>	0,6235	0,0099	-0,5902	0,0161	0,6586	0,0055	27,2590
SRPX	<i>Sushi-repeat containing protein, X-linked</i>	0,1903	0,4801	-0,2227	0,4072	0,6621	0,0052	27,2588
ARF5	<i>ADP-ribosylation factor 5</i>	0,4680	0,0675	-0,4464	0,0830	0,6585	0,0055	26,7877
NOP58	<i>NOP58 ribonucleoprotein</i>	0,1136	0,6753	-0,1371	0,6126	0,6367	0,0080	26,7673
RGS2	<i>Regulator of G-protein signaling 2, 24kda</i>	0,1770	0,5119	-0,1791	0,5069	0,6380	0,0078	26,4942
RSAD1	<i>Radical S-adenosyl methionine domain containing 1</i>	0,0821	0,7626	-0,1076	0,6916	0,6395	0,0076	26,0821
TUBB4B	<i>Tubulin, beta 2C</i>	0,3794	0,1473	-0,3495	0,1845	0,6218	0,0101	25,6656

Tabela 13 - Genes contidos no módulo *Marrom* (conclusão).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd [§]
MRPL52	<i>Mitochondrial ribosomal protein L52</i>	0,1367	0,6137	-0,1782	0,5090	0,6435	0,0072	25,0619
TOM40B	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast)-like</i>	0,4357	0,0916	-0,4637	0,0705	0,6345	0,0083	24,5325
APLNR	<i>Apelin receptor</i>	0,5139	0,0417	-0,5053	0,0459	0,6074	0,0126	24,1136
FXVD6	<i>FXVD domain containing ion transport regulator 6</i>	0,0515	0,8496	-0,0288	0,9156	0,6287	0,0091	23,9000
PGAP3	<i>Post-GPI attachment to proteins 3</i>	0,3925	0,1326	-0,4164	0,1086	0,6318	0,0087	23,8044

[§]Kd = Conectividade dentro do módulo

Módulo Marrom

Figura 27 - Módulo Marrom. Os nódulos representam os genes e os vértices o valor de correlação entre genes. Para facilitar a visualização, valores baixos de correlação não foram representados na figura. O valor de conectividade dentro do módulo é calculado pela soma das correlações entre um gene e todos os demais genes da rede.

Figura 28 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes do módulo *Marrom*. As figuras 29 e 30 mostram respectivamente as regiões A e B destacadas nessa figura.

Figura 29 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes do módulo *Marrom* (região A). Pode-se ressaltar o enriquecimento para tradução (*translation*).

Figura 30 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes do módulo Marrom (região B). Pode-se ressaltar o enriquecimento para regulação positiva da proliferação de células T ativadas (*positive regulation of activated T cell proliferation*) e regulação positiva de migração de células T (*positive regulation of T cell migration*).

O módulo *Cinza* é formado por 34 genes e não apresentou resultados significativos na análise de enriquecimento tanto modular quanto singular ($p_{aj} > 0,05$).

Tabela 14 - Genes contidos no módulo *Cinza* (continua).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd ^s
HPCAL1	<i>Hippocalcin-like 1</i>	0,5410	0,0305	-0,4922	0,0528	0,9474	$2,61 \times 10^{-8}$	25,9659
ENSBTAG00000008021	<i>Uncharacterized protein</i>	0,5103	0,0434	-0,4581	0,0743	0,9244	$3,08 \times 10^{-7}$	24,4274
S100A11	<i>Protein S100-A11</i>	0,6192	0,0105	-0,5857	0,0171	0,9284	$2,14 \times 10^{-7}$	24,3709
ARHGEF3	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3</i>	0,5998	0,0141	-0,5569	0,0250	0,8924	$3,36 \times 10^{-6}$	21,8779
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>	0,4534	0,0778	-0,4280	0,0981	0,8876	$4,50 \times 10^{-6}$	21,7994
RTEL	<i>Uncharacterized protein</i>	0,4461	0,0833	-0,4137	0,1112	0,8844	$5,43 \times 10^{-6}$	21,4346
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	0,3828	0,1433	-0,3509	0,1827	0,8558	$2,35 \times 10^{-5}$	19,8593
TSCOT	<i>Solute carrier family 46, member 2</i>	0,3038	0,2526	-0,2864	0,2822	0,8506	$2,96 \times 10^{-5}$	19,2039
HTRA1	<i>HtrA serine peptidase 1</i>	0,4851	0,0568	-0,4646	0,0698	0,8377	0,0001	18,7263
NR2F1	<i>Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1</i>	0,4362	0,0912	-0,4006	0,1241	0,8363	0,0001	18,6361
PLOD2	<i>Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2</i>	0,3851	0,1408	-0,3344	0,2055	0,8380	0,0001	18,6142
IDO1	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>	0,3022	0,2553	-0,2489	0,3526	0,8371	0,0001	18,4144
TMEM204	<i>Ttransmembrane protein 204</i>	0,7074	0,0022	-0,6622	0,0052	0,8282	0,0001	18,4043
VPS52	<i>Vacuolar protein sorting 52 homolog (S. cerevisiae)</i>	0,5883	0,0165	-0,5318	0,0340	0,8321	0,0001	17,9822
TUBA1B	<i>Tubulin, alpha 1b</i>	0,3847	0,1412	-0,3444	0,1914	0,8220	0,0001	17,7578
IGBP1	<i>Iimmunoglobulin (CD79A) binding protein 1-like</i>	0,5974	0,0145	-0,5617	0,0236	0,8191	0,0001	17,6648
MKS1	<i>Meckel syndrome type 1 protein</i>	0,3601	0,1706	-0,3206	0,2260	0,8052	0,0002	16,5623
PRPF6	<i>PRP6 pre-mRNA processing factor 6 homolog (S. cerevisiae)</i>	0,5351	0,0327	-0,4726	0,0645	0,7833	0,0003	16,1890
ZYX	<i>Zyxin</i>	0,5976	0,0145	-0,5780	0,0190	0,7893	0,0003	16,0769
TAP1	<i>Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)</i>	0,3782	0,1486	-0,3365	0,2025	0,7884	0,0003	15,5745
BAG3	<i>BCL2-associated athanogene 3</i>	0,3829	0,1432	-0,3536	0,1791	0,7690	0,0005	14,9613

Tabela 14 – Genes contidos no módulo *Cinza* (conclusão).

Gene	Descrição	SG CAR	Valor de p SG CAR	SG CGR	Valor de p SG CGR	FM	Valor de p FM	Kd [§]
PTGS1	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	0,3214	0,2248	-0,2846	0,2854	0,7435	0,0010	13,7598
SYNGR1	<i>Synaptogyrin 1</i>	0,2612	0,3285	-0,2470	0,3564	0,7467	0,0009	13,7547
IL18BP	<i>Interleukin 18 binding protein</i>	0,4901	0,0539	-0,4653	0,0693	0,7294	0,0013	13,1913
BTG3	<i>BTG family, member 3</i>	0,1327	0,6242	-0,1169	0,6663	0,7245	0,0015	12,9105
SF3B1	<i>Splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa</i>	0,5231	0,0376	-0,4709	0,0656	0,7194	0,0017	12,7880
EPS8L2	<i>EPS8-like 2</i>	0,3102	0,2423	-0,2630	0,3250	0,7342	0,0012	12,7762
RHOB	<i>Ras homolog gene family, member B</i>	0,6670	0,0048	-0,6982	0,0026	0,7249	0,0015	12,6794
SNRNP200	<i>Small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)</i>	0,3357	0,2036	-0,3163	0,2327	0,6909	0,0030	11,3364
SLC2A6	<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6</i>	0,3528	0,1801	-0,3118	0,2397	0,6929	0,0029	11,1927

[§]Kd = Conectividade dentro do módulo

Módulo Cinza

Figura 31 - Módulo Cinza. Os nós representam os genes e os vértices o valor de correlação entre genes. Para facilitar a visualização, valores baixos de correlação não foram representados na figura.

Genes candidatos como centrais no metabolismo hepático associado à EA nos módulos *Marrom* e *Cinza* foram selecionados com base nas medidas de significância do gene (SG) e de filiação ao módulo (FM, Tabela 15). A medida de SG é calculada por teste de correlação (Pearson) entre o valor de expressão dos genes e a característica fenotípica e é uma indicação da importância biológica do gene para a eficiência alimentar. Por outro lado, FM é calculada por teste de correlação (Pearson) entre o valor de expressão dos genes e o módulo *eigengene* e também é uma indicação de genes importantes para a característica já que valores elevados de FM tendem a indicar genes altamente conectados e centrais nos módulos. No total, 13 genes foram significativos para SG (para CAR ou CGR) e apresentaram valores de FM > 0,8 indicando uma forte filiação aos módulos.

Tabela 15 - Genes candidatos como centrais no metabolismo hepático associado à eficiência alimentar.

Nome do gene	Cor do Módulo	SG CGR	Valor de p da SG CGR	SG CAR	Valor de p da SG CAR	FM	Valor de P da FM
HPCAL1	Cinza	-0,492	0,053	0,541	0,030	0,947	2,61X10 ⁻⁰⁸
S100A11	Cinza	-0,586	0,017	0,619	0,011	0,928	2,14X10 ⁻⁰⁷
ENSBTAG00000008021	Cinza	-0,458	0,074	0,510	0,043	0,924	3,08X10 ⁻⁰⁷
ARHGEF3	Cinza	-0,557	0,025	0,600	0,014	0,892	3,36X10 ⁻⁰⁶
VPS52	Cinza	-0,532	0,034	0,588	0,016	0,832	6,38X10 ⁻⁰⁵
TMEM204	Cinza	-0,662	0,005	0,662	0,005	0,828	7,43X10 ⁻⁰⁵
IGBP1	Cinza	-0,562	0,024	0,597	0,014	0,819	1,04X10 ⁻⁰⁴
RPL18A	Marrom	-0,512	0,043	0,489	0,054	0,907	1,30X10 ⁻⁰⁶
CFP	Marrom	-0,542	0,030	0,534	0,033	0,882	6,36X10 ⁻⁰⁶
RPL28	Marrom	-0,523	0,038	0,507	0,044	0,859	2,01X10 ⁻⁰⁵
RAMP2	Marrom	-0,555	0,026	0,529	0,035	0,853	2,72X10 ⁻⁰⁵
REM1	Marrom	-0,579	0,019	0,551	0,026	0,817	1,13X10 ⁻⁰⁴
EEF1G	Marrom	-0,504	0,047	0,500	0,048	0,810	1,43X10 ⁻⁰⁴

4.12. Genes reguladores

A fim de identificar genes reguladores para EA usamos software *Lemon-Tree* que gerou 110 clusters de genes co-expressos e atribuiu genes reguladores a eles. Dois clusters se sobrepuseram parcialmente aos módulos *Marrom* e *Cinza* previamente identificados. O Cluster 5 apresentou 24 genes, todos eles também pertencentes ao módulo *Marrom* (*WGCNA*) e 2 reguladores foram atribuídos a este cluster, *FOXS1* e *RAMP3*. Da mesma forma, o Cluster 12 apresentou 25 genes, 24 deles também pertencentes ao módulo *Cinza* (*WGCNA*) e 3 reguladores foram atribuídos a este cluster, *ZNF274*, *HPCAL1* e *HTRA2*. Testamos a diferença de nível de expressão entre os reguladores nas duas condições e os genes *RAMP3* e *HPCAL1* mostraram resultados significativos ($p < 0,05$).

