FRANCISCO JOSÉ DE NOVAIS

Caracterização do metaboloma sérico de bovinos Nelore e sua potencial
associação à eficiência alimentar

Pirassununga
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FRANCISCO JOSÉ DE NOVAIS

Caracterização do metaboloma sérico de bovinos Nelore e sua potencial
associação à eficiência alimentar

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 ciências.

Orientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Pirassununga
2017

Aos meus pais amados Lúcia e Benedito, pelo amor incondicional e inestimável, a toda educação e carinho que me fazem entender o que é ser humano, por exemplo de honestidade e humildade que hoje me definem como homem e a todo incentivo e esperança na busca dos meus sonhos;

Aos meus irmãos de amizade e grandes companheiros Demétrio Godoy, Pedro Xavier, Heidge Fukumasu e Thiago Walderez que durante esses anos me ensinaram o equilíbrio entre a vida profissional e pessoal: vocês possuem influências e inspirações diretas na minha vida.

Dedico

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer meu orientador, **Prof. Dr. Heidge Fukumasu**, pela plena orientação, apoio e suporte, mais do que isso, por ter acreditado em mim para desenvolver essa pesquisa.

“Sempre por via irá direita

Quem do oportuno tempo se aproveita. ”

Luís Vaz Camões

Ao **Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz**, pela cumplicidade e suporte na elaboração e condução do trabalho;

Ao **Dr. Pedro Ratto (Pedrinho)**, por ter me ensinado os conceitos de metabolômica, pela ajuda na escolha e teste do protocolo, ajuda na extração metabólitos, suporte e a todos os bons momentos. Sempre com sorriso no rosto e disposto a ajudar, esse trabalho não teria sido realizado sem você!

A **Pâmela Almeida Alexandre**, sou grato por todos os momentos e todo conhecimento compartilhado.

Ao **Dr. Amadeu Hoshi Iglesias**, pela capacidade técnica e compromisso com a qualidade do projeto.

Ao **Prof. Dr. Mark Styczynski** e seus alunos **Rob, Yan, Mareen, Amy, Monica e Daniel** da Georgia Institute of Technology, por todo conhecimento compartilhado e técnica ensinada. Não obstante, agradeço a toda a hospitalidade dada.

Aos meus grandes companheiros **Pedro Xavier, Gerson Azuma, Nicholas, Sahin e Michael** com quem compartilhei contas a pagar e risadas.

Ao povo do GMAB em especial **Pâmela, Gerson, Miguel, Leydiane e Elisangela**, pelas discussões geradas e auxílio nos amadurecimentos de ideias em eficiência alimentar, genética e genômica.

Ao povo do LOCT, em especial ao **Pedro, Yonara, Pedrinho e Nina**, que são fiéis colegas de trabalho e inspiração de seriedade e compromisso.

Ao meu primo e psicólogo **Thiago Walderez**, por todas as horas que estive do meu lado nos momentos alegres e felizes ou de tristezas e incertezas. Sem você esse trabalho teria se tornado muito mais difícil!

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de mestrado (proc. 2015/01059-4) e estágio de pesquisa no exterior (BEPE proc. 2016/16214-8).

A **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP)** e a todos seus funcionários pela estrutura e serviços prestados a esse estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeito de diluição de manutenção conferido pelo aumento a taxa de crescimento em touros do ano de 2007 em relação aos de 1977 no sistema estadunidense de produção de carne. FONTE: CAPPER, J. L., The environmental impact of beef production in the United States: 1977 compared with 2007, Journal of Animal Science, Vol. 89, nº 12, p. 4255, 2011.	17
Figura 2- Distribuição dos animais confinados e dos grupos selecionados divergentemente para CAR. Grupos: em vermelho o grupo de alta eficiência alimentar (HFE); em azul o grupo de baixa eficiência alimentar (LFE); em verde os animais sem atribuição aos grupos.	37
Figura 3- Perfil cromatográfico de amostras sem padrão interno baseadas nos protocolos: Rosa (DUNN, et al (2011)); azul (NZOUGHET, et al (2015)); preto (padrão interno em solução aquosa).	45
Figura 4 -Perfil cromatográfico de amostras com inserção do padrão interno antes da precipitação de proteínas baseadas nos protocolos: Rosa (DUNN, et al (2011)); azul (NZOUGHET, et al (2015)); preto (padrão interno em solução aquosa).	45
Figura 5- Perfil cromatográfico de amostras com inserção do padrão interno após a precipitação de proteínas baseadas nos protocolos: Rosa (DUNN, et al (2011)); azul (NZOUGHET, et al (2015)); preto (padrão interno em solução aquosa).	46
Figura 6- Pelete observado nas amostras de soro bovino após o descongelamento que antecede a extração de metabólitos desse estudo.	46
Figura 7- Distribuição do Fold-change $\log_2$ nos modos positivo (1) e negativo (2) utilizando o software Progenesis QI (A e B) e o software XCMS (C e D).	47
Figura 8- Análise de componentes principais separando replicatas técnicas com os resultados provindos do XCMS após QA nos modos negativo (A e B) e positivo (C e D).	48
Figura 9- Análise de componentes principais separando replicatas técnicas com os resultados provindos do PROGENESIS QI após QA nos modos negativo (A e B) e positivo (C e D).	49
Figura 10- Distribuição dos analitos antes (esquerda) e depois (direita) da normalização e transformação de escala e $\log_2$ das intensidades no modo negativo.	50
Figura 11- Distribuição do fold-change (A) e Volcano plot do grupo de alta e baixa eficiência alimentar (B).	51
Figura 12- Análises multivariadas no modo negativo de aquisição: PCA (A); PLS-DA (B)...	53
Figura 13- Distribuição dos analitos antes (esquerda) e depois (direita) da normalização e transformação de escala e $\log_2$ das intensidades no modo negativo.	54
Figura 14- Distribuição do Fold-change (A) e Volcano plot do grupo de alta e baixa eficiência alimentar (B).	55

Figura 15- Análises multivariadas no modo negativo de aquisição: PCA (A); PLS-DA (B)....	56
Figura 16- Análise SAM para os analitos no modo positivo.....	57
Figura 17- Diferença de concentração do analito de tempo de retenção 4 minutos e massa-carga 183,1670 entre os grupos de alta (HFE) e baixa (LFE) eficiência alimentar.....	58
Figura 18- Agrupamento das amostras para identificação de outliers: amostra 15 excluída;	59
Figura 19- Dendograma dos analitos e cores dos módulos correspondentes.	59
Figura 20- Correlações entre os módulos e medidas de consumo alimentar residual (CAR). Em caixa vermelha destaca-se os módulos que apresentam correlações significativas à característica.....	61
Figura 21- Correlação entre a contribuição dos analitos e sua importância para o CAR no módulo Turquoise (A); Analitos (m/z) e suas contribuições (FM em tamanho) para o módulo (B).	62
Figura 22- Agrupamento das amostras para identificação de outliers: amostra 15 excluída.	64
Figura 23- Dendograma dos analitos e cores dos módulos correspondentes.	64
Figura 24- Correlações entre os módulos e medidas de consumo alimentar residual (CAR). Em caixas vermelhas destaca-se os módulos que apresentam correlação à característica.	65
Figura 25. Correlação entre a contribuição dos analitos e sua importância para o CAR no módulo Turquoise; Analitos (m/z) e suas contribuições (FM em tamanho) para o módulo. ...	66
Figura 26- Modelo esquemático das hipóteses geradas a partir dos resultados que predizem a variação do CAR.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Corridas cromatográficas do Projeto piloto; Protocolo 1: Dunn, et al (2011); Protocolo 2: Nzoughet et al. (2015); IS: cloropropamida.	39
Tabela 2. Programação de gradiente do sistema cromatográfico.	39
Tabela 3- Números de analitos inferidos nos modos negativo e positivo utilizando o software Progenesis QI (Waters) e o software gratuito XCMS, antes e depois do critério de qualidade (QA).	47
Tabela 4- Analitos no modo negativo com fold change maiores que 2 entre os grupos de alta (HFE) e baixa (LFE) eficiência alimentar.	52
Tabela 5- Analitos com fold change maiores que 0,45 entre os grupos de alta (HFE) e baixa (LFE) eficiência alimentar.	57
Tabela 6- Metabólitos centrais do módulo Turquoise, do modo negativo, sua afinidade com o módulo (FM) e sua correlação com o CAR (GS) e valores de significância, respectivamente.	63
Tabela 7- Metabólitos centrais do módulo Turquoise do modo positivo, sua afinidade com o módulo (FM) e sua correlação com o CAR (GS) e valores de significância, respectivamente.	67
Tabela 8- Vias metabólicas associadas à eficiência alimentar preditas pelo mummichog (valor de $P < 0.01$).	68

RESUMO

NOVAIS, F.J. Caracterização do metaboloma sérico de bovinos Nelore e sua potencial associação à eficiência alimentar. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A seleção de animais para consumo alimentar residual (RFI) está intrinsecamente associada com a diminuição do consumo matéria seca e é independente do ganho de peso corporal, selecionando animais de eficiência produtiva e econômica, além também de diminuir a emissão de gases de efeito estufa provinda do gado. Neste estudo, amostras de soro de 16 animais selecionados divergentemente para eficiência de alimentação foram coletadas antes do confinamento (dia -21) e avaliadas em uma abordagem metabolômica global, com o objetivo de usar análise diferencial, análise de co-expressão e enriquecimento funcional, identificando marcadores para eficiência de alimentação antes do confinamento. Um analito foi diferencialmente presente entre os animais de baixo e alto RFI. A análise WGCNA identificou 22 e 25 módulos no modo positivo e negativo, respectivamente e, 1 módulo de cada modo foi fortemente associado a RFI ($r = 0,53$, p -valor $<0,05$ e $r = 0,52$, p -valor $<0,1$ nos modos negativo e positivo, respectivamente). A análise de enriquecimento funcional prediz 13 processos biológicos associados à eficiência alimentar, incluindo alterações no metabolismo de vitaminas lipossolúveis, inflamação, estresse oxidativo, metabolismo de aminoácidos e metabolismo de ácidos graxos. Esse trabalho evidencia a possibilidade de se identificar um biomarcador para eficiência alimentar e também sugerem que as diferenças nas respostas ao estresse oxidativo e nos processos inflamatórios já influenciam na variação da eficiência alimentar previamente ao confinamento.

Palavras-chave: Metabolômica, Eficiência alimentar, metabólitos, Nelore

ABSTRACT

NOVAIS, F.J. Serum metabolite characterization and their potential association with feed efficiency in Nellore cattle. 92 p. M.Sc. Dissertation– Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Animal selection for residual feed intake (RFI) is intrinsically associated with decreased consumption of dry matter independent of body weight gain, selecting yielding increased production and economic efficiency but also decreasing the greenhouse gas emission of livestock. In this study, serum samples of 16 animals selected for divergent feed efficiency were collected prior to feedlot (day -21) and evaluated in an untargeted metabolomics approach, with the goal of using differential analysis, co-expression analysis and functional enrichment to identifier markers for feed efficiency prior to the feedlot. One feature was differentially accumulated between low and high RFI. WGCNA analysis identified 22 and 25 modules in positive and negative mode, respectively, of 1 module of each mode was strongly associated with RFI ($r= 0.53$, $p\text{-value} < 0.05$ and $r=0.52$, $p\text{-value} < 0.1$ to negative and positive mode, respectively). Pathway enrichment analysis yielded 13 biological processes associated with feed efficiency including alterations in vitamins liposoluble metabolism, inflammation, oxidative stress, amino acid metabolism and fatty acid metabolism. Our findings suggest the possibility to identify a biomarker for feed efficiency and also discuss that differences in oxidative stress responses and inflammatory processes could explain the feed efficiency variation prior to feedlot.

Keywords: Metabolomics, Feed efficiency, metabolite, Nellore.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Desafios da agropecuária mundial e brasileira em função do crescimento populacional	14
2.2. A Eficiência alimentar e seu impacto na produção	18
2.3. A eficiência alimentar possui bases moleculares	21
2.4. Estudo moleculares na eficiência alimentar	24
2.5. A Metabolômica e suas características.....	26
2.6. A metabolômica aplicada a animais domésticos	32
3. HIPÓTESES	34
4. OBJETIVOS	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS:	36
5.1. Animais e coleta dos dados fenotípicos	36
5.2. Coleta das amostras biológicas.....	38
5.3. Projeto piloto: determinação do protocolo de extração de metabólitos	38
5.4. Preparação das amostras	39
5.5. Análises UPLC-ESI-QTOF-MS.....	40
5.6. Processamento dos dados pelo programa XCMS	41
5.7. Processamento dos dados pelo programa Progenesis Q1.....	41
5.8. Análises estatísticas uni e multivariadas	42
5.9. Análise de co-expressão de metabólitos	43
5.10. Enriquecimento funcional por predição dos metabólitos.....	44
6. RESULTADOS:	45
6.1. Determinação do protocolo para extração de metabólitos.....	45
6.2. Pre-processamento dos dados metabolômicos.....	46
6.3. Análise diferencial do metaboloma no modo negativo	50
6.4. Análise diferencial do metaboloma no modo positivo.....	54
6.5. Análises de co-expressão de metabólitos no modo negativo.....	58
6.7. Enriquecimento funcional	67
7. DISCUSSÃO	69
7.1. Determinação do protocolo para extração de metabólitos.....	69
7.2. Pre-processamento dos dados metabolômicos.....	69
7.3. Análise diferencial do metaboloma	70
7.4. Análises de co-expressão de metabólitos	72
7.5. Enriquecimento funcional	75
8. CONCLUSÃO	80

9.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	80
10. REFERENCIAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

Projeções demográficas mostram que a população mundial em 2050 será de mais de 9 bilhões de habitantes, gerando uma grande demanda de consumo de alimentos (FAO, 2012). Em função disso, a produção de alimentos deverá dobrar, tanto para ofertar a mesma quantidade de energia *per capita* disponível atualmente quanto para suprir a crescente demanda de países em desenvolvimento.

A carne bovina é um dos alimentos mais nutritivos utilizado na alimentação humana e o aumento de sua produção pode ser alcançado aumentando o número de animais e/ou a eficiência na produção animal. A criação de gado é o setor pecuário que mais utiliza terras no mundo e consome parte significativa do espaço que poderia ser utilizado para produção mundial de grãos. Assim, o desafio se mostra em aumentar a produção de carne utilizando menos área e com animais que aproveitam mais da energia ingerida, diminuindo a competitividade de consumo de alimentos entre animais e humanos. Tendo em vista esse cenário, o termo eficiência alimentar (unidade de produto obtido por unidade de insumos ingeridos) ganha importância de tal maneira que, quanto maior essa eficiência, menor será a quantidade de insumos para produzir a mesma ou maior quantidade de carne.

A seleção de animais de alta eficiência alimentar está inerentemente ligada a uma diminuição do alimento consumido pelo animal e/ou ao maior desempenho de ganho de peso, assim, esses animais são mais econômicos e mais sustentáveis, já que também produzem menos gases de efeito estufa e dejetos. Por isso, são justificáveis estudos com aplicabilidade em eficiência alimentar, pois tem grande impacto econômico, social e sustentável na produção de bovinos de corte. Porém, a identificação desses animais só pode ser inferida após um período considerável de coleta de informações, já que demanda de muitas mensurações, o que inviabiliza essa identificação a nível comercial. Uma estratégia para lidar com essa limitação é a identificação de marcadores de DNA para seleção genômica destes animais mais eficientes, onde variados trabalhos já demonstraram existir marcadores ligados à esta característica (ALEXANDRE et al., 2014; BARENDSE et al., 2007; GOMES et al., 2013; SANTANA et al., 2015; SHERMAN et al., 2008). Entretanto, a aplicação desta tecnologia não garante 100% de sucesso devido à baixa moderada herdabilidade da característica (HERD; BISHOP, 2000; NKURUMAH et al., 2007). Desta forma, a

identificação de outros potenciais biomarcadores associados à alta eficiência alimentar, identificando animais de forma prévia ao período de confinamento, por exemplo e, ajudando no manejo de lotes e distribuição de dietas seria de extrema valia para a sustentabilidade desta cadeia produtiva.

Os estudos em metabolômica (análise global de metabólitos em determinada amostra biológica), têm encontrado inúmeros marcadores fisiológicos que são utilizados como teste-diagnóstico de doenças, de disfunções metabólicas e de exames *anti-dopping*. Além disso, a metabolômica tem auxiliado na elucidação de vias metabólicas e na fisiologia de características complexas tanto em plantas quanto em animais de produção. Assim, determinar potenciais vias metabólicas a partir do metaboloma associadas a eficiência alimentar auxiliaria na utilização desta característica na indústria da carne. Dessa forma, o objetivo do presente projeto foi caracterizar o metaboloma sérico de animais Nelore e sua potencial associação com a eficiência alimentar.

O Grupo de Melhoramento Animal, Biotecnologia e Transgenia (GMABT/USP) é referência há mais de 25 anos na área de melhoramento genético e, mais recentemente em biotecnologia animal, sob a tutela dos professores doutores José Bento Serman Ferraz, Joanir Pereira Eller, Flávio Vieira Meirelles e mais recentemente Heidge Fukumasu. Parte das pesquisas desenvolvidas nesse grupo tem se atentado a importância da eficiência alimentar, baseado nas projeções de mercado e crescimento demográfico mundial, como um caminho viável para a busca de animais produzindo mais por área, com economia e sustentabilidade. Nesse sentido deve-se ressaltar a recente aprovação do projeto temático “Genômica Aplicada à Produção de Ruminantes” (Proc. FAPESP 2014/07566-2), que propõe experimentos baseados em abordagens de genética de sistemas para estudo do fenótipo de eficiência alimentar em bovinos Nelore. Dessa forma, o escopo de iniciarmos análises metabolômicas e integrá-las ao grupo de pesquisa vinculando-as a este fenótipo é de extrema importância para a produção de bovinos de corte no Brasil.