Figura 32 - Expressão gênica (FPKM) dos genes reguladores nos grupos de alta eficiência alimentar (AEA, n=8) e baixa eficiência alimentar (BEA, n=8). * $p < 0,05$, teste t de Student (dados paramétricos).

4.13. Co-expressão diferencial

Na análise de co-expressão diferencial foi possível identificar 400 genes diferencialmente conectados ($|K_{diff}| > 0,60$). Desses, 394 genes estavam altamente conectados na AEA e pouco conectados na BEA e 6 genes estavam altamente conectados na BEA e pouco conectados para AEA. O enriquecimento modular resultou em muitos termos relacionados aos genes

diferencialmente co-expressos que estão representados na figura 33. Já o enriquecimento singular mostrou de maneira mais clara as funções relacionadas a esses genes, que envolvem resposta celular à moléculas de origem bacteriana, resposta inflamatória, resposta de imunidade inata, processamento de antígeno e apresentação de peptídeo via MHC de classe 1, regulação negativa do armazenamento de lipídeos, regulação positiva de processo metabólico de triglicerídeos, regulação positiva de processos do sistema imune, regulação da produção de citocinas e ativação de integrinas (Figuras 34-37).

nucleotide binding (MF) ATP binding (MF) Toll-like receptor signaling pathway immune response (BP)
 IPR001811 **sequence-specific DNA binding transcription factor activity**
 (MF) Cytosolic DNA-sensing pathway Phagosome protein dimerization activity (MF) IPR000276 binding (MF) zinc
 ion binding (MF) IPR007110 **sequence-specific DNA binding (MF)** IPR003597
 Chemokine signaling pathway DNA binding (MF) negative regulation of cell proliferation (BP) receptor activity (MF)
 IPR017452 chemokine activity (MF) metal ion binding (MF) inflammatory response (BP) cell cycle (BP) Osteoclast
 differentiation Cytokine-cytokine receptor interaction IPR004827 IPR003599 Focal adhesion Rheumatoid
 arthritis **hydrolase activity (MF)**

Figura 33 – Enriquecimento modular dos genes diferencialmente co-expressos entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar.

Figura 34 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar. As figuras 31, 32 e 33 mostram respectivamente as regiões A, B e C destacadas nessa figura.

Figura 35 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar, região A. Pode-se destacar “resposta celular à moléculas de origem bacteriana”, “resposta inflamatória”, “resposta de imunidade inata” e “processamento de antígeno e apresentação de peptídeo via MHC de classe 1”.

Figura 36 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar, região B. Pode-se destacar “regulação negativa do armazenamento de lipídeos”, “regulação positiva de processo metabólico de triglicerídeos” e “regulação positiva de processos do sistema imune”.

Figura 37 - Enriquecimento singular para processo biológico de genes diferencialmente conectados entre os grupos de alta e de baixa eficiência alimentar, região C. Pode-se destacar “regulação da produção de citocinas” e “ativação de integrinas”.

Para selecionar genes biologicamente mais relevantes, esse conjunto de genes foi reduzido para os 12 genes que apresentaram diferenças no nível de expressão entre as duas condições ($p < 0,05$). Todos os 12 genes são genes altamente conectados para AEA, mas não para BEA (Tabela 16).

Tabela 16 - Genes diferencialmente co-expressos e diferencialmente expressos.

Gene	Descrição	K _{BEA}	K _{AEA}	K _{Diff}	P-valor
TXNIP	Thioredoxin interacting protein	0,100	0,891	-0,791	0,018
RHBDD1	Rhomboid domain containing 1	0,115	0,831	-0,716	0,019
CDC42SE1	CDC42 small effector 1	0,053	0,841	-0,788	0,021
GNB2L1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, N-terminally processed	0,024	0,708	-0,684	0,022
TMEM144	Transmembrane protein 144	0,038	0,670	-0,632	0,032
ALDOC	Aldolase C, fructose-bisphosphate	0,102	0,787	-0,684	0,038
ENSBTAG00000045772	Uncharacterized protein	0,049	0,707	-0,658	0,043
ISG20	Interferon stimulated exonuclease gene 20kda	0,204	0,895	-0,691	0,044
USB1	U6 snrna biogenesis 1	0,065	0,840	-0,776	0,045
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kda	0,162	0,902	-0,740	0,046
CEP120	Centrosomal protein 120kda	0,109	0,796	-0,686	0,048
GSN	Gelsolin	0,115	0,787	-0,671	0,048

5. DISCUSSÃO

A eficiência alimentar (EA) em bovinos de corte é uma característica importante por identificar animais que consomem menos para produzir a mesma quantidade de carne. A seleção desses animais é bastante vantajosa não só do ponto de vista produtivo e econômico como também por ajudar a diminuir o impacto ambiental da produção pecuária, aumentando a sustentabilidade do sistema produtivo. Por ser uma característica multifatorial e de mensuração onerosa, objetivou-se com esse trabalho, a partir da expressão gênica global hepática de animais com alta eficiência alimentar (AEA) e baixa eficiência alimentar (BEA), identificar novos genes, funções biológicas e genes reguladores associados a esse fenótipo, que possam elucidar os processos biológicos envolvidos na resposta dos animais à dieta. Para isso, foram analisados dados de diversas características fenotípicas relacionadas ao desempenho dos animais em confinamento bem como dados de perfil transcriptômico hepático de animais de AEA e BEA, que serão discutidos nas linhas a seguir.

Primeiramente, foi verificado que muitos dos animais utilizados no experimento de confinamento eram meio-irmãos, filhos dos mesmos touros (Figura 13). Porém, filhos do mesmo touro não foram classificados apenas como AEA ou apenas como BEA, fato que pode ser comprovado observando que os 3 touros que apresentaram maior número de filhos no experimento, tiveram esses filhos classificados nos 3 grupos, tanto de alta, como média e baixa eficiência alimentar (Figura 14). Além disso, o modelo estatístico utilizado para testar o efeito de touro no valor de consumo alimentar residual (CAR) e consumo e ganho residual (CGR) mostrou não haver efeito significativo de pai para essas características. Pode-se considerar então que o fato de vários animais serem meio-irmãos não teve influência na avaliação da eficiência alimentar, característica foco desse trabalho.

Em seguida, ao serem avaliados os dados de desempenho em confinamento (Tabela 4), percebeu-se que os valores de DP para conversão alimentar (CA), CAR e CGR indicam que existe variação dentro da população estudada para medidas de EA, mostrando que os animais podem ser selecionados para essas características. Esse resultado está de acordo com

trabalhos anteriores que avaliaram EA em bovinos Nelore (GOMES et al., 2013; SANTANA et al., 2012, 2013, 2014b). Observando as correlações entre os fenótipos de peso vivo inicial (PVI) e final (PVF), ganho de peso médio diário (GMD), consumo de matéria seca (CMS) e características de EA (Tabela 5), a alta correlação negativa entre CA e GMD corrobora resultados anteriores tanto em bovinos taurinos (BASARAB et al., 2003) como zebuínos (SANTANA et al., 2012). Isso mostra que animais com baixa CA (mais eficientes de acordo com essa medida) são também os que ganham mais peso; o que também explica a correlação negativa da CA com PVF, já que observa-se que os animais que ganham mais peso são também os com maior peso final. A correlação positiva da CA com PVI pode ser explicada pelo fato de que animais com maior PVI talvez estejam em um estado mais avançado de maturidade, com menor deposição de músculo em relação a quantidade de alimento ingerido. A falta de correlação entre CAR e GMD é esperada, uma vez que o último é utilizado para explicar a variável dependente (CMS) da regressão em que o resíduo corresponde à estimativa do CAR. O mesmo acontece entre GPR e CMS. Por outro lado, também era esperado que o CAR apresentasse alta correlação com CMS e GPR apresentasse alta correlação com GMD. Berry e Crowley (2012) observaram moderada correlação genética (0,47) e fenotípica (0,41) entre CGR e GMD estudando 3.531 bovinos taurinos. Branco et al. (2014) mostraram resultados semelhantes para correlação fenotípica (0,37) usando dados de 8.004 bovinos Nelore, mas não para correlação genética (0,18) a qual foi mais parecida com nossos resultados para correlação fenotípica entre essas duas medidas (0,20). Santana et al. (2012) também encontraram baixa correlação tanto genética (0,20) quanto fenotípica (0,12) entre CGR e GMD trabalhando com dados de 1038 bovinos Nelore. Encontrou-se também alta correlação entre CGR e todas as outras características de EA, mas podemos notar uma correlação mais elevada com CAR (-0,97) do que com GPR (0,72). Isto pode ser explicado pelo fato de que a escala de valores de GMD em que se baseia o GPR é menor do que a escala de valores de CMS em que se baseia o CAR e assim, o CAR tem maior influência no CGR do que o GPR.

Observando as correlações entre peso inicial, final e médio; consumo de matéria seca, ganho de peso e medidas de EA com medidas de ultrassonografia de carcaça e biometria (Tabela 6) é possível perceber que

existe correlação entre peso do animal e medidas biométricas, como esperado, já que animais mais pesados tendem a serem maiores. Por outro lado, as medidas biométricas não apresentam correlação com nenhuma medida de eficiência alimentar, não sendo uma boa alternativa para selecionar indivíduos para essa característica. O peso dos animais também está correlacionado com a área de olho de lombo (AOL) tanto inicial quanto final, mais uma vez mostrando que animais mais pesados são maiores; mas não com o ganho no período avaliado, o que indica que animais mais pesados não depositaram mais músculo no período. A AOL inicial, final e ganho também não apresentam correlação com CAR o que corrobora resultados de Lancaster et al. (2009) e Santana et al. (2012). Já a espessura de gordura no *Longissimus dorsi* e no *Biceps femoris*, tanto final quanto ganho, apresentam correlação com o CMS e a espessura de gordura, principalmente final, apresenta correlação com CAR e CGR, mostrando que os animais que depositam mais gordura são os que consomem mais e são menos eficientes.

Posteriormente, os animais divididos em grupos de AEA e BEA foram avaliados quanto à diferença entre a média dos grupos para várias características fenotípicas. Não houve diferença significativa no peso vivo inicial (PVI) e final (PVF) entre os grupos de animais, bem como no desempenho de GMD no período. Todavia, observa-se diferença significativa nas medidas de EA e no CMS, sendo esta última menor nos animais de AEA. Esse resultado é consistente com a proposta da medida de CAR (Koch et al., 1963) que visa identificar animais que ingerem menos alimento mantendo o ganho de peso, e estão de acordo com outros estudos em *Bos indicus* e *Bos taurus* (ARTHUR; RENAND; KRAUSS, 2001; ARTHUR et al., 2001; GOMES; SAINZ; LEME, 2013; GOMES et al., 2011; SANTANA et al., 2013). Apesar da falta de diferença significativa para PVF e GMD entre os grupos indicar que não houve maior velocidade de ganho de peso nos animais mais eficientes, como é a proposta da medida de CGR (BERRY; CROWLEY, 2012), nota-se que a média tanto de PVF quanto de GMD dos animais de AEA foi maior do que dos animais de BEA. Além disso, o valor de p entre as médias dos grupos de AEA e BEA, que é de 0,06 para animais selecionados por CGR, passa para 0,73 quando os animais são selecionados por CAR, o que nos indica diferença quanto ao ganho de peso ao selecionar animais usando uma ou outra medida.

Talvez o período de 70 dias de confinamento tenha sido curto para avaliar a velocidade de ganho de peso, ou talvez o impacto da seleção para CAR ou CGR seja melhor observado ao longo das próximas gerações como mostra o trabalho de Branco et al. (2014). Esses autores demonstraram que a seleção para CAR reduz o GMD nas próximas gerações enquanto que a seleção para CGR aumenta o GMD. Apesar disso, o mesmo trabalho mostra maior redução no CMS nas próximas gerações quando os animais são selecionados para CAR do que quando são selecionados para CGR. Novas pesquisas ainda são necessárias para orientar a decisão de selecionar animais por uma ou outra medida de EA.

Considerando os grupos de AEA e BEA surgiu-se uma dúvida: os animais mais eficientes já são mais eficientes desde o início do confinamento, apresentando menor consumo também desde o início? Verificou-se que sim, os animais de AEA apresentam menor consumo proporcional ao peso ao longo de todo o período de confinamento, havendo diferença significativa entre os grupos em todos os tempos avaliados exceto no último dia de confinamento (Figura 14). O mesmo se verifica para a CA, que apesar de não apresentar diferença significativa no primeiro intervalo avaliado (0-14), apresenta diferença significativa nos períodos posteriores, sempre com menor valor de CA para os animais de AEA (Figura 15).

Quando foram analisadas novamente as medidas de ultrassonografia de carcaça, agora considerando os grupos de AEA e BEA, verificou-se o mesmo já indicado pela análise de correlação. Não houve diferença significativa entre os dois grupos para AOL, mas houve diferença significativa para espessura de gordura tanto no *Longissimus dorsi* quanto no *Biceps femoris*, mostrando que animais mais eficientes depositam menos gordura subcutânea. Esse fato já foi demonstrado anteriormente (SANTANA et al., 2012), inclusive mostrando esse resultado como uma possível implicação negativa da seleção para eficiência alimentar, já que acabamos selecionando animais com menor acabamento de gordura e essa gordura é fundamental para proteger a carcaça no processo de resfriamento durante o *rigor mortis*, prevenindo a formação da carne chamada DFD (*dark, firm and dry*). Quanto à espessura de gordura, a única que não apresentou diferença entre os grupos foi a EGSi, o que pode ser explicado pelo fato de que a deposição de tecido adiposo se inicia no posterior dos animais e

segue para o anterior (LUCHIARI FILHO, 2000), dessa forma, provavelmente no início do confinamento a deposição de gordura na região do contrafilé não era suficiente para apresentar diferença entre os grupos.

Com relação às sete características avaliadas no EPMURAS, o fato de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os grupos de AEA e BEA pode estar relacionado ao número pequeno de animais, principalmente se tratando de características avaliadas por medidas categóricas. O EPMURAS é uma ferramenta para caracterizar o animal quanto ao tamanho, rendimento e acabamento de carcaça, além de características raciais para orientar decisões de seleção e acasalamento dirigido. Dessa forma, é justificável a falta de associação entre essa avaliação e medidas de EA, já que não é o objetivo inicial da ferramenta. Também não foram encontradas diferenças significativas para as medidas biométricas entre os grupos. Esses dois resultados juntos mostram que visualmente não é possível determinar quais animais são mais eficientes e quais são menos eficientes ao final do confinamento.

Com relação à contagem de protozoários, a maior quantidade de *Entodinium spp.* observada em ambos os grupos está de acordo com outros autores que descreveram esse gênero como predominante, principalmente em dietas a base de concentrado (FILHO et al., 1992; HUNGATE, 1966). Já os protozoários dos gêneros *Diplodinium spp.* e *Epidinium spp.* aparecem em menor quantidade pois são degradadores de fibras, estando aumentados apenas em dietas fibrosas (HUNGATE, 1966; JOUANY, 1996). O gênero *Isotricha spp.* foi o único que apresentou diferença significativa entre os grupos de AEA e BEA. Este gênero, juntamente com o *Dasytricha spp.* são chamados *Holotricha* e aparecem em maior número nos ruminantes em regime de pastejo, recebendo feno ou cana de açúcar, pois tem a capacidade de degradar os polissacarídeos não estruturais e carboidratos solúveis das plantas (HUNGATE, 1966; JOUANY, 1996). Apesar de terem sido observadas diferenças significativas somente para *Isotricha spp.*, a contagem de todos os gêneros de protozoários foi maior nos animais de BEA. Este fato se torna importante quando consideramos que a contagem foi feita em uma amostra de 1 ml de líquido ruminal e o rúmen-retículo chega a ter capacidade de 200 litros (HILL, 1989). Nesse volume, a diferença na contagem de total de protozoários entre os grupos passa a ser muito maior. Em revisão, Veira (1986) descreve

que animais faunados, em comparação à defaunados, apresentam redução na síntese microbiana no líquido ruminal e aumento na degradação da proteína da dieta no rúmen, o que resulta no menor fluxo de proteína para o intestino delgado. O autor relata que o principal efeito nutricional de protozoários ciliados é mudar a proporção entre proteína e energia nos nutrientes absorvidos, com animais faunados apresentando menores teores de proteína e maiores teores de energia disponíveis em comparação com os ruminantes livres de ciliados. É demonstrado ainda que a defaunação de ruminantes jovens em crescimento, que são alimentados com dietas de alta energia e baixos níveis de proteína não degradável no rúmen, resulta num aumento da taxa de crescimento e eficiência alimentar. Assim, é razoável sugerir que talvez a menor quantidade de protozoários ciliados observada nos animais de AEA leve à menor degradação ruminal da proteína de alta qualidade vinda da dieta e, portanto, à maior eficiência no aproveitamento da mesma. Já com relação à concentração de nitrogênio amoniacal, um indicador bruto da eficiência de conversão de nitrogênio da dieta em proteína microbiana, não houve diferença entre os grupos, sugerindo que a diferença na eficiência alimentar não foi influenciada por diferenças na síntese de proteína microbiana.

A diferença significativa no peso de gordura tanto pélvica quanto renal proporcional ao peso vivo dos animais mostrou que animais menos eficientes depositam mais gordura visceral. Esse resultado está de acordo com Basarab et al. (2003) que também encontraram menor peso de gordura renal para animais com baixo valor de CAR (eficientes). Mader et al. (2009) encontraram correlação positiva (0,29 a 0,34) entre CAR e gordura visceral, sugerindo que a deposição de gordura visceral é um processo associado à menor eficiência alimentar. Já Cruz et al., (2010) encontraram resultados opostos, não só não identificando diferença para gordura visceral entre animais com alto e baixo CAR, mas também não reportando diferença entre os grupos para deposição de gordura subcutânea. Em humanos, os adipócitos e o tecido adiposo visceral têm sido alvo de grande interesse pelo entendimento cada vez maior da relação entre resposta metabólica e resposta imune que leva a síndromes metabólicas como obesidade e diabetes do tipo 2 (KLEIN et al., 2006). Já demonstrou-se que a obesidade, causada pelo acúmulo de tecido adiposo, está associada à resposta inflamatória tanto no tecido adiposo como no fígado,

outro importante órgão que coordena tanto a resposta metabólica como imune (HOTAMISLIGIL, 2006). Em bovinos de corte, não foram encontrados trabalhos demonstrando associação entre gordura visceral e doenças, porém em gado de leite é comum desordens metabólicas relacionadas ao metabolismo de lipídeos nos períodos pré e pós-parto (período de transição) quando a quantidade de lipídeos ingeridos na dieta excede a capacidade do fígado de metabolizá-los (BOSSAERT et al., 2012; FARID et al., 2013; TURK et al., 2013).