Portanto, este estudo foi gerado a partir da hipótese de que há diferença entre o metaboloma de animais de alta e baixa eficiência alimentar na raça Nelore previamente ao confinamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Desafios da agropecuária mundial e brasileira em função do crescimento populacional

Os ruminantes possuem uma enorme significância para desenvolvimento da sociedade humana, pois esses animais convertem a energia estocada nos polímeros derivados da biomassa das plantas, em alimentos mais digestíveis para humanos (AJMONE-MARSAN; GARCIA; LENSTRA, 2010). Por esse motivo, estes animais foram domesticados e compartilham o espaço conosco desde a era Neolítica (cerca de 8.800 antes de Cristo), criando-os com a finalidade de produzir proteína animal na forma de carne e leite (SHABAT et al., 2016). Atualmente, os ruminantes possuem grandes influências tanto culturais, quanto no mercado financeiro mundial.

O Brasil tem grande destaque na produção de carne a âmbito internacional, sendo o segundo maior produtor e maior exportador de carne do mundo, contribuindo com um quinto das exportações mundiais (USDA, 2016). Produziu 9,284 milhões de toneladas em equivalente de carcaça em 2016, ficando atrás somente dos Estados Unidos, que produziu 11,389 milhões de toneladas no mesmo período. Da produção do Brasil, quase 80% são para consumo interno (7,499 milhões de toneladas) e o excedente é exportado (1,850 milhões de toneladas), principalmente para Hong Kong, Rússia, União Europeia (EU 28), Venezuela, Egito e outros 150 países (MAPA, 2016).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), a taxa de crescimento da produção nacional de carne bovina no período de 2015/16 a 2025/2026 é estimada em 2,4% ao ano, ao mesmo tempo em que a projeção de aumento das demandas interna e externa por carne bovina no mesmo período será de 1,5% e 3,1%, respectivamente. Dessa forma, acompanhar esse aumento de demanda se torna um desafio para o setor pecuário nacional, além disso, há uma expectativa de que até 2024 a produção nacional de carnes suprirá 44,5% do mercado internacional (USDA, 2016).

Mesmo o Brasil ocupando uma importante posição no cenário mundial, ainda se mostra bastante ineficiência no setor. Segundo o departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016) o Brasil possui 219,18 milhões de cabeça de bovinos, 238% a mais do que os Estados Unidos (91,988 milhões). Mesmo possuindo mais do que o dobro da quantidade de animais, o Brasil produz menos em equivalente de

carcaça do que os Estados Unidos. Segundo Silveira, et al. (2010) a taxa de desfrute nacional se encontra em torno de 22%, ao passo que nos Estados Unidos essa taxa chega a 37%. Um dos fatores que contribuem para a menor taxa de desfrute nacional deve-se ao fato que somente 5,6% dos animais são terminados em sistema intensivo (LANNA; ALMEIDA, 2005). A maioria da produção nacional acontece a pasto, no qual o clima, principalmente as chuvas, interfere diretamente na quantidade e qualidade das pastagens, causando influência na oferta e preço de carne (ABIEC, 2015).

Cerca 80% do rebanho nacional é composto por animais de raças zebuínas (*Bos indicus*), que são animais de comprovada rusticidade e adaptação ao clima tropical. Dentre estas raças, podemos destacar o Nelore e anelorados, com 90% desta parcela (OLIVEIRA; BARBOSA, 2014). Apesar dos bovinos da raça Nelore serem bem adaptados às condições tropicais, tanto na aceitação de pastagens de baixa qualidade nutricional quanto pela alta resistência a endo e ecto parasitas, esses animais apresentam menor precocidade reprodutiva e crescimento muscular em relação à raças taurinas (SILVEIRA, et al., 2010). Todos esses fatores fazem com que o boi brasileiro seja abatido em média aos 36 meses de idade, ou seja, de 12 a 18 meses a mais que a média norte-americana. Por isso, devido ao potencial produtivo brasileiro, são necessários estudos com aplicabilidade no setor onde seja focada a melhora nas taxas de desfrute atuais dos rebanhos nacionais.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2012), a população mundial em 2050 terá 9,15 bilhões de habitantes o que causará um impacto ainda maior na distribuição de alimentos e quantidade de energia ofertada *per capita* (kcal/pessoa/dia). A demanda de consumo de produtos provindos da agricultura cresce em média 1,1% ao ano, o que significa que a produção de alimentos mundial deverá aumentar em 60% até 2050, para continuar ofertando a mesma quantidade de energia *per capita* disponível atualmente (FAO, 2012). Dentre os alimentos, a carne vermelha é uma das fontes mais nutritivas usadas no consumo humano, sendo principalmente fonte de proteínas de alta qualidade, ferro, vitamina A e vitaminas do complexo B (ABERLE, 2001). Em 35 anos, a carne terá uma demanda mundial de 3,3 milhões de toneladas/ano e um crescimento de demanda de 0,66% ao ano, de tal forma que ações imediatas são necessárias para o aumento da produção afim de suprir essa necessidade futura.

O aumento de produção de carne pode ser obtido ou pelo aumento de produtividade, ou expansão do número de animais ou por uma combinação destes (FAO, 2012). O aumento de produtividade é alcançado melhorando a taxa de desfrute e aumentando o peso de carcaça (FAO, 2012), fatores esses, decorrentes da soma da melhora do ambiente/manejo (clima, nutrição, sanidade, bem-estar, etc.) e o melhoramento genético (desempenho, fertilidade, características de carcaça, etc.). Já a expansão do número de animais é limitada, pois, a produção de gado é a que mais utiliza terras no mundo e consome 36% da produção mundial de grãos (THORNTON, 2010). Terras e recursos hídricos estão se tornando mais escassos, tanto por razões quantitativas (terra disponível per capita) quanto por razões qualitativas (degradação e erosão do solo, salinização de áreas irrigadas, desertificação, dentre outros). Somado a esses, mudanças climáticas aparecem como um fator que afetaria negativamente os potenciais de produção agrícola. Assim, Godfray et al. (2010) defende uma “intensificação sustentável de produção agrícola” que, extrapolando para produção animal, significaria aumentar a produção utilizando menos área e recursos, para se diminuir competitividade de consumo de alimentos entre animais e humanos de maneira sustentável.

Uma oferta de alimentos sustentável só pode ser atingida através da adoção de sistemas e práticas que tornem mais eficientes o uso dos recursos disponíveis e reduzam o impacto ambiental por unidade produzida, compreendido como eficiência produtiva (CAPPER et al., 2008). Os pesquisadores Capper, Cady e Bauman (2009) mostraram que o aumento da eficiência produtiva (quantidade recursos utilizados por unidade de alimento produzido) reduziu consideravelmente o impacto ambiental da unidade de leite produzida pela indústria estadunidense entre 1944 e 2007. O país reduziu em 64% o número de vacas e produziu 59% mais leite, como consequência, diminuíram em 41% as emissões de gases de efeito estufa. Assim, o aumento da eficiência produtiva levaria a redução do impacto ambiental causado pela produção de gado, em função do efeito de diluição de manutenção (CAPPER et al., 2008; CAPPER; CADY; BAUMAN, 2009).

O efeito de diluição de manutenção pode ser definido como a redução do requerimento de energia de manutenção em relação ao aumento da energia direcionada a produção pelo animal (CAPPER, 2011). Na figura 1 é possível compreender o conceito de diluição da manutenção, apesar do requerimento energético ser maior em

2007 quando comparado a 1977, uma combinação entre a redução do tempo de abate e aumento do rendimento de carcaça diminui a energia total usada para manutenção por quilograma de carne produzida (CAPPER, 2011). Assim, o aumento da eficiência produtiva pode contribuir para a redução do impacto ambiental causado pela produção de carne, conseguindo atingir as demandas de energia futuras de forma sustentável.

Figura 1- Efeito de diluição de manutenção conferido pelo aumento a taxa de crescimento em touros do ano de 2007 em relação aos de 1977 no sistema estadunidense de produção de carne. FONTE: CAPPER, J. L., The environmental impact of beef production in the United States: 1977 compared with 2007, *Journal of Animal Science*, Vol. 89, nº 12, p. 4255, 2011.

A eficiência energética do animal teria uma grande importância na eficiência produtiva, uma vez que essa eficiência traduz a capacidade do animal em utilizar energia provinda do alimento, com animais que produzem mais consumindo menos (BRADFORD, 1999; THORNTON, 2010). Como consequência, teríamos animais mais econômicos, de menor impacto ambiental e contribuindo para a diminuição da competição de alimentos entre humanos e animais ((WIDMANN et al., 2015). Apesar da eficiência alimentar não ser, por definição, um sinônimo diretamente relacionado a eficiência produtiva, é inevitável sua importante contribuição para o aumento produtivo com melhor aproveitamento de recursos alimentícios (BERRY; CROWLEY, 2013).

2.2. A Eficiência alimentar e seu impacto na produção

A alimentação é a variável de maior custo na pecuária e está diretamente relacionada a rentabilidade da produção (RAMSEY et al., 2005). Em bovinos, de 55% a 75% do custo total do sistema produtivo, ou seja desde o nascimento até o abate, são relacionados a custos com alimentação (NRC, 2000). Além disso, em gado de corte, somente 5% do total do consumo energético durante seu ciclo de vida é usado para a deposição de proteínas, enquanto que aves e suínos são mais eficientes, depositando 22 e 14%, respectivamente (BASARAB et al., 2003). As maiores razões para a menor eficiência em gado de corte são as baixas taxas reprodutivas e alto custo de manutenção, do total de energia da dieta, 70-75% é usado somente para o requerimento de manutenção (FERRELL; JENKINS, 1985; MONTAÑO-BERMUDEZ; NIELSEN; DEUTSCHER, 1990). Porém, a herdabilidade do requerimento de energia para manutenção em bovinos de corte é de moderada a alta ($h^2 = 0,22-0,71$), possibilitando a seleção de rebanhos com menor requerimento de manutenção, assim disponibilizando mais energia para produção (BISHOP, 1992; CARSTENS et al., 1989).

A eficiência alimentar em gado de corte pode ser definida como a geração de carne produzida em relação aos insumos consumidos, de modo que quanto maior essa relação maior a eficiência alimentar (BERRY; CROWLEY, 2013). Para fazer comparações entre indivíduos ou entre grupos de animais, pesquisadores têm considerado a eficiência alimentar expressa por índices que combinam o consumo e a produção do animal (ARCHER et al., 1999). O período de mensuração requerido para obtenção acurada das estimativas de eficiência alimentar, segundo Archer et al. (1997) deve ser de pelo menos 70 dias, descontados a aclimatização dos animais, com pesagens no mínimo a cada 2 semanas. Porém, Kearney et al. (2004) concluiu que usando sistema automático de pesagem enquanto os animais se alimentam esse período decai para 56 dias sem afetar a mensuração.

Archer et al. (1999) resumizam mais de 25 mensurações para eficiência alimentar que vem sendo propostas na literatura. A maioria destas descrevem a eficiência alimentar como a razão de entradas (alimentação, exemplo) e saídas produtivas (ganho de peso, por exemplo), porém essas mensurações podem ser

melhor categorizadas em duas: medidas relativas e medidas de regressão ou residuais (BERRY; CROWLEY, 2013).

As medidas relativas, mostram a razão entre medidas de insumos consumidos e produtos gerados, sendo os mais usuais: conversão alimentar (CA), eficiência parcial do crescimento, taxa de crescimento relativa e taxa Kleiber. A conversão alimentar foi tradicionalmente a medida mais adotada em gado de corte e é definida como a razão entre o consumo médio diário (CMD) por ganho de peso médio diário (GMD) e expresso pelo modelo: $CA = CMD(Kg)/GMD(Kg)$, do qual animais com menor relação, são mais eficientes (baixo CA) (BERRY; CROWLEY, 2013). Dentre outras medidas, a eficiência parcial do crescimento (KELLNER, 1910), é a razão entre o ganho de peso por insumos consumidos, descontados a energia de manutenção, assumindo o peso vivo médio durante o período de mensuração baseados em tabelas de requerimentos energéticos (por exemplo, NRC), dado pelo modelo ($EPC = GMD/(CMD - CMD_{manutenção})$). Já a taxa de crescimento relativo é definida como o crescimento relativo ao tamanho corporal, calculada através do modelo $TCR = 100(\log_e \text{Peso}_{início} - \log_e \text{Peso}_{final})/(\text{dias em teste})$ (FITZHUGH; TAYLOR, 1971). Enquanto a taxa de Kleiber, é definida como o ganho de peso por unidade de peso corporal metabólico, assim se o ganho de peso aumenta para o mesmo peso metabólico, há mais crescimento sem que haja aumento da energia de manutenção pelo animal, dado por $KR = (GMD/\text{Peso}_{médio}^{0,75})$ (KLEIBER, 1961). Embora a taxa de crescimento relativo e a taxa de Kleiber não serem mensurações de eficiência alimentar por definição, elas podem ser utilizadas como tal se os animais estiverem sobre a mesma dieta durante o período de teste (BERRY; CROWLEY, 2013).

As medidas relativas de eficiência alimentar são problemáticas pois a resposta a seleção é muito variável (GUNSETT, 1984; KENNEDY; VAN DER WERF; MEUWISSEN, 1993; VAN DER WERF, 2004). Além disso, a correlação genética entre um numerador (como CMD) e um denominador (como GMD) é positiva (BERRY, 2013; KOOTS et al., 1999), dessa maneira, a seleção baseada na CA resulta em um gado com crescimento mais rápido, porém com um aumento do tamanho adulto, da energia de manutenção e da ingestão de comida (ARCHER et al., 1999; BISHOP et al., 1991; CREWS, 2005; HERD; BISHOP, 2000; KELLY et al., 2010a, 2010b). Crowley et al. (2011) reportam correlação genética de -0,55 entre CA e idade ao primeiro parto e

0,21 de intervalo entre parto e primeiro estro, indicando que a seleção para CA prejudicaria ainda a fertilidade das fêmeas em função do maior tamanho corporal.

As medidas de regressões ou residuais são medidas que traduzem a diferença do consumo e/ou produto observado em relação ao consumo e/ou produto estimado e compreendem: consumo alimentar residual (CAR), ganho de peso residual (GPR) e o consumo e ganho residual (CGR). O CAR, também conhecido como eficiência alimentar líquida ("*net feed efficiency*", em inglês), tem se popularizado no gado de corte (EXTRON et al., 2000). Proposto por Koch et al. (1963), porém idealizada por Byerly (1941) é definida como a diferença entre o consumo observado e o consumo predito do animal com base na média de requerimentos de manutenção corporal e níveis de produção. O CAR é expresso pelo modelo $CMD = \mu + GMD + \text{Peso}_{\text{médio}}^{0,75} + CAR$, onde o CMD é consumo médio diário do animal, μ é média de consumo médio do grupo, GMD é ganho de peso médio diário, $\text{Peso}^{0,75}$ é o peso metabólico médio durante o teste e o CAR é o erro atribuído ao modelo.

Assim, o consumo poderia ser particionado em duas partes: 1) o consumo alimentar esperado, dado certo nível de produção e peso corporal; e 2) uma porção residual (HERD; ARTHUR, 2009). A porção residual do consumo poderia ser utilizado para identificar animais que se desviam de seus níveis de consumos esperados, de forma que animais mais eficientes teriam baixos (ou negativos) valores residuais (CAR) (HERD; ARTHUR, 2009). Além disso, por definição, o CAR é fenotipicamente independente das características de produção utilizadas para a predição do consumo, isso permite a comparação de animais em diferentes níveis de produção durante a mensuração (HERD; ARTHUR, 2009).

O ganho de peso residual é também proposto por Koch et al. (1963) como uma mensuração alternativa para identificar animais com eficiência para o ganho de peso. É uma medida similar ao CAR e definida como os resíduos provindos da regressão do GMD para dado consumo e peso metabólico. Ao contrário do CAR, resíduos positivos (animais crescendo mais que o esperado), são mais eficientes em ganho de peso. O GPR é expresso como $GMD = \mu + CMD + \text{Peso}_{\text{médio}}^{0,75} + GPR$, onde GMD é o ganho de peso médio diário do animal, μ é média de ganho de peso do grupo, CMD é consumo médio diário, $\text{Peso}^{0,75}$ é o peso metabólico médio durante o teste e o GPR é o erro atribuído ao modelo.

Por fim, o consumo e ganho residual (CGR) foi proposto por Berry e Crowley (2012), no qual o GPR e o CAR são padronizados (terem iguais variâncias) e então são somados (após inversão do sinal do CAR), expresso como $CGR = GPR + (-1) * CAR$, no qual identifica animais que consomem menos e ainda possuem maior ganho de peso. Esses autores questionam o uso do CAR em função da ausência de correlação entre esse e o ganho de peso, assim animais mais eficientes pelo CAR poderiam ser animais de crescimento lento, o que prejudicaria a indústria da carne. Assim, o CGR se mostra uma alternativa de mensuração, pois, estudos mostram que animais melhores ranqueados para CGR consomem menos para alcançar um ganho de peso desejável comparado aos animais melhores ranqueados somente para CAR ou GPR (BERRY; CROWLEY, 2012).

A independência do ganho de peso e manutenção para calcular o CAR, ou do consumo e manutenção para calcular o GPR, sugerem que as medidas residuais representam a variação inerente do animal provinda de processos metabólicos básicos (HERD; ARTHUR, 2009). Segundo Archer et al. (1999) entender esses processos responsáveis pela variação da eficiência alimentar são importantes por 3 razões.

Primeiro, o conhecimento das bases fisiológicas auxiliaria na previsão das possíveis respostas correlacionadas a seleção. Embora tal conhecimento não forneça uma previsão completa das consequências genéticas pela seleção, ajuda a fornecer uma indicação útil de onde os estudos devem ser concentrados na procura de respostas correlacionadas à seleção. Segundo, o conhecimento das bases fisiológicas permite identificar formas de mensurações mais fáceis e mais econômicas para a eficiência alimentar, sendo inclusive possível o uso de marcadores para seleção. Terceiro, o entendimento dos mecanismos fisiológicos que causam a variação da eficiência alimentar pode ser utilizado para manipular o ambiente e adaptar o animal e, assim, melhorar sua eficiência alimentar através de ferramentas não genéticas.

2.3. A eficiência alimentar possui bases moleculares

Segundo Herd, Oddy e Richardson (2004) há pelo menos 5 processos que possuem influências na variação da eficiência alimentar residual que compreendem:

1) padrões de ingestão; 2) digestão do alimento; 3) metabolismo (anabolismo e catabolismo associado com a variação da composição corporal; 4) atividade; 5) termorregulação.

As variações na quantidade ingerida afeta os requerimentos de manutenção, pois conforme aumenta o consumo, o montante de energia gasta para digestão aumenta (HERD; ARTHUR, 2009). Webster et al. (1975) observam um aumento no tamanho dos órgãos digestivos nos animais menos eficientes, como o tamanho do intestino, de modo que animais que comem menos poderiam ter menos energia desviada para suprir a demanda energética dos órgãos digestivos. O comportamento ingestivo (como taxa de ingestão e duração das refeições) também seriam associados a variação da eficiência alimentar, de tal maneira que animais de baixa eficiência passam mais tempo ingerindo alimentos e com visitas mais frequentes ao cocho ao longo do confinamento (ADAM et al., 1984; DOBOS; HERD, 2008; MONTANHOLI et al., 2010).

A digestão decai conforme há um aumento da ingestão relativa à manutenção (STANDING COMMITTEE ON AGRICULTURE, 2000). Animais identificados como de alta e baixa eficiência diferiram em 1% na habilidade de digestão da matéria seca quando alimentados com *pellet* com digestibilidade calculada em 64% (RICHARDSON et al., 1996). Herd, Oddy e Richardson (2004) discutem que animais mais eficientes possuem melhor capacidade de digestão. Além disso, há uma evidência de que animais mais produtivos possuem uma melhor digestão e absorção (ADAMS; BELYEA, 1987). Assim, a microbiota ruminal aparenta ter participação significativa na variação da eficiência alimentar.

A deposição de tecido muscular e adiposo tem custos energéticos diferentes havendo maior eficiência do ganho de deposição de massa magra (proteína) do que de gordura. Assim, qualquer variação na composição do ganho e na composição corporal, pode influenciar na eficiência da utilização do nutriente (HERD; ARTHUR, 2009). Avaliações de touros selecionados para eficiência alimentar mostraram que a composição química da carcaça teve correlação genética com o CAR, de tal forma que progênies de touros de alta eficiência tiveram menos gordura corpórea e mais composição de massa magra quando comparado às progênies de baixa eficiência (RICHARDSON et al., 2001). Diferenças em metabólitos como aumento dos níveis de leptina, associada ao aumento do tecido adiposo em gado (MINTON et al., 1998b),

aumento dos níveis de uréia, associada negativamente com o crescimento de carne magra (CAMERON, 1996) e, a diminuição de creatinina, associado positivamente com massa muscular e negativamente com gordura subcutânea (CLARKE et al., 1996a), 1996), estão associadas também em touros menos eficientes para CAR (RICHARDSON et al., 2004).

Variações na resposta ao estresse parecem diferir entre animais com maior e menor eficiência alimentar. A nível celular, os animais de baixa eficiência apresentam um quadro de maior estresse oxidativo em mitocôndrias do músculo esquelético, fígado, e duodeno: com um decréscimo dos transportadores acoplados a cadeia de transporte de elétrons e aumento do vazamento de elétrons, consequentemente, um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, o que leva a um aumento da demanda de energia (ATP) para reparar as proteínas oxidadas (BOTTJE et al., 2002a; IQBAL et al., 2004, 2005; OJANO-DIRAIN et al., 2005a). A nível sistêmico, Richardson, et al. (2004) indica que animais menos eficientes apresentam mais susceptibilidade ao estresse dado o alto nível de cortisol (correlação com RFI= 0,4; *valor de P* >0,05). Além disso, Knott e colaboradores (2008) afirmam que a resposta fisiológica ao estresse de animais menos eficientes inclui: aumento da taxa metabólica e aumento de consumo de energia e, o aumento da lipólise e degradação de proteína.

A atividade do animal explica em parte a variação do CAR em bovinos, Richardson et al. (1999) observam uma correlação fenotípica de 0,32 para CAR, através do uso de pedômetro e indicam que 10% da variação observada para CAR foi explicado pela atividade que incluem o ato de alimentar, ruminar e se locomover. Por fim, o aspecto fisiológico de capacidade de termorregulação e homeostasia se associa a variação do CAR, como estudo que mostra que galinhas mais eficientes possuem menor quantidade áreas depenadas, causando menos perda de calor e menor atividade (LUITING, P.; URFF, E. M.; VERSTEGEN, 1994).

Dados esses processos biológicos que estão associados a variação do CAR pode-se ter uma antecipação das mudanças em outras características que acontecerão durante a seleção para eficiência alimentar, além disso, a seleção de outras características que envolvam esses mecanismos pode levar a seleção de animais mais eficientes de forma indireta. Outro fato é que devido a existência de processos metabólicos envolvidos com a variação da eficiência alimentar, torna-se possível a existência de diferenças metabólicas intrínsecas a animais eficientes, e

essas diferenças poderiam ser utilizadas para seleção através de biomarcadores, por exemplo.

2.4. Estudo moleculares na eficiência alimentar

O CAR possui variabilidade e repetibilidade suficientes para uma resposta à seleção genética (ARTHUR; RENAND; KRAUSS, 2001; GOMES et al., 2013; HERD; BISHOP, 2000; SANTANA et al., 2014). Entretanto, a identificação de animais eficientes demanda de muitas informações fenotípicas e é inferida posteriormente ao confinamento (ARCHER et al, 1999). Essas mensurações seriam um grande desafio para se obtê-las em manejo de confinamentos comerciais e, apesar de relevante, a identificação de animais eficientes não consegue ser difundida. Na raça Nelore essas dificuldades se tornam ainda maiores devido ao pequeno número de animais com esse fenótipo avaliado, além de pouco conhecimento sobre os parâmetros genéticos dessa característica na raça (SANTANA et al., 2014). Uma possível estratégia para contornar essas limitações seria a utilização de informações genômicas driblando a dificuldade de mensuração desse fenótipo, auxiliando na seleção e inserindo a característica de modo definitivo no sistema produtivo.

O sequenciamento do genoma bovino (ELSIK et al., 2009), possibilitou o desenvolvimento de produtos comerciais contendo de centenas a milhares de marcadores moleculares do tipo polimorfismo de base única (SNP, uma alteração pontual na sequência de DNA, que mostra variação genotípica entre animais). Através da metodologia de estudo amplo de associação genômica (GWAS– do inglês *Genome Wide Association Studies*), empregada na análise dos resultados de genotipagens de milhares de SNP's, compara as frequências alélicas destes com a finalidade de identificar associações a um fenótipo de interesse (HAYES et al., 2009).

Barendse e colaboradores (2007) realizaram GWAS em bovinos *Bos taurus* utilizando 8.786 SNP's, identificando 20 SNP's que explicariam cerca de 76% da variação genética do CAR. Assim como Sherman et al. (2008), que identificou SNP's associados com CAR que explicariam até 6,9% da variabilidade fenotípica, nos cromossomos 2, 5, 10 e 20. Nesse estudo os pesquisadores afirmam que um único SNP explicaria a redução em 0,25 Kg da ingestão matéria seca por dia para CAR.

Enquanto ROLF et al. (2012) mostraram 66 SNP's que explicariam cerca de 62% da variabilidade genética nos cromossomos 3, 5, 6, 12, 15, 17 e 21. Observa-se que a mesma espécie gera diferentes resultados em função da população a que pertencem e da plataforma de SNP's utilizada no estudo.

Nosso grupo demonstrou anteriormente, 30 SNP's significativos associados com GPR, presentes nos cromossomos 2, 8, 12 e 17 (SANTANA et al., 2015). Esse estudo também indica QTL's contendo genes que contribuiriam para a variabilidade fenotípica do GPR relacionados ao estresse oxidativo e ao controle de crescimento muscular. Já, de Oliveira et al. (2013) encontraram SNP's nos cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25 e 26 que explicariam até 9,07% da variância genética do CAR e em genes relacionados ao metabolismo de lipídeos e proteínas, geração de energia e crescimento.

Em outro estudo com bovinos Nelore realizado pelo nosso grupo, ao sequenciarmos o gene completo do receptor androstano constitutivo (CAR, NR1I3), encontrou-se associação significativa entre um SNP presente na região promotora do gene *Nuclear receptor 1 family I member 3* (NR1I3) e o CAR mostrando a relação das variações do gene com a característica (ALEXANDRE et al., 2014). Esse gene é um regulador central de metabolismo de substâncias lipofílicas (dentre eles alguns xenobióticos), mostrando uma resposta adaptativa do animal com maior eficiência alimentar às condições ambientais ao qual se encontra.

Uma abordagem que vem se consolidando como “genética de sistemas” (VOY, 2011) pode fornecer informações importantes para a compreensão de mecanismos que regulariam características de interesse econômico através de estudos de globais incluindo, genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e epigenômica. Vincent e colaboradores (2015) realizaram abordagens de transcriptômica (análise global de transcritos) e proteômica (análise global de proteínas), no músculo *Longissimus dorsi*, em animais divergentemente selecionados para CAR em suínos e identificaram 11 proteínas em concentração diferentes. Proteínas mitocondriais oxidativas como aconitato hidratase, ATP sintase subunidade- α , creatina quinase tipo-S possuem baixa concentração em suínos mais eficientes e, a frutose bifosfato aldolase A e o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, duas proteínas envolvidas no processo de glicólise, possuem alta concentração em animais menos eficientes.

Nesse trabalho tanto as abordagens globais de transcritos como a de proteínas revelam baixo metabolismo oxidativo no músculo de suínos mais eficientes.

A eficiência alimentar é claramente um fenótipo poligênico e que sofre influências ambientais, o que torna importante estudos considerando a mensuração desde o nível molecular até o nível sistêmico das influências externas. Estudos ômicos podem mensurar essas influências ambientais através do perfil global de RNA, proteínas, lipídeos e metabólitos dado certo tipo amostra biológica em tempo específico. Porém, mudanças a nível do genoma, transcriptoma ou proteoma predisõem comportamentos específicos no organismo, tornando-as distante do fenótipo, sendo as alterações na composição global de metabólitos que refletem o atual “*status*” do organismo (BUJAK et al., 2015). Mais que isso, mudanças observadas nesse nível representam a perturbação dinâmica do genoma, transcriptoma e proteoma dentro de um sistema biológico específico, por isso o modificações dos metabólitos são considerados a reflexão química do fenótipo molecular (BUJAK et al., 2015). Esse campo da ciência parece ser uma ligação promissora entre o “*gap*” que há entre genótipo e fenótipo e que poderia ser utilizada na procura de biomarcadores associados a eficiência alimentar de bovinos.

2.5. A Metabolômica e suas características

O início da metabolômica é datado de 300 antes de Cristo na Grécia antiga, significa “mudança através de um conjunto de regras ou leis” no qual cores e cheiros na urina, causados pela mudança do perfil de metabólitos, eram usados para diagnosticar diabetes (NICHOLSON; LINDON, 2008). Porém, os estudos com metabólitos foram reconhecidos como ciência somente no início da década de 1970 (HORNING, E.C.; HORNING, 1971; PAULING et al., 1971).

A metabolômica é definida como a análise global ou específica de moléculas endógenas e/ou exógenas menores que 1.500 Dalton de peso molecular (ZHANG et al., 2012). Essas pequenas moléculas chamadas de metabólitos, que em sua totalidade formam o metaboloma, incluem peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, poli fenóis, alcaloides e outras espécies inorgânicas. Os metabólitos são frequentemente chamados de analitos (metabólitos

não analisados) ou compostos (especialmente se a estrutura, fórmula ou propriedade química for conhecida). Além disso, os metabólitos são produtos intermediários ou finais das múltiplas reações enzimáticas da atividade bioquímica de um organismo (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Assim, a metabolômica investiga os metabólitos em homeostase ou sob certa resposta a mudanças ambientais, na presença de toxinas, modificações genéticas ou doenças (GRIFFITHS; WANG, 2009; ROESSNER; BOWNE, 2009).

Ao contrário de genes e proteínas, que estão sujeitas a regulações epigenéticas e modificações traducionais respectivamente, os metabólitos não sofrem modificações funcionais, dessa forma, a variação no perfil de metabólitos é uma leitura funcional direta do estado celular e pode ser facilmente correlacionada com fenótipos (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Por isso, atualmente a metabolômica se tornou uma das mais relevantes ferramentas da era pós-genômica devido sua contribuição para explanação sobre processos biológicos em diversos organismos e a personalização de tratamento no campo da medicina (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015; ZHANG et al., 2012).

Há duas definições modernas e com diferenças sutis em relação a abordagem dada ao estudo global de metabólitos, a metabonômica e a metabolômica. A metabonômica é definida como “a mensuração quantitativa da dinâmica resposta metabólica de sistemas vivos à estímulos patofisiológicos ou modificações genéticas”(NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Já a metabolômica é definida como “a análise compreensiva e quantitativa de todos os metabólitos de um sistema biológico”(FIEHN, 2001). Essas definições possuem mais diferenças linguísticas do que técnicas, pois na prática esses termos são comumente intercambiáveis e utilizam dos mesmos métodos analíticos (NICHOLSON; LINDON, 2008). Devido a diversidade físico-química do metaboloma e a complexidade dos sistemas biológicos, há diversas abordagens metabolômica e plataformas analíticas que, uma vez combinadas, promovem a possibilidade da avaliação dos metabólitos presentes em um fluido biológico.

Existem algumas abordagens metabolômicas mais comumente utilizadas como a *metabolic profiling*, *metabolic fingerprinting* e a *metabolic footprinting* (BARDERAS et al., 2011). A *metabolic profiling* é um exemplo de abordagem metabolômica utilizando metabólitos alvos (*targeted approach*), no qual o estudo é focado em

identificar e quantificar grupos de metabólitos predeterminados de propriedade físico-químicas similares ou pertencentes a uma mesma via bioquímica (BECKONERT et al., 2007). Nessa estratégia a hipótese suporta que um único composto ou um pequeno conjunto de metabólitos podem explicar a influência de um estímulo específico no metabolismo. A seletividade de metabólitos se torna viável a partir da combinação do método de separação dos metabólitos e da instrumentação analítica adotada (BECKONERT et al., 2007).

A estratégia de *metabolic fingerprinting* é um exemplo de estudo global de metabólitos (*untargeted approach*), do qual não assume nenhum direcionamento prévio e verifica mudanças em todo o metaboloma, dado o estado específico de uma célula, tecido ou organismo (ELLIS et al., 2007). Assim, essa abordagem objetiva identificar quantos metabólitos forem possíveis em um fluido biológico comparando-se grupos (exemplo caso e controle), por isso são adotadas em estudos focados em prognóstico ou diagnóstico de doenças. Entretanto, devido à complexidade dos fluídos biológicos e da enorme diversidade físico-química do metaboloma não existe uma plataforma analítica universal englobando todos os metabólitos. Assim, o método de separação de metabólitos que não deve ser seletivo, deve extrair de forma eficiente os metabólitos preservando a complexidade da matriz biológica (ELLIS et al., 2007).

Outra abordagem comumente utilizada nas áreas de microbiologia e farmacologia é a *metabolic footprinting*, essa estratégia está focada na análise global de composto secretados ou que não foram absorvidos pelas células dentro de dada condição, sendo determinada como estudo do exo-metaboloma (MAPELLI; OLSSON; NIELSEN, 2008). Devido a estreita relação entre o universo intracelular e extracelular, essa estratégia objetiva como o meio alteram as vias metabólicas e consequentemente o fenótipo celular.

Inúmeras plataformas analíticas são utilizadas para essas abordagens, tanto na *targeted* quanto na *untargeted* (LINDON; NICHOLSON, 2008). Porém, a ressonância magnética nuclear (NMR) e o espectrômetro de massas (MS) são as mais utilizadas devido sua robustez (FUHRER; ZAMBONI, 2015). A NMR é uma técnica espectroscópica baseada na absorção e reemissão de energia do núcleo atômico causadas por variação de um campo magnético externo (BOTHWELL; GRIFFIN, 2011). O NMR foi provavelmente a plataforma pioneira da metabolômica e corriqueiramente aplicado à estudos farmacêuticos e em toxicologia (COEN et al.,

2004; LINDON et al., 2003). Dependendo do tipo elemento químico alvo do núcleo atômico aplicado ao campo magnético, diferentes informações do metaboloma podem ser acessados, sendo o mais comumente utilizado o hidrogênio devido sua abundância natural em amostras biológicas (^1H -NMR)(REO, 2002). Embora menos frequente, outros elementos químicos como o carbono (^{13}C -NMR) e o fósforo (^{31}P -NMR) podem ser utilizados como alvos, promovendo informações adicionais sobre metabólitos.

Os resultados do NMR permitem a quantificação da concentração, bem como, a informação sobre a estrutura química do metabólito. Para isso, a área dos picos espectrais de cada molécula é utilizada como mensuração indireta da quantidade de metabólitos da amostra, enquanto o padrão dos picos baseado na propriedade física da molécula permitiria identifica-la (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015). NMR é uma plataforma analítica robusta, possui alta reprodutibilidade, requer quase nenhum tratamento prévio das amostras e também não inviabiliza as amostras para análises futuras (BUJAK et al., 2015). Dentre suas desvantagens estão sua baixa sensibilidade e dificuldade de separar ruídos e duplicação de sinais dos metabólitos.