Quase todos os parâmetros séricos nos dois grupos (AEA e BEA) se mostraram dentro dos níveis de referência no primeiro dia de experimento, apenas o colesterol e o GGT no grupo de BEA que já aparecem levemente acima da referência, mas sem apresentarem diferenças significativas com o grupo de AEA (Tabela 9). Nesse momento, os animais haviam passado por um período de 21 dias de adaptação à dieta onde a proporção de concentrado foi gradualmente aumentada, até atingir a proporção de 75%, utilizada no experimento, 7 dias antes do período de coleta dos dados. Dessa forma, o impacto da mudança de dieta não causou efeitos nos parâmetros séricos logo após o período de adaptação de 21 dias. Já ao final do experimento, além dos níveis de colesterol e GGT terem aumentado no grupo de BEA, eles apresentaram diferença significativa com o grupo de AEA. A GGT está associada à membrana de células epiteliais biliares, células acinares pancreáticas, células epiteliais renais, hepatócitos entre outras e a principal causa do aumento sérico é por morte de células epiteliais biliares ou indução causada por colestase ou hiperplasia biliar – o bloqueio ou diminuição do fluxo de bile para a vesícula biliar gera um acúmulo de ácidos biliares no fígado que estimula a síntese e liberação de GGT (STOCKHAM; SCOTT, 2008). Em bovinos, o GGT tem maior sensibilidade do que a FA para detectar colestase e outros distúrbios biliares (STOCKHAM; SCOTT, 2008). O aumento de GGT também pode estar relacionado à colaginite, colecistite, intoxicação por cobre, micotoxiose hepática e fasciolíase (STOCKHAM; SCOTT, 2008). Todas estas causas foram excluídas em nosso experimento por ausência de achados no abate e análise macroscópica dos fígados. Já o colesterol é produzido em sua maioria pelos hepatócitos e seu aumento indica que há concentrações aumentadas de lipoproteínas o que pode ter várias causas, como síndrome

nefrótica ou nefropatia, pancreatite aguda, hiperadrenocorticismo, hipotireoidismo e colestase obstrutiva (STOCKHAM; SCOTT, 2008). A colestase obstrutiva em cães e gatos está associada ao aumento de colesterol sem aumento de triglicérides (STOCKHAM; SCOTT, 2008). Ela reduz a excreção biliar do colesterol que se acumula no organismo.

A colestase é a interrupção ou supressão do fluxo biliar causado por um processo inflamatório, infeccioso ou obstrutivo que pode ocorrer desde o hepatócito até a porção terminal das vias biliares e explica tanto o aumento de GGT quanto o de colesterol sem aumento de triglicérides nos animais de BEA (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). Em animais de confinamento, a prevalência de abscessos hepáticos que podem levar à colestase pode variar entre 1% e 95% (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007) sendo que na maioria dos confinamentos varia de 12% a 32% (BRINK et al., 1990). Esses abscessos são induzidos pela dieta e a prevalência é influenciada pela quantidade, características físicas e possivelmente pelo tipo de volumoso já que esses fatores estão relacionados à incidência de acidose e ruminite (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007). A acidose, resultado da alta produção de ácido láctico e ácidos graxos voláteis induzidos pela dieta de confinamento, lesa a parede do rúmen e a deixa susceptível à invasão e colonização de bactérias como *Fusobacterium necrophorum* e *Arcanobacterium pyogenes* (BERG; SCANLAN, 1982; LECHTENBERG et al., 1988). Essas bactérias ganham a corrente sanguínea e chegam ao fígado pelo sistema porta causando abscessos. Animais com abscessos hepático induzidos por *Fusobacterium necrophorum* mostraram níveis alterados de globulinas e GGT (LECHTENBERG; NAGARAJA, 1991). A acidose geralmente ocorre durante a adaptação à dietas ricas em concentrado, porém ela pode continuar durante todo o período de confinamento (OWENS et al., 1998). Brink et al. (1990) reportaram queda de 11% no ganho de peso de animais com abscessos hepáticos e queda na eficiência alimentar de 9,7%. Já Wieser et al. (2010) não encontraram efeito no desempenho de animais com abscessos. Efeitos no desempenho parecem estar relacionados com a severidade dos abscessos (BROWN et al., 1975). Em nosso caso, não observamos diferenças tanto no peso quando na aparência dos fígados dos animais dos dois grupos no momento do abate. Abscessos hepáticos são raros no começo do confinamento, se desenvolvendo

posteriormente (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007). Talvez mais uma vez o tempo de confinamento não tenha sido suficiente para gerar lesões possíveis de serem identificadas macroscopicamente. Por outro lado, microscopicamente foi possível observar infiltrado inflamatório mononuclear (macrófagos, linfócitos e plasmócitos) em espaços-porta em ambos os grupos através da avaliação histopatológica. Não houve diferença na porcentagem de espaços-porta com infiltrado inflamatório entre os grupos de AEA e de BEA a 5% de significância. Porém, existe diferença se considerarmos 10% de significância, com a maior média no grupo de BEA. Esse resultado é um indicativo de que há diferença entre os grupos, principalmente levando-se em conta que os animais avaliados não são os extremos de eficiência alimentar. Novas lâminas histológicas serão confeccionadas a partir de tecido congelado dos animais extremos dos dois grupos para aumentar a confiança dessa análise.

É importante considerar que em nossos resultados, apesar dos níveis de GGT e colesterol estarem acima da referência, eles não são altos o suficiente para serem indicativos de doença, sendo todos os animais considerados saudáveis. Apesar disso, a diferença nesses parâmetros entre animais de AEA e BEA podem refletir uma tênue diferença na resposta dos indivíduos à dieta de confinamento. Esse raciocínio leva-se a imaginar se essa possível susceptibilidade dos animais de BEA à lesão hepática seria devida a maior ingestão de alimentos observada nesse grupo ou se esses animais teriam uma menor tolerância à dieta de alto concentrado o que levaria a uma menor eficiência no funcionamento hepático e consequentemente faria com que os animais fossem menos eficientes no aproveitamento do alimento ingerido. Nagaraja e Lechtenberg (2007) discutem que existe maior prevalência de abscessos hepáticos em machos do que em fêmeas e esta diferença estaria ligada ao maior consumo de alimento observado nos primeiros. O mesmo acontece em animais de raça holandesa criados para corte, que também apresentam maior consumo de alimentos e maior prevalência de abscessos hepáticos em comparação com raças de corte. Em nosso caso, os animais de BEA apresentaram maior consumo de alimento durante todo o período de confinamento.

Após a caracterização fenotípica dos animais confinados, seguiu-se para análise de perfil transcriptômico hepático. Uma das principais vantagens da utilização de tecnologia de sequenciamento de nova geração em relação à de microarranjos para analisar dados de expressão gênica é a possibilidade de identificar novos genes e variantes de *splicing* alternativo do mesmo gene, o que é especialmente interessante no nosso estudo uma vez que o genoma de referência bovino disponível foi sequenciado a partir de um animal de taurino (ELSIK et al., 2009) e nosso trabalho foi desenvolvido em animais zebuínos. Dos 43 transcritos diferencialmente expressos entre as condições de AEA e BEA, 17 são referentes a apenas uma das várias isoformas expressas dos respectivos genes no tecido hepático. Estes resultados sugerem que diferentes isoformas do mesmo gene podem ter importância diferente para o fenótipo de EA. Embora ao nosso conhecimento não haja nenhum outro estudo relatando associação entre diferentes isoformas de genes à EA, eventos de *splicing* alternativos são conhecidos por estarem relacionados a diversos fenótipos, por exemplo, o câncer tanto em humanos quanto em animais (OLTEAN; BATES, 2013; PATEL et al., 2013).

Os genes diferencialmente expressos entre AEA e BEA mostraram enriquecimento funcional para citocromo P450 por causa dos genes CYP2E1, CYP7A1 e do gene ENSBTAG00000047324, que apresentou 96% de similaridade com o gene CYP2C21. Os citocromos P450 do fígado são enzimas que contêm um grupamento heme, localizam-se na membrana do retículo endoplasmático das células e estão envolvidos na manutenção da homeostase de lipídios (colesterol, vitamina D e metabolismo de ácidos biliares) e em processos de descontaminação de compostos endógenos (ácidos biliares) e xenobióticos como fármacos e pesticidas (HAFNER; REZEN; ROZMAN, 2011). Embora as funções dos CYP450s sejam altamente conservadas, existem diferenças significativas no nível de expressão de enzimas específicas e seus substratos entre diferentes espécies ou mesmo entre raças de bovinos e entre sexos (DACASTO et al., 2005). Em humanos e roedores há uma vasta literatura discutindo as funções e variações dessas enzimas, porém em animais domésticos e de produção os estudos são escassos (FINK-GREMMELS, 2008). Os CYP450 iniciam todas as principais vias de degradação do colesterol e são regulados por receptores nucleares

e/ou pela proporção de colesterol e ácidos biliares no fígado (HAFNER; REZEN; ROZMAN, 2011). A CYP7A1, colesterol 7 α -hidroxilase, é uma enzima expressa somente em fígado. Ela catalisa o primeiro passo e a taxa de síntese de ácidos biliares. A regulação de CYP7A1 é modulada pela proporção relativa de colesterol em ácidos biliares no fígado sendo que o excesso de colesterol estimula a expressão de CYP7A1 para promover sua eliminação, enquanto os ácidos biliares reprimem a sua expressão (HAFNER; REZEN; ROZMAN, 2011). Camundongos induzidos para redução na expressão do gene que codifica a CYP7A1 através da administração de PCN (*pregnenolone 16 α -car-bonitrile*) manifestaram níveis elevados de colesterol no sangue e baixa atividade da colesterol hidroxilase e de excreção ácidos biliares (AKIYAMA; GONZALEZ, 2003). Esses resultados estão de acordo com os encontrados em nossos animais de BEA que apresentaram menor expressão de CYP7A1 em comparação com os animais de AEA, além de nível de colesterol acima da referência. Além disso, o elevado nível de GGT observado nos animais de BEA está provavelmente associado à indução por acúmulo de ácidos biliares causado por uma possível colestase, o que pode ser a causa do *feedback* negativo da CYP7A1. Não foi observada, em nossos resultados de expressão diferencial, nenhuma diferença significativa para genes apontados como responsáveis pela regulação da CYP7A1 em humanos, como os fatores de transcrição LXR α , RXR α , HNF4 α , LRH-1, PPAR α e FXR. Porém, como mostra a figura 38, muitos são os mecanismos de regulação desse gene em humanos e roedores e não há informações sobre eles em bovinos.

Figura 38 - Visão geral dos mecanismos de controle da CYP7A1 reportados na literatura (NORLIN; WIKVALL, 2007).