O MS é uma plataforma analítica que mensura moléculas ionizadas com base em sua razão de massa-carga (m/z) e a relativa intensidade de cada composto (BUJAK et al., 2015). Os componentes gerados pela ionização de cada molécula produz diferentes padrões de picos permitindo identifica-la (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015). Existe uma ampla variedade de técnica e instrumentação disponíveis para MS, sendo caracterizada por diferentes métodos de ionização e seleção de massas dependendo da estratégia adotada (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Para análises metabolômicas *targeted*, espectrômetros de massas triplo quadrupolo (QqQ) são bastante utilizados em função do seu potencial analítico quantitativo e a habilidade de realizar monitoramentos de múltiplas reações (MRM) (BECKER et al., 2012). O MRM é altamente seletivo, com alta especificidade e sensibilidade permitindo quantificar um analito de interesse (NAKAMURA et al., 2016). Porém, os modernos QqQ possuem limitações de ciclos curtos em tempos de escaneamento, assim geralmente, o terceiro quadrupolo é modificado por um analisador tempo de voo (Q-TOF) ou *ion trap* (Q-Trap), permitindo a elucidação estrutural e quantificação MRM (BRUEGEL et al., 2009; CEGLAREK et al., 2009; SANDRA et al., 2010).

Para análise metabolômica *untargeted* em fluídos biológicos a NMR ou MS de alta acurácia com poder de resolução de massas entre 20.000-1.000.000 e uma acurácia para massa menor do que 3 partes por milhão (ppm) tende a ser aplicada (WERNER et al., 2008). Assim, espectrômetros de massas com analisadores Q-TOF, orbitrap ou Infravermelho por transformada de *Fourier* tem sido utilizados para identificação de metabólitos em análises globais (ACKERSTAFF; GLUNDE; BHUJWALLA, 2003; BRUCE et al., 2008; GOWDA et al., 2008; MICHOPoulos et al., 2010). Geralmente em metabolômica, o MS é precedido por uma etapa de separação que, reduz a alta complexidade da amostra biológica e permite a análise de diferentes conjuntos de moléculas em diferentes tempos (THEODORIDIS; GIKA; WILSON, 2011).

Colunas cromatográficas líquidas, gasosas e capilares (LC, GC e CE, respectivamente) são as mais utilizadas como técnicas de separação (LINDON; NICHOLSON, 2008). Segundo Theodoridis, Gika e Wilson (2011), a técnica de separação é baseada na interação entre os diferentes metabólitos de uma amostra e a absorvância dos materiais presentes dentro da coluna cromatográfica. Desse modo, metabólitos com propriedades químicas diferentes requerem tempos diferentes para atravessar a coluna cromatográfica. O tempo que o metabólito leva para atravessar a coluna cromatográfica chama-se tempo de retenção (RT) e é utilizado juntamente com o m/z para gerar informações padronizadas sobre o metabólito para estudos posteriores (THEODORIDIS; GIKA; WILSON, 2011).

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) é uma plataforma robusta, a técnica permite detecção de compostos de baixo peso molecular, voláteis e termicamente estáveis com pontos de ebulição baixo (< 350 °Celsius)(DUNN et al., 2008; HONOUR, 2006). Os metabólitos detectados incluem aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, metabólitos fosforilados, aminas e colesterol. A preparação de amostras envolve diversas etapas de deproteinização, liofilização e derivatização, sendo este, necessário para diminuir o ponto de ebulição de metabólitos endógenos, permitindo assim, que sejam voláteis o suficiente para atravessar a coluna cromatográfica (DUNN et al., 2011). Porém, a complexidade e o tempo requerido pelo processo de derivatização acaba na perda de alguns metabólitos (BUJAK et al., 2015).

A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) é largamente utilizada em estudos metabolômicos, a técnica permite a análise de composto não-voláteis, termicamente instáveis, de alto ou baixo peso molecular e ampla polaridade (BUJAK et al., 2015). Comumente aplicado para amostras de fluidos biológicos como urina, sangue e extratos teciduais (BECKER et al., 2012; WANT et al., 2010). A LC-MS não requer etapas de derivação, tornando o preparo da amostra mais simples e rápido, quando comparado com GC-MS e, além disso, a seletividade de polaridade dos compostos é estritamente dependente combinação da fase estacionária e da fase móvel na coluna cromatográfica. Segundo Bujak et al. (2015) a estratégia de utilizar colunas cromatográficas de fase reversa, para retenção dos metabólitos de média e baixa polaridade e, a ionização por *electrospray*, em ambos modos (positivo e negativo), promove a maximização de cobertura de metabólitos em fluidos biológicos. Já para a retenção de compostos hidrofílicos como aminoácidos e carboidratos, por exemplo, colunas hidrofílicas de interação com cromatografia líquida (HILIC) são recomendadas (SPAGOU et al., 2010).

As colunas LC tradicionais, comumente com dimensões 4,6 mm x 150 mm e com tamanho de partículas de 5 µm possuem limitações na sensibilidade e afetam o poder de separação da técnica. Assim, colunas líquidas cromatográficas de ultra eficiência (UPLC) (2,1 mm x 100 mm com tamanhos de partículas 1,7 µm) tem sido aplicadas com sucesso em estudos metabolômicos aumentando a resolução cromatográfica (tipicamente > 5.000 de largura à meia altura (FWHM)) e o número de metabólitos detectados (acurácia da massa 5 ppm) (WILSON et al., 2005; WU et al., 2014). Metabólitos com concentrações menores que 0,01% do metabólito de máxima intensidade podem ser detectados, porém isso requer rápidas taxas de aquisição ou tempos de escaneamento pelo espectrômetro, assim, analisadores TOF-MS ou *Orbitrap* tem sido utilizados (DUNN et al., 2008; GIKA et al., 2008; ZELENÁ et al., 2009). Em função da junção do UPLC com Q-TOF MS, metabólitos incluindo aminoácidos, ácidos orgânicos e fosfolipídeos, com concentrações de miligramas/litro no plasma humano foram identificados, viabilizando a técnica (BRUCE et al., 2008).

As atuais tecnologias permitem estudar até milhares de metabólitos simultaneamente de uma amostra biológica complexa, o que alavanca a contribuição da metabolômica nas ciências aplicadas. Dentre contribuições pode-se destacar pesquisas na área da fisiologia de plantas(QI; ZHANG, 2014), nutrição (GIBBONS et

al., 2015; OREŠIČ, 2009), produção animal (REGAL et al., 2014), melhoramento genético animal (KÜHN, 2012), farmacologia (KELL; GOODACRE, 2014; ROBERTSON; FREVERT, 2013) e estudo de doenças humanas (KADDURAH-DAOUK; KRISTAL; WEINSHILBOUM, 2008; MAMAS et al., 2011).

2.6. A metabolômica aplicada a animais domésticos

Estudos aplicados à medicina veterinária e a produção animal também têm sido propostos e são importantes para a identificação de biomarcadores de doenças, desenvolvimento de novos diagnósticos, dissecação dos mecanismos bioquímicos por trás dos processos patológicos, identificação de indicadores prognósticos, otimização da produção adequando dieta e o ambiente ao animal e identificação de novos alvos para drogas e testes toxicológicos (KIRWAN, 2013).

Ilves et al. (2012) estudando as modificações de metabólitos no plasma e no leite de vacas leiteiras no início da lactação, encontraram uma correlação entre a composição molecular dos dois fluídos ao longo dos primeiros meses da lactação. O trabalho elucida como os dois sistemas se interagem e esclarece o comportamento de metabólitos nesse período tão estressante para o animal. Já Lu et al. (2013), estudaram as modificações no leite associados com a duração do período seco e durante a lactação em vacas de leite recém paridas, que são períodos que podem ocasionar doenças metabólicas devido a um balanço energético negativo. Os pesquisadores verificaram que na presença de um balanço energético negativo os animais possuem altas concentrações de ácidos graxos insaturados e galactose-1-fosfato, já animais sem esse quadro possuem altas concentrações de colesterol, estomatina e proteínas relacionadas com a síntese de colesterol.

Em gado de corte, Rijik e colaboradores (2009) utilizaram amostras de urina para encontrar possíveis biomarcadores para detecção no uso ilegal de esteroides em bovinos, como o pró-hormônio dehidroepiandrosterona e o pregnenolona. Os autores identificaram metabólitos como glucoronida e alguns compostos tipo esteroides, que serviriam como biomarcadores na identificação de animais tratados com hormônios no sistema produtivo e até mesmo, como um exame *antidoping* em atividades esportivas utilizando bovinos. No mesmo objetivo, Anizan et al. (2012) utilizando

amostras de urina em bovinos com administração do pró-hormônio 4-androstenediona encontraram 17 compostos tipo esteroides como candidatos relevantes na detecção do uso ilegal de pró-hormônio. Esses pesquisadores *nomeiam* *5 α -androstane-3 β ,17 α -diol* e *5 α -androst-2-en-17-one* como os metabólitos que poderiam ser utilizados como biomarcadores.

Assim, a metabolômica tem identificado e quantificado o perfil de metabólitos de características complexas, auxiliando a medicina veterinária e a produção animal a elucidarem os efeitos ambientais, de drogas e doenças e, compreender as mudanças metabólicas que levam a variabilidade fenotípica. Devido esse potencial de abordagem de explanação de características complexas esse estudo se torna viável na busca da compreensão e de marcadores associados a eficiência alimentar.

3. HIPÓTESES

- O metaboloma sérico de bovinos Nelore é distinto entre animais de alta e baixa eficiência alimentar;
- Há metabólito (s) que possa (m) prever a eficiência alimentar em bovinos Nelore previamente ao confinamento.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

- (1) Elucidar o metaboloma sérico de bovinos Nelore e avaliar sua potencial associação ao fenótipo de eficiência alimentar.

4.2 Objetivos específicos:

- (1) Identificar o melhor protocolo de extração de metabólitos a partir de amostras de soro em bovinos Nelore;
- (2) Avaliar e identificar os metabólitos séricos de bovinos e avaliar sua associação com a eficiência alimentar;
- (3) Identificar potenciais vias metabólicas associadas à eficiência alimentar, através da análise global de metabólitos;
- (4) Identificar possível(is) metabólito(s) distinto(s) entre os grupos para futura caracterização como biomarcador de eficiência alimentar.

5. MATERIAIS E MÉTODOS:

5.1. Animais e coleta dos dados fenotípicos

Todos os protocolos utilizados para coleta de dados e amostras biológicas foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FZEA/USP, Protocolo nº: 14.1.636.74.1). Todas essas coletas fenotípicas e biológicas foram realizadas em Pirassununga/SP (Brasil) entre os meses de Abril e Agosto de 2013, em experimento prévio de mestrado de Pâmela Almeida Alexandre (ALEXANDRE et al., 2015) e coordenação do Professor Doutor Heidge Fukumasu (Proc. FAPESP 2012/14792-3).

Sumariamente, um total de 98 bovinos machos inteiros da raça Nelore entre 16 e 20 meses de idade e média de 376 ± 29 kg de peso vivo, pertencentes ao rebanho da prefeitura do Campus da USP de Pirassununga (PUSP-P) foram confinados no Confinamento Experimental do Departamento de Zootecnia, sob responsabilidade dos Professores Doutores Paulo Roberto Leme e Saulo Luz e Silva. No período anterior ao confinamento, esses animais foram mantidos em lote único em pastagem de *Brachiaria ssp.* No período experimental, deste total de animais, 52 foram alojados em baias individuais e 46 divididos em quatro piquetes dotados de cochos individuais com portão do tipo *Calan Broadbent* (*American Calan Inc*, Northwood, NH, USA), compreendendo um espaço mínimo de 25 m² por animal.

O período experimental teve duração de 70 dias, precedidos de 21 dias de adaptação à dieta e às instalações. Durante o período de adaptação, os animais receberam silagem de milho *ad libitum*, que fora gradualmente modificado pela dieta experimental. Já durante o período experimental, todos os animais receberam a mesma dieta com proporção de 75% de concentrado e 25% de volumoso, formulada pelo software RLM 3.0. A dieta era oferecida as 8:00 e 16:00 horas diariamente e, as sobras da dieta eram pesadas diariamente antes da primeira oferta do dia para cálculo do consumo médio de matéria seca diário (ALEXANDRE et al., 2015).

Todos os animais foram pesados no início, fim e a cada 14 dias do período experimental. O ganho de peso médio diário foi inferido pela diferença média do peso corporal nos dias que compreenderam o confinamento. Para a caracterização da eficiência alimentar foi utilizada a medida residual consumo alimentar residual (CAR).

O CAR foi calculado como a diferença entre o consumo de matéria seca observado e o consumo predito (KOCH et al., 1963):

$$CMD = \beta_0 + \beta_1 GPD + \beta_2 PVM^{0.75} + \varepsilon_1$$

Onde, CMD é o consumo médio diário predito; β_0 , β_1 e β_2 são parâmetros que definem a reta de regressão; GPD é o ganho médio diário; $PVM^{0.75}$ é o peso vivo metabólico; ε_1 é o erro atribuído ao modelo que corresponde ao CAR.

Essas inferências foram realizadas utilizando-se o procedimento PROC REG correspondente ao pacote estatístico do programa SAS 9.3. Por fim, dois animais apresentaram ganho de peso médio diário menores que 2,5x de desvio-padrão e foram descartados, utilizando-se 96 animais para análises posteriores.

Os animais foram ranqueados conforme o CAR e um corte correspondente a 1,5 desvio-padrão fora realizado (aproximadamente 15% dos animais foram selecionados). Dessa forma, dois grupos de animais divergentemente selecionados para eficiência alimentar foram criados, cada um contendo 8 animais dos mais eficientes (HFE) e 8 animais dos menos eficientes (LFE) conforme figura 2.

Figura 2- Distribuição dos animais confinados e dos grupos selecionados divergentemente para CAR. Grupos: em vermelho o grupo de alta eficiência alimentar (HFE); em azul o grupo de baixa eficiência alimentar (LFE); em verde os animais sem atribuição aos grupos.

5.2. Coleta das amostras biológicas

Amostras de soro foram coletadas a cada pesagem dos animais. Para este experimento, optou-se por utilizar amostras do dia -21 em relação ao confinamento, ou seja, amostras de quando os animais chegaram ao confinamento. Nessa ocasião foram extraídos sangue da veia jugular em tubos a vácuo para soro, contendo ativador de coágulo jateado na parede do tubo que acelera o processo de coagulação. Foram feitas três alíquotas de soro para cada animal em microtubos de 1,5ml e armazenados em freezer -80°C de 2013 até 2015 quando se iniciou esse estudo.

5.3. Projeto piloto: determinação do protocolo de extração de metabólitos

Foram testadas 2 estratégias de extração diferentes como projeto piloto para adequação do melhor método de tratamento prévio das amostras e redução de custos. Foi utilizado soro de um animal hígido pertencente a Unidade Didática Clínico Hospitalar (UDCH9 FZEA/USP), em Pirassununga-SP, já que o objetivo foi verificar a quantidade de picos cromatográficos totais (TIC) como parâmetro de escolha do protocolo. Esse projeto piloto foi realizado no laboratório de Produtos Funcionais da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia, em Pirassununga-SP, sob coordenação da Professora Doutora Carmen Silva Fávaro Trindade.

Brevemente, o primeiro protocolo adaptado de Dunn et al. (2011) consistiu na precipitação de proteínas, adicionando 60 μL de amostra, 240 μL de metanol e 30 μL do padrão interno (cloropropamida- 5 μM na amostra). As amostras foram homogeneizadas (vortex 2 minutos à 5.000 rpm) e centrifugadas à 16.000x g por 4 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante coletado, secado a vácuo e armazenado a -80°C . O segundo protocolo consistiu em uma separação trifásica baseada em metanol:clorofórmio:água, adicionando-se 60 μL de amostra, 380 μL de metanol (homogeneizar), 760 μL de clorofórmio (homogeneizar) e 120 μL de água para induzir a fase de separação. Após 10 minutos de descanso em gelo para induzir fase de separação, centrifuga-se 8.000x g, por 10 minutos a 4°C , captura-se a fase superior e adiciona-se o padrão interno (cloropropamida- 5 μM na amostra), seca-se a vácuo e armazena-se a -80°C (NZOUGHET et al., 2015).

Foram realizadas 6 corridas cromatográficas seguindo estratégia apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Corridas cromatográficas do Projeto piloto; Protocolo 1: Dunn, et al (2011); Protocolo 2: Nzoughet et al. (2015); IS: cloropropamida.

PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2	BRANCOS
Amostra + IS	Amostra + IS	Solução+ IS (Protocolo 1)
Amostra	Amostra	Solução+ IS (Protocolo 2)

As corridas cromatográficas foram realizadas no sistema de alta performance (HPLC) Marca *Shimadzu*, modelo *Prominence* (Tóquio, Japão) com detector de arranjos diodos. A separação cromatográfica fora realizada em coluna analítica de fase reversa (Shim-Pack VO ODS, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm), juntamente com uma pré-coluna, mantida a 35 °C. A fase móvel consistiu em H₂O (água) no canal A e, MeOH (metanol) no canal B, ambos contendo 0.1% de ácido fórmico. A programação de gradiente do sistema está apresentada na tabela 2 sendo injetado 50 µL de amostra. Os cromatogramas foram adquiridos em 280 nm e os dados coletados no *software LC Solution*, versão 1.21 (*Shimadzu*, Tóquio, Japão).

Tabela 2. Programação de gradiente do sistema cromatográfico.

Tempo (min)	Taxa de injeção (µl/min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0-1	1200	97	3
1-15	1200	3	97
15-19	1200	3	97
19-21	1200	97	3

5.4. Preparação das amostras

Todos os solventes utilizados foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA) , todos os eppendorfs e pipetas foram sonicados e, o protocolo de extração de metabólitos foi baseado em Dunn, et al. (2011). As amostras dos animais foram descongeladas em gelo, depois foram transferidos 100 µL do soro para tubos de eppendorf de 1,5 ml, adicionados 400 µL de MeOH, vortexada por 2 minutos à 5.000

rpm e centrifugados por 4 minutos à 16.000g em temperatura ambiente. Logo após, 400 µL do sobrenadante das amostras foi transferido para novo tubo, onde foram secados em centrífuga evaporadora a vácuo por 3h à 30 °C. Por fim, as amostras foram armazenadas -80 °C até as análises. Foram também construídos 2 pools de amostras utilizando alíquotas iguais do soro dos 16 animais como controle de qualidade (QC) para avaliar a reprodutibilidade e confiabilidade do sistema.

As amostras foram enviadas para a empresa Apex Science (Campinas, SP, Brasil) para análises UPLC-ESI-QTOF-MS.

5.5 Análises UPLC-ESI-QTOF-MS

As análises foram conduzidas em sistema de ultra pressão de cromatografia líquida *Acquity I-Class* (UPLC; Waters, Wexford, Irlanda) acoplado ao espectrômetro com ionizador tipo *eletrospray* (ESI) e detector de massas de quadrupolo-tempo de voo, modelo *Xevo G2 XS Q-ToF* (Waters, Wexford, Irlanda) com coluna de cromatografia líquida de alta eficiência *Acquity BEH C18* (1.7 µm, 2.1mm x 100mm; Waters, Wexford, Irlanda).

As amostras secas foram ressuspensas em 200 µL de água, vortexadas por 15 segundos e centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos. Após, um total de 5 µL de alíquota foram injetados dentro da coluna e a temperatura da coluna foi ajustada à 50 °C em uma taxa de fluxo de 0,36 e 0,4 mL/min nos modos de ionização negativo e positivo, respectivamente. Os gradientes das soluções eluentes da fase móvel consistiram em fase A de água com 0.1% de ácido fórmico e, fase B de metanol com 0.1% de ácido fórmico. O programa linear da eluição consistiu em: 0-1 minuto: 100% fase A, 1-16 minutos: 100% fase B, 16-20 minutos: 100% fase B, 20-22 minutos: 100% fase A, no modo ESI positivo. E no modo ESI negativo: 0-2 minuto: 100% fase A, 2-17 minutos: 100% fase B, 17-22 minutos: 100% fase B, 22-24 minutos: 100% fase A.

Os dados foram inicialmente monitorados no modo MS1 Scan, varrendo faixa de m/z entre 100 - 1200 e utilizando-se o composto Leu-Enk (m/z 554,2615 e 556,2771 nos modos negativo e positivo, respectivamente) como referência de massa exata. Os parâmetros utilizados na fonte de ionização foram: voltagem do capilar (-2,5/+3,0 kV), voltagem do cone (40 V), temperatura da fonte (150 °C), fluxo do gás de dessolvatação

(800 L/h), temperatura do gás de dessolvatação (550 °C) e fluxo do gás do cone (50 L/h). A cada 4 injeções de amostras, injetou-se uma das amostras de controle de qualidade (QC).

O processamento dos dados fora feito utilizando-se 2 softwares diferentes: (1) XCMS, *software* gratuito; (2) Progenesis QI, *software* com licença particular fornecido pela empresa Waters (Wexford, Irlanda). O objetivo desse teste foi verificar a possibilidade de utilizar o processamento menos oneroso e de amplo acesso a comunidade científica.

5.6. Processamento dos dados pelo programa XCMS

Os dados brutos (*.raw*) foram convertidos para o formato mzXML utilizando o *software* ProteoWizard MSConvert GUI (KESSNER et al., 2008). Análises e rotinas de pré-processamento dos dados foram: filtragem de ruídos de leitura, detecção de picos de *m/z*, verificação de isótopos, alinhamento de amostras, identificação dos metabólitos utilizando os pacotes XCMS e CAMERA (KUHL et al., 2012; SMITH et al., 2006) do *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

Os parâmetros XCMS foram os padrões para o método *Centwave* (*profmethod* = bin; *method* = centwave; *step* = 0.1) excetos pelos parâmetros *peakwidth*=c(2,20) segundos, *ppm*=10 e *snthresh*=5, *bw*=2, devido a picos mais estreitos obtidos pela utilização da coluna com partículas de 1,7 µm (SMITH, 2017). O método *LOESS correction* foi aplicado para corrigir diferenças de intensidades devido a variância de eficiência da coluna cromatográfica. As intensidades das amostras foram extraídas e uma etapa critério de qualidade (QA) foi aplicado: analitos não presentes em ao menos 50% nas amostras de QC e com mais de 20% de desvio-padrão relativo (desvio-padrão em relação à média) foram eliminados das análises posteriores (DUNN et al., 2011).

5.7. Processamento dos dados pelo programa Progenesis QI

Os dados brutos também foram processados no *software* Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Waters), seguindo o *workflow* sugerido pelo fabricante. Os dados foram importados para o *software* que, inicialmente, realiza o alinhamento cromatográfico utilizando-se a amostra que representa o melhor padrão de alinhamento (definido pelo

próprio programa). O alinhamento foi considerado aceito quando o parâmetro *Alignment quality* foi atribuído como *Good* (pontuação do alinhamento, *Score* > 90%). Após essa etapa, o *software* realiza a etapa de *Peak Picking*, onde os parâmetros automáticos (*Sensitivity: Automatic; Chromatographic peak width: Default; Retention time limits: Default*) foram selecionados para a detecção de picos em toda a faixa do cromatograma. Posteriormente, montou-se o desenho experimental, onde as replicatas foram agrupadas nas respectivas condições biológicas (alta e baixa). A planilha resultante, contendo as informações de *m/z*, RT e intensidade de todos os íons em todas as amostras analisadas foram transferidas, *LOESS correction* e a QA aplicada.

5.8. Análises estatísticas uni e multivariadas

As análises estatísticas foram feitas utilizando as medianas das replicatas técnicas dos dados provindos do *software* Progenesis Q1, onde foram inseridos na plataforma *online* Metaboanalyst 3.0 (XIA; WISHART, 2016), com parâmetros: *k-nearest neighbors algorithm* (em intensidades não detectadas), *log-transformation* e *Auto-scaling* (normalização e padronização de escala de intensidade). Análises multivariadas, incluindo análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram utilizadas para identificação de *outliers* e verificação de diferenças globais entre os grupos. Após, um teste de permutação com 2000 randomizações fora utilizado para validar os resultados.

Os metabólitos diferenciais com *valor de P* <0,05 pelo teste *t-student* e FDR foram considerados significativamente alterados (DONG et al., 2015). Para a identificação e caracterização dos metabólitos, os metabólitos foram alinhados as informações obtidas com “KEEG database” (<http://metlin.scripps.edu>) e HMDB (<http://www.hmdb.ca/>). A identificação também foi predita utilizando o programa *Python* nomeado *mummichog* (LI et al., 2013).

5.9. Análise de co-expressão de metabólitos

Análise de redes de metabólitos co-expressos foi realizada com metabólitos nos modos positivo e negativo de aquisição provindos do *software* Progenesis Q1, utilizando o pacote *Weighted Correlation Network Analysis* (WGCNA (LANGFELDER; HORVATH, 2008)) no *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008). Os dados utilizados primeiramente passaram pelo critério de QA e após, as intensidades foram normalizadas e transformadas para $\log_2$. Assim, evitando tanto vieses sistemáticos ou variações técnicas quanto diferentes magnitudes de intensidades (na ordem de sub-micromolar até milimolar) (FUKUSHIMA et al., 2011; XIA; WISHART, 2011).

A conectividade dos módulos, calculado pela soma das correlações entre um analito e todos os outros analitos na rede. Assim, a matriz de adjacência foi gerada pela correlação de *Pearson* entre todos os analitos, elevada a um expoente β (limiar suave) de 7, escolhido utilizando-se um critério de topologia de escala livre ($R^2 = 0,80$). Após, uma medida sobreposição topológica (*topological overlap measure* - TOM) foi calculada e um valor entre 1 e 0 foi atribuído a cada par de analito. Um valor de 1 significa que dois analitos compartilham os mesmos vizinhos e um valor de 0 significa que eles não compartilham nenhum vizinho. A matriz TOM foi então utilizada para realizar a clusterização hierárquica, que resulta em dendrograma de módulos, cujos ramos são identificados para o corte em função da sua forma usando um algoritmo de corte dinâmico de árvore (LANGFELDER; HORVATH, 2008). Os módulos que continham pelo menos 20 analitos foram construídos.

Para identificar os módulos biologicamente atribuídos a eficiência alimentar, foi calculado a correlação de *Pearson* entre o módulo *eigengene* criado e o CAR. O *eigengene* é o primeiro componente principal de um dado módulo e é uma medida representativa do perfil de concentração do módulo. Os módulos escolhidos para análise como relevantes teriam de ter uma correlação entre módulo e característica fenotípica $> 0,5$ (valor de $P < 0,1$) para CAR. Além disso, os analitos dos 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 analito é com os outros analitos dentro do módulo, e também

pode ser chamado de filiação ao módulo (FM). A análise enriquecimento funcional foi realizado utilizando o *software* MetaboAnalyst 3.0.

5.10. Enriquecimento funcional por predição dos metabólitos

As análises de enriquecimento de vias metabólicas foram realizadas utilizando o *software mummichog* 1.0.3 (LI et al., 2013) com os parâmetros *default* e 1000 permutações. A distribuição dos valores de P resultantes do *test-t* são inseridas no *mummichog* que prediz as vias metabólicas comparando os dados randomizados e criando valores de P empíricos para as vias enriquecidas. A vias metabólicas com valor de $P < 0,01$ foram consideradas significantes.

6. RESULTADOS:

6.1. Determinação do protocolo para extração de metabólitos

O critério de seleção do método de extração foi baseado nos perfis cromatográficos dos dois protocolos testados, verificamos que o protocolo de Dunn, et al (2011) gerou um número maior de picos cromatográficos em relação ao protocolo de Nzougnet, et al (2015) (figuras 3, 4 e 5).

Figura 3- Perfil cromatográfico de amostras sem padrão interno baseadas nos protocolos: Rosa (DUNN, et al (2011)); azul (NZOUGHET, et al (2015)); preto (padrão interno em solução aquosa).

Figura 4 -Perfil cromatográfico de amostras com inserção do padrão interno antes da precipitação de proteínas baseadas nos protocolos: Rosa (DUNN, et al (2011)); azul (NZOUGHET, et al (2015)); preto (padrão interno em solução aquosa).

Figura 5- Perfil cromatográfico de amostras com inserção do padrão interno após a precipitação de proteínas baseadas nos protocolos: Rosa (DUNN, et al (2011)); azul (NZOUGHET, et al (2015)); preto (padrão interno em solução aquosa).

Durante o descongelamento em todas as amostras dos animais selecionados foi observado a formação de um pellet em todas as amostras (Figura 6). Provavelmente estes eram compostos de fibrina, porém não houve como estes serem identificados.

Figura 6- Pelete observado nas amostras de soro bovino após o descongelamento que antecede a extração de metabólitos desse estudo.

6.2. Pre-processamento dos dados metabolômicos

Tanto no pre-processamento dos dados no modo de aquisição positivo quanto negativo houveram diferenças em relação ao número de analitos encontrados e distribuição dos metabólitos ($\log_2$ *Fold-change*) provindo dos *softwares* Progenesis QI

e XCMS. As diferenças no total de analitos e de distribuição nos modos positivo e negativo podem ser observados na tabela 3 e figura 7.

Tabela 3- Números de analitos inferidos nos modos negativo e positivo utilizando o *software* Progenesis QI (Waters) e o *software* gratuito XCMS, antes e depois do critério de qualidade (QA).

MODO NEGATIVO	XCMS	Progenesis QI
TOTAL	7.715	11.364
QA	1.305	3.598
MODO POSITIVO	XCMS	Progenesis QI
TOTAL	6.084	21.435
QA	259	4.210

Figura 7- Distribuição do *Fold-change* $\log_2$ nos modos positivo (1) e negativo (2) utilizando o *software* Progenesis QI (A e B) e o *software* XCMS (C e D).

Cerca de 83% e 96% dos analitos encontrados pelo *software* XCMS foram excluídos pelo processo de QA nos modos negativo e positivo, respectivamente. E cerca de 68% e 80% dos analitos identificados no *software* Progenesis QI foram excluídos pelo QA nos modos negativo e positivo, respectivamente. Também foi

verificado diferenças holísticas dos dados através de análise de componentes principais (PCA) no qual o Progenesis também se mostrou com um comportamento mais robusto dos dados (Figura 8 e 9).

Figura 8- Análise de componentes principais separando replicatas técnicas com os resultados provindos do XCMS após QA nos modos negativo (A e B) e positivo (C e D).

Figura 9- Análise de componentes principais separando replicatas técnicas com os resultados provindos do Progenesis QI após QA nos modos negativo (A e B) e positivo (C e D).

No modo negativo foram removidos 400 analitos pelo critério de ao menos 50% de presença e 7.292 analitos em função do desvio-padrão relativo à média maior que 20% nos QC, de tal forma que 3.598 analitos possuíam confiabilidade para as análises posteriores. Já no modo negativo, foram removidos 138 analitos pelo critério de ao menos 50% de presença e, 17.087 analitos em função do desvio-padrão relativo à média maior que 20% nos QC, restando 4.210 analitos para análise. Devido aos

melhores resultados obtidos, foram utilizados os dados oriundos do *software* Progenesis QI nas análises subsequentes.

6.3. Análise diferencial do metaboloma no modo negativo

Antes das análises foi realizado a mediana das intensidades das replicatas técnicas. Após, as etapas de normalização e transformação dos dados ($\log_2$) foram realizadas no software Metaboanalyst antes das análises univariadas e multivariadas (figura 10 e 11). Houve 9 analitos com *fold-change* maiores que 2 (tabela 4).

Figura 10- Distribuição dos analitos antes (esquerda) e depois (direita) da normalização e transformação de escala e $\log_2$ das intensidades no modo negativo.

Figura 11- Distribuição do *fold-change* (A) e *Volcano plot* do grupo de alta e baixa eficiência alimentar (B).

Tabela 4- Analitos no modo negativo com *fold change* maiores que 2 entre os grupos de alta (HFE) e baixa (LFE) eficiência alimentar.

ANALITO	HFE MÉDIA(SD)	LFE MÉDIA(SD)	FOLD CHANGE	LOG2
9.73_450.3623m/z	1.3319(2.55)	-0.1674(0.35)	21.43	4.4216
15.93_529.5503m/z	10.9693(26.60)	2.2274(1.79)	4.9248	2.3001
23.19_303.0450m/z	10.2094(15.14)	3.3731(3.75)	3.0267	1.5977
18.33_355.2186m/z	2.4427(2.95)	1.0008(0.47)	2.4407	1.2873
4.66_109.0840m/z	1.9201(1.65)	0.7916(0.58)	2.4255	1.2783
21.91_158.0747m/z	3.3726(5.17)	1.4930(1.25)	2.2589	1.1756
12.39_1009.7191m/z	4.1277(5.23)	1.8838(0.99)	2.1911	1.1316
5.14_116.1110n	1.2062(0.69)	0.5742(0.15)	2.1008	1.0709
6.20_135.1051m/z	2.6864(3.6578)	1.2902(1.24)	2.0821	1.0581

Primeiramente, a análise de componentes principais foi realizada no intuito de identificar amostras *outliers*, como observado na Figura 12A, nenhum *outlier* foi encontrado. Afim de identificarmos diferenças globais do metaboloma em função da eficiência alimentar que poderiam prever a variância fenotípica, foi realizada análise PLS-DA (Figura 12B), seu *cross-validation* e permutação (2000 randomizações).

As análises multivariadas objetivam resumir padrões de agrupamento de amostras projetando em poucas dimensões uma maneira de explicar o máximo de variância (PCA) ou co-variância (PLS-DA) dos dados (XIA et al., 2015). O PLS-DA é um método de classificação supervisionado, isso significa que o método tem conhecimento a que grupo cada amostra pertence durante o processo de classificação (XIA; WISHART, 2011). Para verificar a qualidade do agrupamento gerado, o método de *cross-validation* permite verificar a predição do modelo construído (conhecido como Q^2), onde, retira-se 10% dos dados, cria-se o modelo e depois verifica-se o modelo consegue prever o grupo com os 10% dos dados. Outro problema que pode ser gerado no PLS-DA é a construção de um agrupamento devido a artefatos gerados durante o próprio processo de classificação, nesse sentido um método de permutação pode ser realizado. As permutações são randomizações das amostras entre os grupos, onde se verifica se o modelo de classificação gerado pelas randomizações é pior ou melhor que o modelo original dos dados (XIA; WISHART, 2011).

Figura 12- Análises multivariadas no modo negativo de aquisição: PCA (A); PLS-DA (B)

O modelo de classificação gerado no modo negativo com 2 componentes principais foi construído de forma satisfatória ($R^2=0,87$), porém a predição do modelo não foi satisfatória ($Q^2= 0,08$). Pelo método de permutação a diferença do agrupamento observado na figura 11B foi liderada por artefatos (valor de $P = 0,9665$ (1933/2000 permutações)). Desse modo, pode-se inferir que não existem diferenças drásticas no metaboloma antes do confinamento entre os grupos de eficiência alimentar.