As famílias 1-3 do CYP450 estão envolvidas na desintoxicação de xenobióticos e ácidos biliares, bem como moléculas de esteróides (HAFNER; REZEN; ROZMAN, 2011). O CYP2C21, identificado em cães, é muito pouco caracterizado, mas por pertencer a família 2 pode-se especular que sua maior expressão nos animais de AEA esteja relacionada a uma maior eficiência em lidar com substância danosas ao organismo. Já o CYP2E1, apesar de pertencer a família 2 e estar relacionado ao metabolismo de xenobióticos, principalmente o metabolismo de álcool em humanos (CEDERBAUM, 2006; FRENCH, 1996), está mais expresso nos animais de BEA. Alguns trabalhos reportam o aumento da expressão desta enzima em diferentes condições fisiopatológicas, sendo uma delas a obesidade (O'SHEA et al., 1994; RAUCY et al., 1991). Os mecanismos pelos quais a CYP2E1 aumenta em casos de obesidade ainda são controversos, mas evidências apontam para relação com resistência à insulina, que pode ter causas genéticas ou estar ligada à supersaturação de moléculas energéticas no organismo (ácidos graxos, glicerol, glicose e Acetil CoA) (KNOCKAERT; FROMENTY; ROBIN, 2011).

CHEN et al. (2011) também identificaram um membro do grupo CYP450 (CYP1A2) e outros genes relacionados ao metabolismo de contaminantes ambientais (GSTM1, GSTM3 e GSTT1) como DE entre bovinos Angus de alta e baixa EA usando a técnica de microarranjo. Outro gene DE relacionado em nosso estudo é o ENSBTAG00000039664, um gene mais expresso no grupo de AEA que apresenta 94% de similaridade com a HEBP (*heme-binding protein 1*), proteína que facilita a remoção de compostos porfirinogênicos potencialmente tóxicos da célula e que é expressa em fígado (JACOB BLACKMON et al., 2002).

Além da expressão diferencial, outra abordagem utilizada foi a análise de co-expressão que identificou 2 módulos de genes co-expressos e altamente conectados associados à EA. A correlação positiva da expressão de ambos os módulos com o CAR e negativa com CGR mostra que quanto menor a EA, maior a expressão geral (módulo *eigengene*) do módulo e dessa forma, as funções relacionadas aos dois módulos estão ligadas ao grupo de BEA. O módulo *Marrom* está relacionado com proliferação e migração de células T ativadas e tradução. Os linfócitos T são uma classe de leucócitos ligados à imunidade celular e envolvidos na defesa imunológica contra vírus, bactérias e fungos (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). Quando ativadas, as células de defesa liberam mediadores químicos de resposta inflamatória que são produzidos como moléculas pré-formadas e estocadas até o momento da ativação. Por outro lado, moléculas como citocinas, moléculas de adesão e prostaglandinas são amplamente sintetizadas somente após a célula ser ativada (MCGAVIN; ZACHARY, 2007), o que explica o fato do módulo *Marrom* estar relacionado tanto à migração de linfócitos T ativados como à tradução de proteínas. Há que se considerar que ao analisar o tecido hepático, não só um, mas vários tipos de células têm sua expressão captada. Dessa forma, no caso de uma inflamação, a expressão de células de defesa que migraram para a área afetada também seria considerada, além da expressão de hepatócitos, células endoteliais, células estreladas e células de Kupffer.

As principais características da inflamação são exsudação microvascular de eletrólitos, fluido e proteínas plasmáticas; e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, seguida de rápido reparo e cicatrização (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). Interessante observar que o gene *VNN2*, ligado a migração

transendotelial de neutrófilos, e o gene *CXCL2*, produzido por macrófagos e neutrófilos e expresso em sítios de inflamação, foram ambos significativamente mais expressos no grupo de BEA. Além disso, outros 2 genes mais expressos no grupo de BEA estão relacionados a tradução: o gene *E1BEQ3*, que codifica uma proteína não caracterizada em bovinos, apresentou 99% de similaridade com o gene que codifica a subunidade ribossomal 40S; e o Transcrito 11, apresentou 77% de similaridade com o gene *BRF1*, que tem papel central na iniciação da transcrição de genes de tRNA, 5S RNA e outros RNAs pequenos estruturais. Já os genes *GADD45G* e o *RHOB*, também mais expressos na BEA, estão relacionados à resposta celular ao estresse.

Da mesma forma que alguns dos genes diferencialmente expressos se encaixam no cenário de inflamação, que concorda com outros resultados discutidos anteriormente, o módulo Cinza, apesar de não apresentar enriquecimento funcional significativo, apresentou vários genes que também podem estar envolvidos no processo inflamatório. O movimento dos leucócitos do lúmen dos capilares e vênulas para o tecido onde está ocorrendo a inflamação se dá através de um processo chamado cascata de adesão leucocitária, que é mediado pela interação de ligantes expressos na superfície de neutrófilos, linfócitos e macrófagos e seus receptores expressos nas superfícies luminais das células endoteliais ativadas (MCGAVIN; ZACHARY, 2007). Os genes *S100A11*, *ARHGEF3*, *TMEM204*, *TUBA1B*, *ZYX* e *EPS8L2* estão ligados ao movimento e à adesão celular. Além desses, destacam-se outros genes importantes como o *DOI1*, expresso por macrófagos e ligado a imunidade celular; o *IGBP1*, que codifica uma imunoglobulina ligada à proliferação e diferenciação de linfócitos B; o *LAG3*, que também codifica imunoglobulina; o *PTGS1*, que está ligado a biossíntese de prostaglandinas; e o *IL18BP*, que atua inibindo citocinas inflamatórias. O *RHOB*, que além de pertencer ao módulo *Cinza* está diferencialmente expresso entre as duas condições, medeia apoptose e afeta adesão celular. Já o gene *VPS52* está ligado ao processamento de endossomos e o *TAP1* à absorção de peptídeos degradados do citosol. Os genes *SF3B1* e *BRD9* são fator de *splicing* e proteína reguladora de transcrição, respectivamente. É importante considerar que apesar de toda a capacidade de identificação de novos genes e isoformas proporcionada pelas tecnologias de sequenciamento de nova geração, ainda

usamos vias metabólicas e funções gênicas pré-definidas para interpretar esses dados e nem todos os resultados podem ser perfeitamente explicados. Além disso, as abordagens para análises de dados de expressão gênica vêm se modificando e evoluindo, bem como novas funções de genes e vias metabólicas vem sendo descobertas, e talvez ainda exista um longo caminho para chegar a um resultado que de fato reflita completamente o fenótipo. Existem alguns genes diferencialmente expressos que talvez sejam relevantes para a eficiência alimentar, porém ainda não têm sua importância esclarecida. O *PGCP* está envolvido na hidrólise de peptídeos circulantes e o *BHMT* participa do metabolismo de glicina, serina, treonina e metionina, ambos mais expressos no grupo de AEA. O *ISG15* também é mais expresso na AEA e está relacionado à resposta inata à infecção viral. O gene *SNORD52* e os transcritos 2 e 13, que apresentam 84% de similaridade com o gene *FAM159A*, são transcritos em RNAs não codificantes que talvez tenham função importante na regulação da expressão de outros genes. Os genes *NROB2* e *LBD3* também podem ter um papel regulatório já que têm como função a regulação transcricional de outros genes e sinalização, respectivamente.

Os genes candidatos como centrais do metabolismo hepático associado à baixa EA foram escolhidos por estarem tanto correlacionados com as medidas de CAR e CGR quanto por se mostrarem centrais e altamente conectados dentro dos respectivos módulos. Eles estão principalmente relacionados à resposta inflamatória, mas também à transcrição. Além disso, foram identificados genes reguladores dos módulos *Marrom* e *Cinza*. Ao módulo *Marrom* foram atribuídos 2 reguladores, o *FOXS1* e o *RAMP3*. O *FOXS1* (*forkhead box S1*), é um fator de transcrição de uma família de proteínas ligantes de DNA e sua função ainda não foi bem elucidada. Porém, Heglind et al. (2005) identificaram a expressão desse gene em núcleos hipotalâmicos conhecidos por estarem envolvidas no regulamento do balanço de energia e demonstraram que ele pode estar envolvido em eventos que regulam importantes funções, entre elas, a regulação do peso corporal. No fígado, a função desse gene ainda não está clara. O *RAMP3* (*Receptor activity modifying protein 3*) é uma proteína transmembrana da família das proteínas modificadoras de atividade de receptores de calcitonina que são requeridas para o transporte de receptores de calcitonina. Estes, na presença da *RAMP3*,

funcionam como receptores de adrenomedulina, uma proteína que já foi demonstrada por diversos trabalhos estar associada à modulação de apoptose e de resposta inflamatória no fígado (IINUMA et al., 2010; SAITO et al., 2012; SHAH et al., 2010). Interessante notar que a RAMP2, que também está envolvida no transporte de receptores de adrenomedulina, faz parte do módulo *Marrom*. Ao módulo *Cinza* foram atribuídos 3 reguladores, *HTRA2*, *ZNF274* e *HPCAL1*. O *HTRA2* (*serine peptidase 2*) é uma enzima protease localizada nas mitocôndrias que quando liberada induz apoptose se ligando a uma proteína inibitória de apoptose. Já o *ZNF274* (*Zinc finger protein 274*) é uma proteína considerada repressora transcricional através do recrutamento de proteínas modificadoras de cromatina, resultando em alterações epigenéticas. Ahrens et al. (2013) demonstraram o papel dessa proteína na regulação epigenética no fígado de humanos com obesidade mórbida submetidos à cirurgia bariátrica, sugerindo sua função na adaptação do organismo em resposta à doença. O *HPCAL1* (*Hippocalcin-like protein 1*) tem descrito como função principal estar envolvido na regulação dependente de cálcio da fosforilação da rodopsina e ser de relevância para a sinalização neuronal no sistema nervoso central. Porém, Saremi et al. (2012) mostraram que o *HPCAL1* regula o gene *GAPDH* através de interação proteína-proteína e este segundo gene além de estar relacionado à glicólise, também pode estar envolvido na indução de apoptose, receptor de quinases, transporte de tRNA e reparo de DNA (LASCHET et al., 2004; SAWA et al., 1997; SIROVER, 1997; TARZE et al., 2007). Apesar de apenas os genes *HPCAL1* e *RAMP3* terem mostrado diferença de expressão entre os grupos, diversos outros mecanismos podem diferir entre AEA e BEA como a regulação epigenética por miRNA ou alterações pós traducionais.