Afim de se verificar analitos significantes entre os grupos tanto o teste *t-student* quanto o teste *SAM-based feature selection* foi aplicado com uma correção de FDR (1.000 permutações) devido ao alto número de variantes (analitos). Nenhum analito se mostrou com diferentes concentrações entre os grupos de eficiência alimentar no modo negativo.

6.4. Análise diferencial do metaboloma no modo positivo

Antes das análises foi realizado a mediana das intensidades das replicatas técnicas. As etapas de normalização e transformação dos dados ($\log_2$) foram realizadas como descrito anteriormente. As figuras 13 e 14 demonstram características descritivas dos dados.

Figura 13- Distribuição dos analitos antes (esquerda) e depois (direita) da normalização e transformação de escala e $\log_2$ das intensidades no modo negativo.

Figura 14- Distribuição do *Fold-change* (A) e *Volcano plot* do grupo de alta e baixa eficiência alimentar (B).

Como observado na Figura 15A, nenhum *outlier* foi encontrado. A análise PLS-DA (Figura 15B), seu *cross-validation* e permutação (2000 randomizações) foram realizados. Os 4 analitos de maior *fold-change* estão exibidos na tabela 5.

Figura 15- Análises multivariadas no modo negativo de aquisição: PCA (A); PLS-DA (B)

Tabela 5- Analitos com *fold change* maiores que 0,45 entre os grupos de alta (HFE) e baixa (LFE) eficiência alimentar.

ANALITO	HFE MÉDIA(SD)	LFE MÉDIA(SD)	FOLD CHANGE	LOG2
12.48_665.7148m/z	17.0962(36.27)	4.7472(8.20)	3.6014	1.8485
12.93_547.5992m/z	0.8836(0.76)	1.8333(1.37)	0.48195	-1.053
1.26_123.1141m/z	0.6125(0.26)	1.2992(0.81)	0.47147	-1.0848
13.07_392.3761n	1.3875(0.56)	2.9999(4.35)	0.46251	-1.1124

O modelo do PLS-DA gerado no modo positivo com 2 componentes principais foi bem construído $R^2=0,98$, porém a predição do modelo também não foi satisfatória ($Q^2= 0,15$). O método de permutação, assim como no modo negativo, afirma que a agrupamento observada na figura 14B foi liderada por artefatos (valor de $P = 0,999$ (1999/2000 permutações)).

Pelo teste univariado *SAM-based feature selection*, um analito é significativamente diferente ($FDR < 0,05$; figura 16). O analito tem tempo de retenção 4 minutos e valor massa-carga de 183,1670 (Figura 17), porém não foi possível identificar esse metabólito nesse estudo.

Figura 16- Análise SAM para os analitos no modo positivo.

Figura 17- Diferença de concentração do analito de tempo de retenção 4 minutos e massa-carga 183,1670 entre os grupos de alta (HFE) e baixa (LFE) eficiência alimentar.

6.5. Análises de co-expressão de metabólitos no modo negativo

Análise de redes de metabólitos co-expressos foi realizada com 2.156 metabólitos no modo de aquisição negativo. Para a análise de co-expressão foi realizado um teste para identificar a presença de amostras que tinham um comportamento muito aquém do resto dos dados (*outliers*). Assim, a amostra 15 foi retirada das análises posteriores (Figura 18).

Figura 18- Agrupamento das amostras para identificação de *outliers*: amostra 15 excluída;

A análise de co-expressão identificou 25 módulos de analitos co-expressos e altamente conectados (Figura 19). O dendrograma reflete o agrupamento hierárquico dos valores de sobreposição topológica entre os analitos e os ramos o corte em função da sua forma, definindo assim os módulos e atribuindo-lhes cores.

Figura 19- Dendrograma dos analitos e cores dos módulos correspondentes.

A análise da correlação destes módulos com o CAR foi significativa para um módulo (*METurquoise* 53% de correlação $p < 0,05$) contendo 215 analitos e uma variância explicada pelo módulo *eigengene* de 55,65% (Figura 20). Ao analisarmos a correlação entre a afinidade do analito ao módulo e sua contribuição para a variação do CAR verifica-se uma moderada tendência ($cor=0,38$) dos analitos centrais dos módulos serem os que mais contribuem com a característica (Figura 21). Analitos candidatos como centrais foram selecionados com base nas medidas de significância do analito (SG) e de filiação ao módulo (FM). A medida de SG é calculada por teste de correlação (*Pearson*) entre o valor de expressão dos analitos e a característica fenotípica e é uma indicação da importância biológica do gene para a eficiência alimentar. Em soma, o FM é calculada por teste de correlação (*Pearson*) entre o valor de expressão dos analitos e o módulo *eigengene* e também é uma indicação de analitos importantes para a característica já que valores elevados de FM tendem a indicar analitos centrais nos módulos. No total, 25 analitos foram significativos para SG (para CAR com valor de $P < 0,05$) e apresentaram valores de $FM > 0,8$ indicando uma forte filiação aos módulos (Tabela 6).

Correlações dos Módulos e CAR

Figura 20- Correlações entre os módulos e medidas de consumo alimentar residual (CAR). Em caixa vermelha destaca-se os módulos que apresentam correlações significativas à característica.

Figura 21- Correlação entre a contribuição dos analitos e sua importância para o CAR no módulo *Turquoise* (A); Analitos (m/z) e suas contribuições (FM em tamanho) para o módulo (B).

Tabela 6- Metabólitos centrais do módulo *Turquoise*, do modo negativo, sua afinidade com o módulo (FM) e sua correlação com o CAR (GS) e valores de significância, respectivamente.

ANALITO (FORMULA)	m/z	GS (VALOR DE P)	FM (VALOR DE P)	K(within)
10.07_271.3022m/z	271.3022	0.6893 (0.0045)	0.9451 (1.11E-07)	40.1440
10.13_325.1847m/z	325.1847	0.5718 (0.0260)	0.8401 (8.87E-05)	22.5216
10.24_250.3271n	295.3044	0.5455 (0.0354)	0.9643 (7.09E-09)	46.3047
10.44_297.3202m/z	297.3202	0.7593 (0.0010)	0.8638 (3.32E-05)	24.2430
10.46_271.3021m/z	271.3021	0.6761 (0.0057)	0.9471 (8.68E-08)	40.5805
ALL-TRANS-RETINOYL-BETA-GLUCURONIDE	491.2248	0.6323 (0.0114)	0.9015 (4.44E-06)	33.5001
11.01_225.2565m/z	225.2565	0.5579 (0.0307)	0.9408 (1.79E-07)	40.1366
11-HYDROXYEICOSATETRAENOATE GLYCERYL ESTER	429.2443	0.5170 (0.0485)	0.9342 (3.51E-07)	38.5633
11.01_497.2390m/z	497.239	0.5949 (0.0193)	0.9276 (6.41E-07)	38.6708
11.02_299.3357m/z	299.3357	0.6392 (0.0103)	0.9398 (1.99E-07)	40.2288
11.02_565.2230m/z	565.223	0.5606 (0.0297)	0.8855 (1.13E-05)	29.8979
11.78_286.3665n	321.2844	0.5506 (0.0334)	0.9588 (1.75E-08)	45.4714
11.79_344.2776n	389.2758	0.6214 (0.0134)	0.9237 (8.93E-07)	36.4073
11.79_665.4900m/z	665.49	0.5879 (0.0212)	0.9245 (8.35E-07)	37.3379
11.80_659.4356m/z	659.4356	0.6332 (0.0113)	0.8788 (1.61E-05)	23.5446
11.87_647.4407m/z	647.4407	0.5909 (0.0204)	0.8161 (0.0002)	19.4012
12.39_1083.7217m/z	1083.7217	0.5314 (0.0415)	0.8422 (8.16E-05)	18.7449
12.54_175.1622n (C19H36O4)	349.2356	0.5185 (0.0477)	0.9763 (5.10E-10)	49.9498
12.54_690.5465m/z	690.5465	0.5286 (0.0428)	0.9714 (1.70E-09)	47.6000
12.61_641.5294m/z	641.5294	0.5164 (0.0487)	0.9565 (2.51E-08)	41.8751
12.64_473.3041m/z	473.3041	0.5241 (0.0449)	0.9724 (1.35E-09)	45.9155
12.89_295.3301m/z	295.3301	0.6538 (0.0082)	0.9086 (2.77E-06)	31.8820
9.73_269.2863m/z (C16H32O4)	269.2108	0.6149 (0.0147)	0.8931 (7.41E-06)	29.9425
9.98_269.2866m/z	269.2866	0.6138 (0.0149)	0.9581 (1.96E-08)	43.7148

6.6. Análises de co-expressão de metabólitos no modo positivo

Análise de redes de metabólitos co-expressos foi realizada com 2.524 metabólitos no modo positivo. Como exposto anteriormente a amostra 15 foi retirada das análises posteriores (Figura 22) por poder influenciar essa análise. A análise de co-expressão identificou 22 módulos de analitos co-expressos (Figura 23).

Figura 22- Agrupamento das amostras para identificação de *outliers*: amostra 15 excluída.

Figura 23- Dendrograma dos analitos e cores dos módulos correspondentes.

A análise da correlação destes módulos com o CAR foi significativa para um módulo (*MEturquoise* 52% de correlação; valor de $P < 0,10$), contendo 387 analitos e uma variância explicada pelo módulo *eigengene* de 45,26% (Figura 24). A correlação entre a afinidade do analito ao módulo e sua contribuição para a variação do CAR verifica-se uma alta tendência ($cor=0,45$) dos analitos centrais dos módulos serem os que mais contribuem com a característica (Figura 25). No total, 24 analitos foram significativos para SG (para CAR com valor de $P < 0,05$) e apresentaram valores de $FM > 0,8$ indicando uma forte filiação aos módulos (Tabela 7).

Figura 24- Correlações entre os módulos e medidas de consumo alimentar residual (CAR). Em caixas vermelhas destaca-se os módulos que apresentam correlação à característica.

Figura 25. Correlação entre a contribuição dos analitos e sua importância para o CAR no módulo *Turquoise*; Analitos (m/z) e suas contribuições (FM em tamanho) para o módulo.

Tabela 7- Metabólitos centrais do módulo *Turquoise* do modo positivo, sua afinidade com o módulo (FM) e sua correlação com o CAR (GS) e valores de significância, respectivamente.

ANALITO (FORMULA)	m/z	GS (VALOR DE P)	FM (VALOR DE P)	K (<i>within</i>)
11.30_208.2516n	209.2606	0.5841 (0.0360)	0.9511 (5.98E-07)	51.2192
12.16_219.2823m/z	219.2823	0.5738 (0.0402)	0.9595 (2.15E-07)	54.5177
11.14_265.3273m/z	265.3273	0.6300 (0.0209)	0.8552 (0.000193)	27.6818
10.91_222.2332n	267.2105	0.6878 (0.0093)	0.8218 (0.000567)	25.6737
9.43_267.2678m/z	267.2678	0.7794 (0.0016)	0.8256 (0.000507)	21.0854
11.31_207.2251n	271.2409	0.6066 (0.0279)	0.9561 (3.31E-07)	53.5169
12.93_273.2966m/z	273.2966	0.6524 (0.0156)	0.8265 (0.000495)	25.8592
11.74_285.2548m/z	285.2548	0.681 (0.0103)	0.8799 (7.27E-05)	28.4345
11.74_292.7340m/z	292.734	0.5955 (0.0317)	0.8066(0.000863)	20.3835
12.19_293.7433m/z	293.7433	0.5531 (0.0498)	0.7998 (0.001029)	23.0304
11.35_295.2364m/z	295.2364	0.6732 (0.0116)	0.8095 (0.00079)	19.9989
10.73_272.3082n (C16H32O3)	295.2242	0.717 (0.0057)	0.9311 (3.77E-06)	43.5665
12.15_316.2782n	299.2749	0.5917 (0.0331)	0.9533(4.66E-07)	51.0626
12.65_313.2913m/z	313.2913	0.6075 (0.0276)	0.9117 (1.43E-05)	37.8485
11.02_280.3127n (C18H32O2)	313.2731	0.5900 (0.0337)	0.9174 (1.00E-05)	35.7798
10.73_298.3257n	321.3213	0.7791 (0.0016)	0.8860 (5.53E-05)	31.1486
11.37_300.3471n	323.3363	0.6344 (0.0198)	0.9207 (8.02E-06)	43.8429
11.15_322.3299n	323.3372	0.5961 (0.0315)	0.8754 (8.84E-05)	28.887
12.93_334.3819n	373.3099	0.6062 (0.0280)	0.8326 (0.00041)	24.0095
11.85_471.2170m/z	471.217	0.6376 (0.0190)	0.8577 (0.00017)	30.2415
11.74_509.3552m/z	509.3552	0.6272 (0.0217)	0.8092 (0.00080)	20.3132
11.75_532.4242m/z	532.4242	0.5716 (0.0412)	0.9322 (3.46E-06)	40.2599
12.03_569.3849m/z	569.3849	0.6470 (0.0168)	0.8250 (0.000516)	20.4612
12.89_790.5814n	835.5239	0.5567 (0.0481)	0.9345 (2.88E-06)	47.2804

6.7. Enriquecimento funcional

Para identificar quais as possíveis funções as quais estes módulos significativos de co-expressão estão relacionados à eficiência alimentar, foi utilizado o *software mummichog* 3.0, programa *Python* que prediz a atividade biológica provinda dos dados metabolômicos sem identificação prévia dos analitos. O *mummichog* identifica utilizando os resultados de análises univariadas (*t-test score* e seu respectivo valor de P) e prediz redes de vias metabólicas baseadas nas bases de dados KEEG, UCSD, RECON1 e *Edinburgh human metabolic network* (LI et al., 2013).

Um total de 13 vias metabólicas foram associadas (Tabela 8) e significativas (*valor de P* <0,01), sendo 9 vias correspondente ao modo negativo e 4 vias ao modo positivo.

Tabela 8- Vias metabólicas associadas à eficiência alimentar preditas pelo *mummichog* (valor de *P* < 0,01).

Via metabólica	valor de P	Modo de Aquisição
Metabolismo vitamina A (retinol)	8.59E-03	Negativo
Metabolismo da Vitamina K	8.02E-03	Positivo
Oxidação Peroximal do ácido Fitânico	6.98E-03	Positivo
Metabolismo da Lisina	5.87E-03	Negativo
Ciclo da Uréia/Metabolismo grupo amino	4.68E-03	Negativo
Metabolismo do Glicerofosfolípídeo	3.65E-03	Negativo
Metabolismo de ácidos graxos	3.32E-03	Negativo
Biosíntese De novo de ácidos graxos	3.06E-03	Positivo
Ativação de ácidos graxos	2.88E-03	Positivo
Metabolismo do aspartato e asparagina	1.39E-03	Negativo
Metabolismo da Glicina, serina, alanine e treonina	1.20E-03	Negativo
Prostaglandina provinda do ácido araquidônico	1.10E-03	Negativo
Metabolismo da Vitamina E	1.08E-03	Negativo

A maioria das vias associadas com eficiência alimentar foram relacionadas a metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos, estresse oxidativo e vitaminas lipossolúveis.

7. DISCUSSÃO

7.1. Determinação do protocolo para extração de metabólitos

O protocolo de Dunn (2011) indicou-se mais adequado para os objetivos do projeto. Observou-se uma pequena deformidade de alguns picos cromatográficos indicando que a taxa de injeção da amostra deveria ser mais lenta para melhor separação dos pratos, durante o projeto piloto. Pelas figuras 4 e 5, verifica-se que aparentemente não houve influência no perfil cromatográfico se o padrão interno fosse colocado antes ou após a precipitação de proteínas. Então, foi mantido o proposto pelos protocolos de inserir o padrão interno antes da precipitação de proteínas, já que aparentemente, não há perdas do mesmo durante a precipitação. Uma adaptação foi feita devido à baixa intensidade na leitura, para melhorar essa intensidade foi adotado para extração de metabólitos, 100µL de amostra, mantendo as proporções dos solventes orgânicos.

7.2. Pre-processamento dos dados metabolômicos

A etapa de critério de qualidade (QA), tem como objetivo reduzir qualquer viés sistemático, causado pela ordem de injeção. Além disso, procura retirar possíveis artefatos ou ruídos que foram inferidos como analitos e, garantir que somente participem do experimento analitos com consistência observada pela injeção periódica do QC (SANGSTER et al., 2006; ZELENÁ et al., 2009).

Devido a maior exclusão de analitos pelo QA, o menor número de analitos inferidos, a pior distribuição das intensidades e a grande influência do tempo na eficiência da coluna cromatográfica (Figura 7), não foi realizado análises de co-expressão e concentração diferencial utilizando os dados provindos do software XCMS. Mais do que isso, foram testados diversos parâmetros como o aumento ou diminuição da relação sinal/ruído (*snthresh*), da largura de pico (*peakwidth*) e da concentração mínima para determinação de picos (*ppm*) e, os resultados não se mostraram satisfatórios. Uma maior influência de mudanças de tempo de retenção acometidas por desvios temporais na eficiência da coluna cromatográfica no XCMS (Figura 8), mesmo que a metodologia LOESS já esteja implementada no pacote R.

Assim, os dados utilizados se referem ao pre-processamento pelo *software* Progenesis QI tanto nos modos positivo quanto negativo.

7.3. Análise diferencial do metaboloma

Geralmente os íons derivados pelo processo do *Eletrospray* geram múltiplas cargas, onde o mesmo o analito intacto (sem fragmentação) recebe cargas positivas ou negativas (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012). No modo positivo, as cargas geralmente são geradas por protonização e analitos com adutos alcalinos são mais observados. Já no modo negativo, picos correspondentes a analitos desprotonizados são identificados. Desse modo, a análise realizada em ambos modos produzem uma caracterização complementar na cobertura de analitos, já que algumas espécies moleculares geram mais adutos em um modo de aquisição em comparação a outro modo (DEMARQUE et al., 2016).