Voy e Aronow (2009) utilizando uma abordagem de genética de sistemas com dados disponibilizados publicamente por Shockley et al. (2009), mostraram que níveis crescentes de colesterol em camundongos estão altamente correlacionados com inflamação, imunidade e resposta a agentes xenobióticos. O interessante é que na rede construída pelos autores estão presentes os termos “aumento de susceptibilidade à infecção” e “susceptibilidade alterada à infecção”. Em humanos, o aumento de colesterol sérico pode estar relacionado à obesidade (CASTRO CABEZAS; HALKES; ERKELENS, 2001; FOSSATI, 1993). Diversos trabalhos de revisão mostram

que o sobrepeso tem um evidente efeito na resposta imunológica do organismo levando a um aumento na susceptibilidade à infecções, ainda que os aspectos dessa associação entre obesidade e imunidade continuem pouco claros (FALAGAS; KOMPOTI, 2006; GENONI et al., 2014; HEGDE; DHURANDHAR, 2013). Como discutindo anteriormente, a estreita proximidade entre células responsáveis pelo metabolismo e células do sistema imune em órgãos como fígado e tecido adiposo tornam estreitas as relações entre esses dois processos biológicos (HOTAMISLIGIL, 2006). Talvez por isso os genes diferencialmente co-expressos entre a AEA e a BEA, ou seja, genes com diferença de conectividade com outros genes entre as duas condições, mostrem enriquecimento funcional tanto para regulação do armazenamento de lipídeos e regulação do metabolismo de triglicérides, quanto para resposta imune. Talvez os animais de BEA, por ingerirem mais alimento e consequentemente acumularem mais gordura tanto visceral quanto subcutânea, sejam mais susceptíveis à infecção. Além disso, também houve enriquecimento dos genes diferencialmente co-expressos para termos como “resposta inflamatória”, “resposta celular à moléculas de origem bacteriana”, “regulação da produção de citocinas” e “ativação de integrinas”, reforçando nossa hipótese de inflamação no fígado dos animais de BEA. Dos 400 genes diferencialmente conectados foram escolhidos os 12 de maior relevância biológica através da análise de expressão diferencial desses genes nas 2 condições. Esses genes, sendo tanto diferencialmente expressos como diferencialmente conectados, são ótimos candidatos para terem seu papel na EA analisado mais a fundo posteriormente.

A análise de transcriptoma é uma abordagem exploratória e não está baseada em hipóteses pré-definidas, pelo contrário, gera hipóteses que precisam ser investigadas mais a fundo futuramente por outros experimentos. Neste trabalho, observamos que os grupos de AEA e BEA apresentaram desempenho igual quanto ao peso inicial, peso final, ganho de peso, rendimento de carcaça e área de olho de lombo, mostrando que a taxa de crescimento e de deposição de músculo foi igual entre os grupos. Por outro lado, os animais de BEA tiveram maior consumo de alimentos desde o início do confinamento e apresentaram maior conversão alimentar (menor eficiência em converter alimento em carne) também desde o início do confinamento. Além

disso, apresentaram maior deposição de gordura subcutânea desde o primeiro dia e maior peso de gordura visceral medida no momento do abate. Por fim, os animais de BEA apresentaram níveis elevados tanto de colesterol quanto de GGT e a análise de perfil transcriptômico mostrou, através de diferentes abordagens, estar relacionada à resposta imunológica, inflamação e metabolismo de lipídeos. Dessa forma, criou-se a hipótese de que talvez os animais de BEA por consumirem mais alimento e armazenarem mais gordura, apresentaram maior nível de colesterol e maior susceptibilidade à infecção. Essa maior produção de colesterol é evidenciada pela maior expressão do gene *EBPL* nos animais de BEA, já que ele codifica uma enzima envolvida na biossíntese dessa substância. Outra indicação da diferença no metabolismo de lipídeos entre AEA e BEA é o enriquecimento funcional de genes diferencialmente conectados ligados ao metabolismo de triglicérides e armazenamento de lipídeos. A mudança da dieta a pasto para a dieta de alto concentrado do confinamento representa um desafio aos animais e quadros de acidose e ruminite tem alta prevalência causando lesões na parede do rúmen. Nos animais de BEA, por serem mais susceptíveis, acontece a invasão e colonização de bactérias que ganham a corrente sanguínea e se instalam no fígado levando à infecção. Evidências dessa infecção bacteriana são o enriquecimento funcional de genes diferencialmente conectados relacionados à resposta à moléculas de origem bacteriana, bem como para resposta inflamatória e resposta imune. Além disso, os genes dos módulos *Marrom* e *Cinza* estão relacionados à proliferação e migração de células T ativadas, movimento celular, adesão e imunidade. Soma-se a esses resultados a análise histopatológica, que nos dá indicação de um quadro de maior infecção nos animais de BEA. A infecção pode causar redução ou até interrupção do fluxo de bile nos ductos biliares do fígado levando ao acúmulo de ácidos biliares que induzem a produção de GGT nos animais menos eficientes. O acúmulo de ácidos biliares também pode influenciar a expressão de alguns genes, como por exemplo, o *feedback* negativo observado no gene *CYP7A1*. Considerando que o experimento teve duração de 70 dias e que confinamentos comerciais chegam a durar até 120 dias, talvez uma avaliação durante um período maior de tempo ajudasse a esclarecer melhor as diferenças nas respostas à dieta dos animais de AEA e BEA. A coleta de outros fenótipos como análise das frações

do colesterol (LDL, HDL e VLDL), nível de leptina e insulina, expressão gênica no tecido adiposo, análise de leucograma e de hemograma também poderiam ser úteis para confirmar as hipóteses levantadas nesse trabalho.

Através das diferentes abordagens de análise de perfil transcriptômico hepático e dos dados de desempenho em confinamento, bioquímica sérica, características de carcaça e avaliação de líquido ruminal, além das informações fornecidas por pesquisas em humanos e camundongos foi possível criar a hipótese de que animais menos eficientes são mais susceptíveis à inflamação no fígado em resposta à dieta de alto concentrado fornecida em sistemas de confinamento. Além disso, foram identificados novos genes expressos no fígado de bovinos que estão relacionados à eficiência alimentar e genes reguladores centrais desse fenótipo. Estes resultados ajudam a compreender melhor a eficiência alimentar e a direcionar futuras pesquisas nesse sentido.

Baixa eficiência alimentar em comparação à alta eficiência alimentar

Figura 39 – Modelo esquemático dos resultados observados (azul) e hipóteses (vermelho).

6. CONCLUSÃO

Os animais de baixa eficiência alimentar apresentam maiores consumo de matéria seca, deposição de gordura e níveis séricos de colesterol e GGT, além de apresentarem perfil transcriptômico hepático associado à inflamação e metabolismo de lipídeos. Genes como o FOXS1, HPCAL1, HTRA2, RAMP3 e ZNF274 são candidatos como centrais na regulação do metabolismo hepático associado à eficiência alimentar.

REFERÊNCIAS

FAO - Food and Agriculture Organization. **2050: A third more mouths to feed**. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/en/item/35571/icode/>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

ACNB - **Associação dos Criadores de Nelore do Brasil**. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

AHRENS, M. et al. DNA methylation analysis in nonalcoholic fatty liver disease suggests distinct disease-specific and remodeling signatures after bariatric surgery. **Cell metabolism**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 296–302, 6 ago. 2013.

AKIYAMA, T. E.; GONZALEZ, F. J. Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, p. 223–234, 2003.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat**. Savoy: [s.n.].

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome biology**, London, v. 11, n. 10, p. R106, jan. 2010.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

ARCHER, J. A. et al. Optimum postweaning test for measurement of growth rate, feed intake, and feed efficiency in British breed cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 75, n. 8, p. 2024–32, ago. 1997.

ARCHER, J. A. et al. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 50, p. 147–61, 1999.

ARTHUR, P. .; RENAND, G.; KRAUSS, D. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science**, v. 68, n. 2-3, p. 131–139, mar. 2001.

ARTHUR, P. F. et al. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake , feed efficiency , and other postweaning traits in Angus cattle . The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide We. **Journal of animal science**, Champaign, p. 2805–2811, 2001.

ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; HERD, R. M. Feed intake and efficiency in beef cattle: overview of recent Australian research and challenges for the future. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwod, v. 44, n. 5, p. 361, 3 jun. 2004.

ABIEC - **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

BASARAB, J. A. et al. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 2, p. 189–204, jun. 2003.

BERG, J. N.; SCANLAN, C. M. Studies of *Fusobacterium necrophorum* from bovine hepatic abscesses: biotypes, quantitation, virulence, and antibiotic susceptibility. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 43, n. 9, p. 1580–6, set. 1982.

BERRY, D. P.; CROWLEY, J. J. Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 109–15, jan. 2012.

BERRY, D. P.; PRYCE, J. E. **Feed Efficiency in Growing and Mature Animals**. Proceedings of 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production Feed. **Anais...**Vancouver: 2014

BONNET, E.; CALZONE, L.; MICHOEL, T. Integrative multi-omics module network inference with Lemon-Tree. 3 ago. 2014.

BOSSAERT, P. et al. The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: an observational study. **Veterinary journal, London**, v. 192, n. 2, p. 222–5, maio 2012.

BRANCO, H. et al. Selection for feed efficiency traits and correlated genetic responses in feed intake and weight gain of Nellore cattle 1. **Journal of animal science**, Champaign, p. 955–965, 2014.

BRINK, D. R. et al. Severity of liver abscesses and efficiency of feed utilization of feedlot cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 68, n. 5, p. 1201–7, maio 1990.

BROWN, H. et al. Tylosin and chlortetracycline for the prevention of liver abscesses, improved weight gains and feed efficiency in feedlot cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 40, n. 2, p. 207–13, fev. 1975.

CASTRO CABEZAS, M.; HALKES, C. J.; ERKELENS, D. W. Obesity and free fatty acids: double trouble. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**, Amsterdã, v. 11, n. 2, p. 134–42, abr. 2001.

CEDERBAUM, A. I. CYP2E1--biochemical and toxicological aspects and role in alcohol-induced liver injury. **The Mount Sinai journal of medicine**, New York, v. 73, n. 4, p. 657–72, jul. 2006.