Em relação aos resultados de análises multivariadas, a análise de componentes principais (PCA) é um importante método para reconhecimento de padrões gerais dos dados e classificação, dessa maneira, possui o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras e identificar amostras com comportamento anômalo (WU; MASSART; DE JONG, 1997). Apesar de não ter sido identificado nenhum *outlier*, observamos que um dos animais tinha um comportamento um pouco mais afastado de seu grupo em ambos os modos (amostra 95, figuras 12A e 15A). Outra observação do PCA é que em ambos os modos de aquisição, não houve uma separação em função dos grupos, indicando que previamente ao confinamento a variação do metaboloma sérico é bem tênue entre os animais de alta e baixa eficiência alimentar.

Tanto no modo positivo quanto no negativo as tendências de variações globais provindo do PLS-DA não foram satisfatórios (Figuras 12B e 15B), pois o modelo apesar de ser bem construído não conseguiu predizer os grupos. Além disso, pelo teste de permutação a separação entre os grupos de alta e baixa eficiência alimentar parecem ter sido liderados por artefatos criados durante a geração dos *loadings*.

Há a possibilidade de que o alto número de analitos presentes nas amostras com o baixo número de animais em cada grupo (16 animais no total do *design*

experimental) causou limitações do método de inferência. O PLDS-DA irá modelar uma relação entre variáveis dependentes e variáveis independentes, maximizando a covariância entre elas (BERRUETA; ALONSO-SALCES; HÉBERGER, 2007). O problema é que esse método pode mostrar excelente agrupamento mesmo que fosse gerado pelo acaso (WORLEY; POWERS, 2012), assim é importante se realizar um método de validação (teste de permutação). Segundo os pesquisadores Kjeldahl e Bro (2010), o método de validação é um passo crítico da análise e que, quando há pequeno número de amostras o método é mais sensível a erros gerados pela tentativa de separação o que acaba liderando interpretações errôneas pelos gráficos. Complementando-os, os pesquisadores Brereton e Lloyd (2014) também afirmam que apesar do PLS-DA ser uma técnica efetiva para classificação, estudos nas áreas de medicina e biologia devem utilizá-lo com cuidado devido ao alto número de variáveis com baixo número de amostras. Esses autores ainda indicam que nesse caso análises univariadas são mais robustas, pois há menos decisões a serem tomadas na interpretação e menos oportunidade de falsos-positivos serem gerados.

Assim, analisando resultados das análises univariadas, somente um analito mostrou-se diferente entre os grupos dentre os dois modos de aquisição. No modo negativo não houve nenhum metabólito diferencialmente presente entre os grupos de baixa e alto CAR. Porém, no modo positivo um analito se mostra diferencialmente concentrado (Figura 17), apesar de não identificado, esse resultado mostra que há grandes possibilidades de se identificar biomarcadores previamente ao confinamento em experimento de larga escala.

Há também a possibilidade de metabólitos que estejam diferentemente concentrados nos tecidos acabem sendo diluídos a tantos outros quando chegam no tecido sanguíneo. Os pesquisadores Widmann et al. (2013), mensurando 221 metabólitos conhecidos através de kit comercial *Biocrates* (<http://www.biocrates.com/>), revelaram 7 metabólitos em plasma diferencialmente concentrados durante o confinamento e, que estão associados a SNP's que explicam a variação do CAR. Porém, as correlações diretas entre a concentração desses metabólitos e a variação do CAR é numericamente baixa (correlações de -0,11 a 0,17). Assim, existe a evidência de que o tecido sanguíneo é um biofluido adequado para exploração do metaboloma associado a eficiência alimentar. Então, esse estudo sugere que o fato de serem animais hípidos (sem desordens metabólicas), a diferença

em vias metabólicas entre os grupos seja tênue anteriormente ao confinamento e, devido ao baixo número de animais nesse estudo, não foi possível captá-la melhor.

7.4. Análises de co-expressão de metabólitos

A complexidade gerada pela diversidade de informações e extrema capacidade dinâmica de tecidos torna o entendimento das relações entre análises globais e a característica avaliada um desafio (KOTALESKI; BLACKWELL, 2010; LEE et al., 2014). Porém, essa complexidade pode ser reduzida através do conceito de redes modulatórias, do qual, uma rede modulatória é composta por um pequeno grupo de nódulos densamente interligados entre si e pouco conexo a outros grupos (FOREST et al., 2017). Análises que utilizam redes modulares simplificam a interpretação e a *Weight Gene Co-expression Network* (WGCNA) é exemplo desse tipo de abordagem.

A análise WGCNA vem sendo aplicada a estudos globais do transcriptoma e metaboloma como uma diferente abordagem de visualizar a estrutura dos dados e verificar padrões de comportamento que sejam associados a características complexas (DILEO et al., 2011; WANG et al., 2013; ALEXANDRE et al., 2015; FOREST et al., 2017). Essa metodologia aplica um agrupamento hierárquico a uma matriz de sobreposição topológica (TOM), onde a sobreposição refere-se a força de relação entre dois analitos mensurados por rotas diretas e indiretas e assim, o uso do TOM torna possível criar redes modulares que posteriormente podem ser correlacionadas a variações fenotípicas (WANG et al., 2013).

Em ambos os modos de aquisição, o animal 95 (amostra 15, figuras 18 e 22) se mostrou aquém dos agrupamentos formados entre as amostras. Para essa análise, essa amostra poderia influenciar na criação de módulos em função de artefatos ou ruídos presentes e por esse motivo foi excluído. Como discutido no capítulo anterior, essa amostra já se mostrou com um comportamento um pouco afastada no PCA durante a análise diferencial.

No modo positivo e no negativo foram criados 22 e 25 módulos, respectivamente. A proporção de variância das amostras explicada pela variância modular foi em média 0,51 ($\pm 0,04$) por módulo no modo positivo e 0,55 ($\pm 0,07$) no modo negativo. Isso nos

traz a evidência de que o metaboloma se comporta de forma coordenada e que os módulos construídos são acurados para serem associados com a variação do CAR.

A análise de correlação entre os módulos criados e a variação fenotípica do CAR revela módulos, 1 no modo negativo (215 analitos, figura 20) e 1 no modo positivo (378 analitos, figura 24). Ao analisarmos a estrutura interna desses módulos que explicam a variação do CAR, eles nos revelam em torno de 25 analitos centrais em cada módulo (Figura 21 e 25). Esses analitos são extremamente conectados ao módulo e explicam grande parte de sua variação, evidenciando que grupos de analitos apresentam concentração coordenada no metaboloma sérico bovino e, juntos contribuem para predizer o CAR. Do total desses 49 analitos, foram possíveis a identificação dos metabólitos *all-trans-Retinoyl-beta-glucuronide* (HMDB03141) e o *11-hydroxyeicosatetraenoate glyceryl ester* (HMDB12530) ambos no modo negativo.

O metabólito *all-trans-Retinoyl-beta-glucuronide* (HMDB03141) é um composto de fórmula $C_{26}H_{36}O_8$ e que possui peso molecular 476,5592 Daltons. Faz parte do metabolismo do Retinol em animais e corresponde a um metabólito natural e biologicamente ativo da vitamina A (BARUA, 1997). Esse metabólito é um dos produtos da detoxificação do ácido retinóico (forma oxidada da vitamina A) e desempenha importantes funções, servindo como uma fonte de reserva de vitamina A (principalmente no fígado) e um transportador do ácido retinóico até tecidos alvos (BARUA, 1997).

A vitamina A não é sintetizada pelo animal sendo dependente de absorção por meio da ingestão de fontes vegetais (OLDHAM; EBERHART; MULLER, 1991). É considerado um potencial biomarcador nutricional para o desenvolvimento, pois na ausência de vitamina A os mamíferos desenvolvem uma série de doenças como atrofia muscular, disfunções reprodutivas, baixa imunidade, queratinização epitelial, xeroftalmia e cegueira noturna (CLAGETT-DAME; DELUCA, 2002; DE RISIO et al., 2010; TANUMIHARDJO, 2011). Segundo He et al. (2012), a carência de vitamina A em bovinos revelou uma diminuição da regeneração de danos causados a mucosa do epitélio intestinal, reduzindo o combate a inflamação e tornando o animal susceptível a infecções bacterianas. Esses resultados corroboram com dados previamente publicados por nosso grupo que revelaram que animais de baixa eficiência alimentar possuem uma maior porcentagem de inflamação periportal por infiltrados

mononucleares no fígado, bem como, redes de transcritos envolvidos em processos de resposta anti-inflamatória no final do confinamento (Alexandre et al, 2015).

O metabólito *11-hydroxyeicosatetraenoate glyceryl ester* (HMDB12530) possui fórmula química $C_{23}H_{38}O_5$ e peso molecular de 394,5448 Daltons. Também conhecido como 11(R)-HETE, esse metabólito é provindo do ácido aracnidônico pela ação enzimática de ciclooxygenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) durante o processo inflamatório (LEE et al., 2005). Em humanos esse metabólito pró inflamatório possui correlação positiva linear com aumento de leptina sérica, tamanho e peso corporal (PICKENS et al., 2017). Como publicado por Alexandre et al. (2015) os animais entraram no confinamento com diferenças significativas no começo do confinamento em relação a deposição de gordura, no qual os animais menos eficientes apresentavam maior deposição de gordura. Os níveis séricos de leptina possuem correlação positiva com a quantidade de tecido adiposo, uma vez que são produzidos por ele (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Durante o processo inflamatório macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio auxiliando na sua função fagocitárias, o que pode elevar o estresse oxidativo (FURUKAWA et al., 2004). O estresse oxidativo já foi descrito como um dos principais fatores da variação do CAR (BOTTJE et al., 2006). Esses autores afirmam que em comparação a animais de alta eficiência alimentar, os animais com baixa eficiência apresentam uma diminuição na cadeia de transporte de elétrons, perda de elétrons seguido do aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e aumento da oxidação de proteína. Diversos trabalhos reportam diferenças funcionais na mitocôndrias do músculo esquelético, fígado e intestino em galinhas de alta e baixa eficiência alimentar (BOTTJE et al., 2002b; IQBAL et al., 2004; OJANO-DIRAIN et al., 2005b) e, em intestino de bovinos (KOLATH et al., 2006).

A presença desses dois metabólitos no mesmo módulo sugere a relação dessas duas vias metabólicas como dependentes. Então, como é possível o aumento do metabólito, fonte principal de reserva de vitamina A bem como ser seu transportador sérico estar envolvido com um metabólito biomarcador de oxidação peroximal?

O estresse oxidativo induz a formação de espécies reagentes ao oxigênio (ROS) e, se não regulada, causa danos celulares, perturba o estado oxidativo, eleva danos ao DNA, a carbonilação de proteínas e a peroxidação lipídica (CAMPBELL, 1983). A suplementação de vitamina A diminuiu a formação de ROS em células hepáticas de ratos, afirmando a contribuição dessa vitamina para o estresse oxidativo (CAMPBELL,

1983). Além disso, os autores Cha, Yu e Seo (2016) observaram um aumento de ingestão de matéria seca em ratos em função da presença de vitamina A, evidenciando que o estresse oxidativo altera está relacionado ao comportamento ingestivo.

Assim, os resultados desse estudo sugerem que a alteração do nível sérico do *all-trans-Retinoyl-beta-glucuronide* em animais menos eficientes é liderado pelo maior estresse oxidativo (baseado no aumento do *11-hydroxyeicosatetraenoate glyceryl*) antes do confinamento e, com a maior presença de vitamina A sérica, a maior ingestão é observada pela ineficiência energética do animal.

7.5. Enriquecimento funcional

Apesar dos metabolitos serem uma leitura direta da atividade funcional da célula ou tecido, o uso da metabolômica na construção de modelos metabólicos é raro devido à escassez de dados metabolômicos bem anotados (DEO et al., 2010; PLATA et al., 2010). De tal modo que análises globais de metabólitos são raramente extrapoladas no entendimento de vias metabólicas e análises de redes sem conhecer todos os metabólitos envolvidos (LI et al., 2013).

As análises globais de metabólitos, como a desse estudo, envolvem tipicamente identificar a razão massa-carga (m/z) e o tempo de retenção na coluna cromatográfica, mas sua identidade química não é conhecida. Para essa identificação usualmente é necessária uma análise num espectrômetro de massa tandem, verificando o padrão de fragmentação de um analito específico. Desse modo, a identificação de metabólitos é um obstáculo em análises *untargeted* (DUNN et al., 2013).

Mummichog prediz cada metabólito experimentalmente antes do enriquecimento funcional utilizando informações da razão massa-carga, tempo de retenção, *t-score* e valor de P, conforme sua metodologia descrita por Li et al. (2013). Esses autores validam essa metodologia em células do sistema imune inato e a predição das vias metabólicas confirmadas por expressão gênica e identificação *targeted* dos metabólitos. Essa metodologia consegue ultrapassar o obstáculo de identificação e predizer tanto os metabólitos quanto as vias metabólicas envolvidas e, assim, vem

sendo utilizado nas áreas de biologia e imunologia (HARIHARAN et al., 2014; HOFFMAN et al., 2014; XU et al., 2014).

Foram preditas 13 vias metabólicas (Tabela 8), compreendendo 9 no modo negativo (metabolismo da Vitamina E, Prostaglandina provinda do ácido araquidônico, metabolismo da Glicina, serina, alanina e treonina, metabolismo do Aspartato e asparagina, metabolismo de ácidos graxos, metabolismo do Glicerofosfolípídeo, Ciclo da Uréia/Metabolismo grupo amino, metabolismo da Lisina e metabolismo vitamina A (retinol)) e 4 no modo positivo (Ativação de ácidos graxos, Biosíntese *De novo* de ácidos graxos, Oxidação Peroximal do ácido Fitânico e metabolismo da Vitamina K). Das características gerais foram identificadas alterações de processos envolvendo mecanismos anti-inflamatórios, síntese de aminoácidos, metabolismo de vitaminas antioxidantes e estresse oxidativo. A vitamina A já foi descrita anteriormente.

A vitamina E (família tocoferol) possui atividades antioxidantes e sua concentração no soro depende do fígado, principal fonte de reserva (WU; CHENG; WANG, 2017). Como antioxidante, a vitamina E combate a produção de ROS provindo da oxidação lipídica e também possui função imunológica e anti-inflamatória (CARDENAS; GHOSH, 2013; JIANG, 2014; WU; MEYDANI, 2014). Em trabalho publicado por Slama et al. (2009) o aumento da vitamina E sérica causou a diminuição das concentrações de leptina e pode possuir controle na secreção (correlação $r = -0,452$; $p = 0,01$). A leptina tem sido associada negativamente a eficiência alimentar, animais menos eficientes apresentam mais tecido adiposo e maiores concentrações de leptina (CHILLARD et al., 1998; JI et al., 1997; MINTON et al., 1998a). Vários autores vem descrevendo correlações negativas entre os níveis séricos de vitamina A e E com a quantidade de tecido adiposo em humanos (AASHEIM et al., 2008; BOTELLA-CARRETERO et al., 2010; NEUHOUSER et al., 2001; VIROONUDOMPHOL et al., 2003; WHITE et al., 2001).

Segundo Vos et al. (2012) a vitamina K tem papel importante no combate a efeitos deletérios nas funções mitocondriais, transportando elétrons na cadeia de elétrons mitocondrial, resultando no uso mais eficiente de oxigênio e produção de ATP. Essa função é confirmada em bovinos por Baldoceda-Baldeon et al. (2014) após ter uma melhora na produção *in-vitro* de embriões pela suplementação de vitamina K em embriões. Os autores relatam que a vitamina K melhorou a atividade mitocondrial

significativamente com a alteração de expressão dos genes ACAA2, ATP2B4, NDUFS7, CERS2, and MRPS7.

Prostaglandinas vem sendo caracterizadas como produtos metabólicos do ácido aracdônico liberados a partir de glicerofosfolipídeos após hidrólise da fosfolipase A2 e oxidação enzimática pela COX1 e COX2 (SHAYMAN, 2016). A conversão do ácido aracdônico em prostaglandina tem sido associada a processos inflamatórios em bovinos principalmente pela supressão de macrófagos e neutrófilos, bem como de células Th1-, CTL-, and NK (KALINSKI, 2012; MAŚLANKA, 2013a, 2013b). Além disso, a prostaglandina modula a produção de quimiocinas, inibindo a atração de células pro inflamatórias, ao mesmo tempo que aumenta a acumulação local de células T reguladoras e supressoras (KALINSKI, 2012; PRZYBYSZ et al., 2016).

Metabolismo de aminoácidos como lisina, glicina, serina, alanine, treonina e o ciclo da ornitina, também se encontram alterados nesse estudo. A Uréia já foi reportada por ser relacionada negativamente ao crescimento de massa magra e aumento de tecido adiposo em ruminantes (CAMERON, 1992; CLARKE et al., 1996). Além disso, o CAR possui correlação positiva com o nível sérico de uréia ($r = 0.26$, $P < 0.1$) e aspartato ($r = 0.34$; $P < 0.001$) (RICHARDSON et al., 2004). O estresse oxidativo altera a glicólise (SHI et al., 2009) e o ciclo do ácido cítrico (TRETTER; ADAM-VIZI, 2005) e a glicina, serina, alanina (que são aminoácidos não essenciais), são sintetizados por composto intermediários dessas vias (TRETTER; ADAM-VIZI, 2005).

A alteração no metabolismo da lisina (aminoácido essencial) pode ocorrer para regular o estresse oxidativo (TRETTER; ADAM-VIZI, 2005). A lisina possui um papel importante no metabolismo de ácidos graxos e precursor do glutamato (aminoácido não essencial) que auxilia na regulação energética e consumo alimentar (DELGADO, 2013). Além disso, o glutamato intermedia a ação da leptina no gasto energético (TRETTER; ADAM-VIZI, 2005). Alguns trabalhos mostram que altos níveis de glutamina intoxica os neurônios do núcleo arqueado no hipotálamo, causando perturbação da cascata de sinalização hipotalâmica na ação de leptina, provocando hiperleptinemia e propensão a obesidade (HERMANUSSEN; TRESGUERRES, 2003a, 2003b).