CHEN, Y. et al. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. **Animal genetics**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 475–90, out. 2011.

CHIZZOTTI, M. L.; LADEIRA, M. M.; NETO, O. R. M. **Mitigação dos gases de efeito estufa na pecuária de corte**. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/sustentabilidade/mitigacao-dos-gases-de-efeito-estufa-na-pecuaria-de-corte/>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

CHO, D.-Y.; KIM, Y.-A.; PRZYTICKA, T. M. Chapter 5: Network biology approach to complex diseases. **PLoS computational biology**, London, v. 8, n. 12, p. e1002820, jan. 2012.

CIVELEK, M.; LUSIS, A. J. Systems genetics approaches to understand complex traits. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 15, n. 1, p. 34–48, jan. 2014.

CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674–6, 15 set. 2005.

CREWS JR, D. H. Genetics of efficient feed utilization and national cattle evaluation : a review. **Genetics and molecular research**. Ribeirão Preto. v. 4, n. 2, p. 152–165, 2005.

CRUZ, G. D. et al. Performance, residual feed intake, digestibility, carcass traits, and profitability of Angus-Hereford steers housed in individual or group pens. **Journal of animal science**, Champagne, v. 88, n. 1, p. 324–9, jan. 2010.

DACASTO, M. et al. Effect of breed and gender on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants. **Veterinary research**, v. 36, n. 2, p. 179–90, 2005.

DE LA FUENTE, A. From “differential expression” to “differential networking” - identification of dysfunctional regulatory networks in diseases. **Trends in genetics**, Netherlands , v. 26, n. 7, p. 326–33, jul. 2010.

DE OLIVEIRA, P. S. N. et al. Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle. **BMC genetics**, London, v. 15, n. 1, p. 100, jan. 2014.

DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: [s.n.].

DILLIES, M.-A. et al. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. **Briefings in bioinformatics**, London, v. 14, n. 6, p. 671–83, nov. 2013.

ELSIK, C. G. et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, New York, v. 324, n. 5926, p. 522–8, 24 abr. 2009.

ESPIGOLAN, R. et al. Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. **BMC genomics**, London, v. 14, p. 305, jan. 2013.

EVANS, J. L.; GOLDEN, B. L.; HOUGH, B. L. **A New Genetic Prediction for Cow Maintenance Energy Requirements**. Disponível em: <http://www.bifconference.com/bif2002/BIFsymposium_pdfs/Evans_02BIF.pdf>.

FALAGAS, M. E.; KOMPOTI, M. Obesity and infection. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 6, n. 7, p. 438–46, jul. 2006.

FARID, A. S. et al. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. **BMC veterinary research**, London, v. 9, p. 73, jan. 2013.

FERRELL, C. L.; JENKINS, T. G. Cow Type and the Nutritional Environment: Nutritional Aspects. **Journal of animal science**, Champaign, n. 61, p. 725–741, 1985.

FIALHO, E.; MORENO, F. S.; ONG, T. P. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 6, p. 757–766, dez. 2008.

FILHO, J. C. M. N. et al. Contagens diferenciais de protozoários ciliados em rúmen de bovinos arraçoados com capim elefante Napier (*Pennisetum purpureum* Schum), em vários estádios de crescimento vegetativo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, 2 jan. 1992. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/51987>>. Acesso em: 1 fev. 2015

FILTEAU, M. et al. Gene coexpression networks reveal key drivers of phenotypic divergence in lake whitefish. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v. 30, n. 6, p. 1384–96, 21 jun. 2013.

FINK-GREMMELS, J. Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation processes in veterinary sciences. **European journal of pharmacology**, Amsterdã, v. 585, n. 2-3, p. 502–9, 13 maio 2008.

FOSSATI, P. Cholesterol: consensus and controversies, what is the trend in 1993?. **Annales d'endocrinologie**, Paris, v. 54, n. 6, p. 389–97, jan. 1993.

FRENCH, S. W. Ethanol and hepatocellular injury. **Clinics in laboratory medicine**, Philadelphia v. 16, n. 2, p. 289–306, jun. 1996.

FULLER, T. F. et al. Weighted gene coexpression network analysis strategies applied to mouse weight. **Mammalian genome**, New York, v. 18, n. 6-7, p. 463–72, jul. 2007.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 331–341, jul. 2007.

GENONI, G. et al. Obesity and infection: two sides of one coin. **European journal of pediatrics**, Heilderberg, v. 173, n. 1, p. 25–32, jan. 2014.

GERBER, P. J. et al. **Tackling Climate Change Through Livestock - A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities**. Rome: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3437e/i3437e.pdf>>.

GOMES, R. C. et al. Protein synthesis and degradation gene SNPs related to feed intake, feed efficiency, growth, and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and molecular research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 2923–36, jan. 2013.

GOMES, R. DA C. et al. Hematological profile of beef cattle with divergent residual feed intake, following feed deprivation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1105–1111, set. 2011.

GOMES, R. DA C.; SAINZ, R. D.; LEME, P. R. Protein metabolism, feed energy partitioning, behavior patterns and plasma cortisol in Nellore steers with high and low residual feed intake. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 42, n. 1, p. 44–50, jan. 2013.

GRÖHN, Y.; LINDBERG, L. A. Methodological aspects of the microscopy of bovine liver biopsies. **Journal of comparative pathology**, London, v. 92, n. 4, p. 567–78, out. 1982.

HAFNER, M.; REZEN, T.; ROZMAN, D. Regulation of Hepatic Cytochromes P450 by Lipids and Cholesterol. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 12, n. 2, p. 173–185, 2011.

HAYES, B. J.; LEWIN, H. A.; GODDARD, M. E. The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. **Trends in genetics**, Netherlands, v. 29, n. 4, p. 206–14, abr. 2013.

HEGDE, V.; DHURANDHAR, N. V. Microbes and obesity--interrelationship between infection, adipose tissue and the immune system. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 314–20, abr. 2013.

HEGLIND, M. et al. Lack of the Central Nervous System- and Neural Crest-Expressed Forkhead Gene Foxs1 Affects Motor Function and Body Weight. **Molecular And Cellular Biology**, Sarreguemines, v. 25, n. 13, p. 5616–5625, 2005.

HERD, R. M.; ARTHUR, P. F. Physiological basis for residual feed intake. **Journal of animal science**, Champaign, v. 87, n. 14 Suppl, p. E64–71, 1 abr. 2009.

HERD, R. M.; ODDY, V. H.; RICHARDSON, E. C. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 44, n. 5, p. 423, 2004.

HILL, D. H. **Cattle and Buffalo Meat Production in the Tropics**. London: Longman Scientific & Technical, 1989.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, London, v. 444, n. 7121, p. 860–7, 14 dez. 2006.

HU, Z.-L. et al. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. **Nucleic acids research**, London, v. 41, n. Database issue, p. D871–9, 1 jan. 2013.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic acids research**, London, v. 37, n. 1, p. 1–13, jan. 2009.

HUDSON, N. J.; DALRYMPLE, B. P.; REVERTER, A. Beyond differential expression: the quest for causal mutations and effector molecules. **BMC genomics**, London, v. 13, p. 356, jan. 2012.

HUDSON, N. J.; REVERTER, A.; DALRYMPLE, B. P. A differential wiring analysis of expression data correctly identifies the gene containing the causal mutation. **PLoS computational biology**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e1000382, maio 2009.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York, Academic Press, 1966. p. 533

HUNTINGTON, G. B. et al. Net absorption and oxygen consumption by Holstein steers fed alfalfa or orchardgrass silage at two equalized intakes. **Journal of animal science**, Champaign, v. 66, n. 5, p. 1292–302, maio 1988.

IINUMA, N. et al. Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. **Peptides**, v. 31, n. 5, p. 865–71, maio 2010.

JACOB BLACKMON, B. et al. Characterization of a human and mouse tetrapyrrole-binding protein. **Archives of biochemistry and biophysics**, Orlando, v. 407, n. 2, p. 196–201, 15 nov. 2002.

JOUANY, J. P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **The Journal of nutrition**, v. 126, n. 4 Suppl, p. 1335S–46S, abr. 1996.

K. M. RETALLICK, D. B. FAULKNER, S. L. RODRIGUEZ-ZAS, J. D. N. AND D. W. S. Relationship among performance, carcass, and feed efficiency characteristics and their ability to predict economic value in the feedlot. **Journal of animal science**, Champaign, 28 out. 2013.

KADARMIDEEN, H. N.; WATSON-HAIGH, N. S. Building gene co-expression networks using transcriptomics data for systems biology investigations : Comparison of methods using microarray data. **Bioinformation**, Chennai, v. 8, n. 18, 2012.

KADARMIDEEN, H. N.; WATSON-HAIGH, N. S.; ANDRONICOS, N. M. Systems biology of ovine intestinal parasite resistance: disease gene modules and biomarkers. **Molecular bioSystems**, London, v. 7, n. 1, p. 235–46, jan. 2011.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th. ed. [s.l.] Elsevier, 2008.

KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R. L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiological genomics**, Bethesda, v. 16, n. 2, p. 166–77, 15 jan. 2004.

KLEIN, J. et al. Adipose tissue as source and target for novel therapies. **Trends in endocrinology and metabolism**, New York, v. 17, n. 1, p. 26–32, 2006.

KNOCKAERT, L.; FROMENTY, B.; ROBIN, M.-A. Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity. **The FEBS journal**, Oxford, v. 278, n. 22, p. 4252–60, nov. 2011.

KOCH, R. M. et al. Efficiency of Feed Use in Beef Cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 22, p. 486–494, 1963.

ŁABAJ, P. P. et al. Characterization and improvement of RNA-Seq precision in quantitative transcript expression profiling. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 13, p. i383–91, 1 jul. 2011.

LANCASTER, P. A. et al. Phenotypic and genetic relationships of residual feed intake with performance and ultrasound carcass traits in Brangus heifers. **Journal of animal science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 3887–96, dez. 2009.

LANGFELDER, P.; HORVATH, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC bioinformatics**, London, v. 9, p. 559, jan. 2008.

LANGFELDER, P.; ZHANG, B.; HORVATH, S. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. **Bioinformatics**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 719–20, 1 mar. 2008.

LASCHET, J. J. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, Baltimore, v. 24, n. 35, p. 7614–22, 1 set. 2004.

LECHTENBERG, K. F. et al. Bacteriologic and histologic studies of hepatic abscesses in cattle. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 49, n. 1, p. 58–62, jan. 1988.

LECHTENBERG, K. F.; NAGARAJA, T. G. Hepatic ultrasonography and blood changes in cattle with experimentally induced hepatic abscesses. **American journal of veterinary research**, Chicago, v. 52, n. 6, p. 803–9, jun. 1991.

LIU, W.; YE, H. Co-expression network analysis identifies transcriptional modules in the mouse liver. **Molecular genetics and genomics**, Heidelberg, v. 289, n. 5, p. 847–53, out. 2014.

LÔBO, R. B. et al. Implementation of DNA Markers to Produce Genomically - Enhanced EPDs in Nellore Cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 55, n. 16, p. 23–27, 2011.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina. 1 ed. São Paulo: A. Luchiari Filho, 2000. 134p.** 1. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 134

MADER, C. J. et al. Relationships among measures of growth performance and efficiency with carcass traits, visceral organ mass, and pancreatic digestive enzymes in feedlot cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 1548–57, abr. 2009.

MALONE, J. H.; OLIVER, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC biology**, London, v. 9, p. 34, jan. 2011.

MARKUS, S. et al. Making Progress with Feed Efficiency - the case for RFI. **Agriculture and Rural Development**, Alberta, 2014.

MÁRQUEZ, G. C. et al. Quantitative trait loci with effects on feed efficiency traits in Hereford x composite double backcross populations. **Animal genetics**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 986–8, dez. 2009.

MAZA, E. et al. Comparison of normalization methods for differential gene expression analysis in RNA-Seq experiments A matter of relative size of studied transcriptomes. **Comunicative and Integrative Biology**. n. December, p. 1–9, 2013.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. J. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. [s.l.] Elsevier, 2007.

MICHOEL, T. et al. Validating module network learning algorithms using simulated data. **BMC bioinformatics**, London, v. 8 Suppl 2, n. Suppl 2, p. S5, jan. 2007.

MOORE, S. S.; MUJIBI, F. D.; SHERMAN, E. L. Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 87, n. 14 Suppl, p. E41–7, abr. 2009.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature methods**, New York, v. 5, n. 7, p. 621–8, jul. 2008.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 4, n. 4, p. 315–22, abr. 2003.

NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Liver abscesses in feedlot cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 351–69, ix, jul. 2007.

NKRUMAH, J. D. et al. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 145–53, jan. 2006.

NKRUMAH, J. D. et al. Primary genome scan to identify putative quantitative trait loci for feedlot growth rate, feed intake, and feed efficiency of beef cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 3170–81, dez. 2007.

NORLIN, M.; WIKVALL, K. Enzymes in the Conversion of Cholesterol into Bile Acids. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 7, n. 2, p. 199–218, 1 mar. 2007.

O'SHEA, D. et al. Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity. **Clinical pharmacology and therapeutics**, St. Louis, v. 56, n. 4, p. 359–67, out. 1994.

OLTEAN, S.; BATES, D. O. Hallmarks of alternative splicing in cancer. **Oncogene**, Besingstok, v. 33, n. 46, p. 5311–5318, 16 dez. 2013.

ORDOVAS, J. M.; CORELLA, D. Nutritional genomics. **Annual review of genomics and human genetics**, Palo Alto, v. 5, p. 71–118, jan. 2004.

OWENS, F. N. et al. Acidosis in cattle: a review. **Journal of animal science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 275–86, jan. 1998.

P. S. OLIVEIRA, M. N. BONIN, J. B. S. F. **Saiba como fazer um hipômetro de baixo custo para medidas morfológicas de animais de produção.**

Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/saiba-como-fazer-um-hipometro-de-baixo-custo-para-medidas-morfologicas-de-animais-de-producao/>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

PAREEK, C. S.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of applied genetics**, Heidelberg, v. 52, n. 4, p. 413–35, nov. 2011.

PATEL, A. K. et al. Identification of novel splice variants in horn cancer by RNA-Seq analysis in Zebu cattle. **Genomics**, San Diego, v. 101, n. 1, p. 57–63, jan. 2013.

PONSUKSILI, S. et al. Correlated mRNAs and miRNAs from co-expression and regulatory networks affect porcine muscle and finally meat properties. **BMC genomics**, London, v. 14, p. 533, jan. 2013.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 279, 1992.

RAPAPORT, F. et al. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. **Genome biology**, London, v. 14, n. 9, p. R95, jan. 2013.

RAUCY, J. L. et al. Induction of cytochrome P450IIE1 in the obese overfed rat. **Molecular pharmacology**, Bethesda, v. 39, n. 3, p. 275–80, mar. 1991.

RICHARDSON, E. C. et al. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 44, n. 5, p. 441, 2004.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 139–40, 1 jan. 2010.

ROLF, M. M. et al. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Animal genetics**, Oxford, 24 out. 2011.

SAITO, R. et al. Function of adrenomedullin in inflammatory response of liver against LPS-induced endotoxemia. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Oxford, v. 120, n. 9, p. 706–11, set. 2012.

SANTANA, M. H. et al. Genome-wide association analysis of feed intake and residual feed intake in Nellore cattle. **BMC genetics**, London, v. 15, n. 1, p. 21, jan. 2014a.

SANTANA, M. H. A. et al. Feed efficiency and its correlations with carcass traits measured by ultrasound in Nellore bulls. **Livestock Science**, Netherlands, v. 145, n. 1-3, p. 252–257, maio 2012.

SANTANA, M. H. A. et al. Blood cell and metabolic profile of Nellore bulls and their correlations with residual feed intake and feed conversion ratio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 14, n. 3, p. 527–537, 2013.

SANTANA, M. H. A. et al. Genetic parameter estimates for feed efficiency and dry matter intake and their association with growth and carcass traits in Nellore cattle. **Livestock Science**, Netherlands, v. 167, p. 80–85, set. 2014b.

- SAREMI, B. et al. Technical note: identification of reference genes for gene expression studies in different bovine tissues focusing on different fat depots. **Journal of dairy science**, Savoy, v. 95, n. 6, p. 3131–8, 6 jun. 2012.
- SAWA, A. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 21, p. 11669–11674, 14 out. 1997.
- SEGAL, E. et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. **Nature genetics**, New York, v. 34, n. 2, p. 166–76, jun. 2003.
- SHAH, K. G. et al. Resuscitation of uncontrolled traumatic hemorrhage induced by severe liver injury: the use of human adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1. **The Journal of trauma**, Hagerstown, v. 69, n. 6, p. 1415–21; discussion 1421–2, dez. 2010.
- SHERMAN, E. L. et al. Fine mapping quantitative trait loci for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 37–45, jan. 2009.
- SHERMAN, E. L.; NKRUMAH, J. D.; MOORE, S. S. Whole genome single nucleotide polymorphism associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v. 88, n. 1, p. 16–22, jan. 2010.
- SHOCKLEY, K. R. et al. Effects of atherogenic diet on hepatic gene expression across mouse strains. **Physiological genomics**, Bethesda, v. 39, n. 3, p. 172–82, 6 nov. 2009.
- SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; MAKKAR, H. P. Studies on the nutritional composition and antinutritional factors of three different germplasm seed materials of an under-utilized tropical legume, *Mucuna pruriens* var. *utilis*. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 48, n. 12, p. 6048–60, dez. 2000.
- SIROVER, M. A. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. **Journal of cellular biochemistry**, New York, v. 66, n. 2, p. 133–40, 1 ago. 1997.
- STEINMETZ, L. M.; DAVIS, R. W. Maximizing the potential of functional genomics. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 5, n. 3, p. 190–201, mar. 2004.
- STOCKHAM, L. S.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2nd. ed. Victoria: Blackwell Publishing, 2008. p. 729
- STOVER, P. J. Nutritional genomics. **Physiological genomics**, Bethesda, v. 16, n. 2, p. 161–5, 15 jan. 2004.

SWAMI, M. Networking complex traits. **Nature Reviews Genetics**, London v. 10, n. April, p. 2566, 2009.

TABAS-MADRID, D.; NOGALES-CADENAS, R.; PASCUAL-MONTANO, A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. **Nucleic acids research**, London, v. 40, n. Web Server issue, p. W478–83, jul. 2012.

TARZE, A. et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**, Basingstoke v. 26, n. 18, p. 2606–20, 19 abr. 2007.

TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature protocols**, London, v. 7, n. 3, p. 562–78, mar. 2012.

TRAPNELL, C. et al. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. **Nature biotechnology**, New York, v. 31, n. 1, p. 46–53, jan. 2013.

TURK, R. et al. Lipid mobilisation and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period. **Animal reproduction science**, Netherlands, v. 141, n. 3-4, p. 109–15, out. 2013.

UNITED NATIONS, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, P. DIVISION. **World Population Prospects: The 2010 Revision, Highlights and Advance Tables Population (English Edition)**. New York: [s.n.].

VEIRA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. **Journal of animal science**, Champaign, v. 63, n. 5, p. 1547–60, nov. 1986.

VOY, B. H.; ARONOW, B. J. Embrace diversity! Systems genetics-enabled discovery of disease networks. **Physiological genomics**, Bethesda, v. 39, n. 3, p. 169–71, 6 nov. 2009.

W. M. SNELLING, R. A. CUSHMAN, J. W. KEELE, C. MALTECCA, M. G. THOMAS, M. R. S. F.; REVERTER, A. J. BREEDING AND GENETICS SYMPOSIUM: Networks and pathways to guide genomic selection. **Journal of animal science**, Champaign, v. 91, p. 537–552, 2013.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 39, n. 8, p. 971–974, 1967.

WIESER, M. F. et al. Intensive beef production. 8. The effect of chlortetracycline on growth, feed utilisation and incidence of liver abscesses in barley beef cattle. **Animal Production**, Pencaitland, v. 8, n. 03, p. 411–423, 2 set. 2010.

ZHANG, B.; HORVATH, S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. **Statistical applications in genetics and molecular biology**, Berlin, v. 4, n. 1, p. Article17, jan. 2005.

ZHANG, Z. H. et al. A Comparative Study of Techniques for Differential Expression Analysis on RNA-Seq Data. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, p. e103207, 13 ago. 2014.

ZHENG, Q.; WANG, X.-J. GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 36, n. Web Server issue, p. W358–63, 1 jul. 2008.