Em estudo anterior utilizando os mesmos animais, Alexandre et al. (2015) reportam significativas diferenças de GGT e de colesterol entre os animais de alta e baixa eficiência alimentar. Em relação ao colesterol, desde o começo os animais menos eficientes já possuíam maiores concentrações séricas de colesterol. O colesterol livre é tóxico para as células e precisa sofrer esterificação (reação da qual resulta a formação de ésteres) através da ativação de vias de síntese de ácidos graxos (SCHULMAN, 2017). Isso evidencia o enriquecimento das vias como o metabolismo de ácido graxos, metabolismo de glicerofosfolipídeos e ativação de ácidos graxos pelo *mummichog* que prediz que o colesterol está alterado.

O ácido fitânico é altamente encontrado na carne e leite de ruminantes (WANDERS; KOMEN; FERDINANDUSSE, 2011), a oxidação de ácido fitânico eleva a lipólise e induz danos oxidativos como o aumento de peróxido de hidrogênio (SCHÖNFELD; REISER, 2006). Alteração do ácido fitânico aparecem em duas vias pelo *mummichog*, sendo ativação de ácidos graxos e oxidação peroximal do ácido fitânico. Isso nos traz a hipótese que diferenças na eficiência e estresse oxidativos já ocorrem antes do confinamento entre os animais de baixa e alta eficiência alimentar.

Desse modo, esse estudo demonstra tanto novas alterações quanto alterações já descritas como associadas a eficiência alimentar. Mais do que isso, aparentemente essas diferenças já aconteceriam previamente ao confinamento. Por fim, a análise metabolômica mostrou-se uma ferramenta que poderia auxiliar na explanação dos processos moleculares envolvidos na eficiência alimentar. Baseado nesses resultados gera-se novas hipóteses dos mecanismos envolvidos anteriormente ao confinamento que explicariam a variação do CAR durante o confinamento (figura 25).

Figura 26- Modelo esquemático das hipóteses geradas a partir dos resultados que predizem a variação do CAR. Setas Azuis foram mensuradas no confinamento; Setas verdes já foram descritas na literatura; Setas vermelhas são ligações hipotéticas geradas pelo autor baseado em correlações individualizadas provindas da discussão do trabalho.

Esse trabalho gera a hipótese de que os animais de baixa eficiência alimentar possuem mais gordura sérica que gerará processos inflamatórios acarretando em estresse oxidativo que já é observado anteriormente ao confinamento. Essa susceptibilidade à inflamação e estresse oxidativo irá alterar processos fisiológicos já associados a baixa eficiência alimentar, além disso, essas alterações prejudicam a ação de mecanismos que combateriam o estresse oxidativo que se acentuaria no período do confinamento.

Por fim, esse estudo é pioneiro na análise global de metabólitos (*untargeted metabolomics*) na raça Nelore, sendo também pioneiro em caracterizar perfis associados à eficiência alimentar. Porém o que acreditamos ser de maior interesse é ter determinado estes resultados em amostras dos animais previamente ao confinamento com dieta concentrada. Mais interessante ainda em específico, anterior à prova de confinamento. Com isso, os resultados gerados provem de diferenças intrínsecas de animais hígidos que parecem influenciar seu comportamento e desempenho no período do confinamento.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que anteriormente ao confinamento já existe uma diferença no perfil global de metabólitos entre animais de alta e baixa eficiência alimentar, sendo caracterizados em concentração diferencial e formando módulos de co-expressão. Além disso, evidenciamos a possível existência de um biomarcador para a seleção de animais eficientes previamente ao confinamento.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Esse trabalho evidencia vias que já foram descritas como associadas a eficiência alimentar previamente ao confinamento. Isso abre um leque de grandes oportunidades de explorar individualmente o comportamento dessas vias antes do confinamento. Monitorar esse *feature* encontrado diferencialmente expresso nos animais eficientes pode identificar um possível biomarcador para seleção de animais.

Aumentar o número de animais nos próximos estudos de metabolômica utilizando animais hípidos poderia ajudar a driblar dificuldades encontradas nas análises multivariadas. Realizei um teste (*Power analysis*) com os dados para estimar o número mínimo de amostras que trariam resultados acurados e essa análise me retornou que teriam de ter no mínimo 16 animais em cada grupo.

10. REFERENCIAS

- AASHEIM, E. T. et al. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 2, p. 362–9, fev. 2008.
- ABERLE, E. D. Meat as food. In: **Principles of Meat Science**. [s.l.] Kendall/Hunt, 2001. p. 3.
- ABIEC. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 10 nov. 2016.
- ACKERSTAFF, E.; GLUNDE, K.; BHUJWALLA, Z. M. Choline phospholipid metabolism: A target in cancer cells? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 90, n. 3, p. 525–533, 15 out. 2003.
- ADAM, I. et al. Energy cost of eating in cattle given diets of different form. **Animal Production**, v. 38, n. 1, p. 53–56, 2 fev. 1984.
- ADAMS, M. W.; BELYEA, R. L. Nutritional and energetic differences of dairy cows varying in milk yield. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 182, 1987.

- AJMONE-MARSAN, P.; GARCIA, J. F.; LENSTRA, J. A. On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. **Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews**, v. 19, n. 4, p. 148–157, 26 ago. 2010.
- ALEXANDRE, P. A. et al. Bovine NR1I3 gene polymorphisms and its association with feed efficiency traits in Nellore cattle. **Meta Gene**, v. 2, p. 206–217, dez. 2014.
- ALEXANDRE, P. A. et al. Liver transcriptomic networks reveal main biological processes associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1073, 18 dez. 2015.
- ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 5 mar. 2015.
- ANIZAN, S. et al. Gas chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomic to screen for anabolic practices in cattle: identification of 5 α -androst-2-en-17-one as new biomarker of 4-androstenedione misuse. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 1, p. 131–140, jan. 2012.
- 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**, v. 75, n. 8, p. 2024–32, ago. 1997.
- ARCHER; ET AL. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 147–161, 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.
- BALDOCEDA-BALDEON, L. M. et al. Improvement of bovine in vitro embryo production by vitamin K2 supplementation. **Reproduction**, v. 148, n. 5, p. 489–497, 8 out. 2014.
- BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2012.
- BARDERAS, M. G. et al. Metabolomic Profiling for Identification of Novel Potential Biomarkers in Cardiovascular Diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.
- BARENDSE, W. et al. A Validated Whole-Genome Association Study of Efficient Food Conversion in Cattle. **Genetics**, v. 176, n. 3, p. 1893–1905, 4 maio 2007.
- BARUA, A. B. Retinoyl beta-glucuronide: a biologically active form of vitamin A. **Nutrition reviews**, v. 55, n. 7, p. 259–67, jul. 1997.
- BASARAB, J. A. et al. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 2, p. 189–204, jun. 2003.
- BECKER, S. et al. LC–MS-based metabolomics in the clinical laboratory. **Journal of Chromatography B**, v. 883–884, p. 68–75, fev. 2012.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, out. 2007.
- BEN SLAMA, F. et al. [Vitamins A, E and leptin in obese and non-insulin-dependent diabetes]. **La Tunisie medicale**, v. 87, n. 11, p. 726–30, nov. 2009.
- BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 196–214, jul. 2007.

- BERRY, D. P. Breeding strategies to reduce environmental footprint in dairy cattle. **Advances in Animal Biosciences**, v. 4, n. s1, p. 28–36, 27 set. 2013.
- BERRY, D. P.; CROWLEY, J. J. Residual intake and body weight gain: A new measure of efficiency in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 1, p. 109–115, 1 jan. 2012.
- BERRY, D. P.; CROWLEY, J. J. CELL BIOLOGY SYMPOSIUM: Genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 4, p. 1594–1613, 1 abr. 2013.
- BISHOP, M. D. et al. Divergent selection for postweaning feed conversion in Angus beef cattle: II. Genetic and phenotypic correlations and realized heritability estimate. **Journal of animal science**, v. 69, n. 11, p. 4360–7, nov. 1991.
- BISHOP, S. C. Phenotypic and genetic variation in body weight, food intake and energy utilization in Hereford cattle II. Effects of age and length of performance test. **Livestock Production Science**, v. 30, p. 19–31, 1992.
- BOTELLA-CARRETERO, J. I. et al. Retinol and α -Tocopherol in Morbid Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 1, p. 69–76, 2 jan. 2010.
- BOTHWELL, J. H. F.; GRIFFIN, J. L. An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 493–510, maio 2011.
- BOTTJE, W. et al. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poultry science**, v. 81, n. 4, p. 546–55, abr. 2002a.
- BOTTJE, W. et al. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. **Poultry Science**, v. 81, n. 4, p. 546–555, 1 abr. 2002b.
- BOTTJE, W. et al. Feed efficiency and mitochondrial function. **Poultry science**, v. 85, n. 1, p. 8–14, jan. 2006.
- BRADFORD, G. . Contributions of animal agriculture to meeting global human food demand. **Livestock Production Science**, v. 59, n. 2–3, p. 95–112, jun. 1999.
- BRERETON, R. G.; LLOYD, G. R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. **Journal of Chemometrics**, v. 28, n. 4, p. 213–225, abr. 2014.
- BRUCE, S. J. et al. Evaluation of a protocol for metabolic profiling studies on human blood plasma by combined ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry: From extraction to data analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 372, n. 2, p. 237–249, jan. 2008.
- BRUEGEL, M. et al. Standardized peptidome profiling of human cerebrospinal fluid by magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 4, p. 608–615, maio 2009.
- BUJAK, R. et al. Metabolomics for laboratory diagnostics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 108–120, set. 2015.
- BYERLY, T. C. Feed and other costs of producing market eggs. **Agricultural Experiment Station: College Park**, 1941.
- CAMERON, N. D. Correlated physiological responses to selection for carcass lean content in sheep. **Livestock Production Science**, v. 30, n. 1–2, p. 53–68, jan. 1992.
- CAMERON, N. D. Correlated physiological responses to selection for carcass lean content in sheep. **Livestock Production Science**, v. 30, p. 53–68, 1996.
- CAMPBELL, E. Animal health in Australia. In: **Nutritional deficiencies and diseases of livestock**.

Canberra: Australian Publishing Service, 1983. v. 3p. 277.

CAPPER, J. L. et al. The environmental impact of recombinant bovine somatotropin (rbST) use in dairy production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 28, p. 9668–9673, 15 jul. 2008.

CAPPER, J. L. The environmental impact of beef production in the United States: 1977 compared with 2007. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 12, p. 4249–4261, 1 dez. 2011.

CAPPER, J. L.; CADY, R. A.; BAUMAN, D. E. The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 6, p. 2160–2167, 1 jun. 2009.

CARDENAS, E.; GHOSH, R. Vitamin E: A dark horse at the crossroad of cancer management. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 7, p. 845–852, out. 2013.

CARSTENS, G. E. et al. Genetic variation in energy expenditures of monozygous twin beef cattle at 9 and 20 months of age. **Energy Metabolism of Farm Animals**, n. 11, p. 312–315, 1989.

CEGLAREK, U. et al. Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography–triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 401, n. 1–2, p. 114–118, mar. 2009.

CHA, J.-H.; YU, Q.-M.; SEO, J.-S. Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 1, p. 26, 2016.

CHILLARD, Y. et al. Plasma leptin in underfed or overfed adult holstein and charolais cows and its relationship with adipose tissue cellularity. **International Journal of Obesity**, v. 22, n. 3, p. 171, 1998.

CLAGETT-DAME, M.; DELUCA, H. F. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 347–381, jul. 2002.

CLARKE, J. N. et al. Repeatabilities of blood plasma metabolites and their association with leanness in genotypes showing a wide divergence in carcass composition. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 56, p. 180–183, 1996a.

CLARKE, J. N. et al. Repeatabilities of blood plasma metabolites and their association with leanness in genotypes showing a wide divergence in carcass composition. **Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.**, v. 56, p. 180–83, 1996b.

COEN, M. et al. Integrated application of transcriptomics and metabonomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 1, p. 93–105, abr. 2004.

CREWS, D. H. D. Genetics of efficient feed utilization and national cattle evaluation: a review. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 4, n. 2, p. 152–65, 30 jun. 2005.

CROWLEY, J. J. et al. Genetic relationships between feed efficiency in growing males and beef cow performance. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 11, p. 3372–3381, 1 nov. 2011.

DE OLIVEIRA, J. A. et al. Association of the leptin gene with carcass characteristics in Nellore cattle. **Animal biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 229–42, 2013.

DE RISIO, L. et al. Neurological dysfunction and caudal fossa overcrowding in a young cheetah with hypovitaminosis A. **Veterinary Record**, v. 167, n. 14, p. 534–536, 2 out. 2010.

DELGADO, T. C. Glutamate and GABA in Appetite Regulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 2013.

DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products.

Nat. Prod. Rep., v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.

DEO, R. C. et al. Interpreting Metabolomic Profiles using Unbiased Pathway Models. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 2, p. e1000692, 26 fev. 2010.

DILEO, M. V. et al. Weighted Correlation Network Analysis (WGCNA) Applied to the Tomato Fruit Metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26683, 21 out. 2011.

DOBOS, R.; HERD, R. Spectral analysis of feeding patterns of steers divergent in residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, n. 7, p. 843, 2008.

DONG, F. et al. Serum metabolomics study of polycystic ovary syndrome based on UPLC-QTOF-MS coupled with a pattern recognition approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4683–4695, 10 jun. 2015.

DUNN, W. B. et al. Metabolic profiling of serum using Ultra Performance Liquid Chromatography and the LTQ-Orbitrap mass spectrometry system. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 288–298, ago. 2008.

DUNN, W. B. et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 6, n. 7, p. 1060–1083, 30 jun. 2011.

DUNN, W. B. et al. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. **Metabolomics**, v. 9, n. S1, p. 44–66, 26 mar. 2013.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210–230, abr. 2009.

ELLIS, D. I. et al. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 9, p. 1243–1266, set. 2007.

ELSIK, C. G. et al. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 522–528, 24 abr. 2009.

EXTRON, S. .; ET AL, A. Commercial benefits to the beef industry for genetic improvement in net fed efficiency. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, p. 338–41, 2000.

FAO. **World Agriculture Towards 2030-2050: the 2012 revision**. Italy: [s.n.].

FERRELL, C. L.; JENKINS, T. G. Cow type and the nutritional environment: nutritional aspects. **Journal of animal science**, v. 61, n. 3, p. 725–41, set. 1985.

FIEHN, O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, n. 3, p. 155–168, 2001.

FITZHUGH, H. A.; TAYLOR, C. S. Genetic analysis of degree of maturity. **Journal of animal science**, v. 33, n. 4, p. 717–25, out. 1971.

FOREST, M. et al. Gene networks show associations with seed region connectivity. **Human Brain Mapping**, mar. 2017.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763–770, 22 out. 1998.

FUHRER, T.; ZAMBONI, N. High-throughput discovery metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 31, p. 73–78, fev. 2015.

FUKUSHIMA, A. et al. Metabolomic correlation-network modules in Arabidopsis based on a graph-

clustering approach. **BMC Systems Biology**, v. 5, n. 1, p. 1, 2011.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 15 dez. 2004.

GIBBONS, H. et al. A metabolomics approach to the identification of biomarkers of sugar-sweetened beverage intake. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 3, p. 471–477, 1 mar. 2015.

GIKA, H. G. et al. Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography–TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 299–305, ago. 2008.

GODFRAY, H. C. J. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 12 fev. 2010.

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**, v. 12, n. 3, p. 2923–2936, 2013.

GOWDA, G. N. et al. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 5, p. 617–633, 9 set. 2008.

GRIFFITHS, W. J.; WANG, Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 7, p. 1882, 2009.

GUNSETT, F. Linear index selection to improve traits defined as ratios. **Journal of Animal Science**, v. 59, p. 1185–1193, 1984.

HARIHARAN, R. et al. Invariance and plasticity in the *Drosophila melanogaster* metabolomic network in response to temperature. **BMC Systems Biology**, v. 8, n. 1, p. 139, 24 dez. 2014.

HAYES, B. J. et al. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. **Genetics Selection Evolution**, v. 41, n. 1, p. 51, 2009.

HE, X. et al. Hypovitaminosis A coupled to secondary bacterial infection in beef cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 222, 2012.

HERD, R.; BISHOP, S. C. Genetic variation in residual feed intake and its association with other production traits in British Hereford cattle. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 111–119, 2000.

HERD, R. M.; ARTHUR, P. F. Physiological basis for residual feed intake. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. Num 14, Supp 09, p. E64–E71, 30 jan. 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**, v. 44, n. 5, p. 423, 2004.

HERMANUSSEN, M.; TRESGUERRES, J. A. F. Does the thrifty phenotype result from chronic glutamate intoxication? A hypothesis. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 31, n. 6, 20 jan. 2003a.

HERMANUSSEN, M.; TRESGUERRES, J. A. F. Does high glutamate intake cause obesity? **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 16, n. 7, p. 965–8, set. 2003b.

HOFFMAN, J. M. et al. Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. **Aging Cell**, v. 13, n. 4, p. 596–604, ago. 2014.

HONOUR, J. W. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: **Hormone Assays in Biological Fluids**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 53–74.

HORNING, E.C.; HORNING, M. G. Human metabolic profiles obtained by GC and GC/MS. **Journal of**

Chromatographic Science, v. 9, p. 129–140, 1971.

ILVES, A. et al. Alterations in milk and blood metabolomes during the first months of lactation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 5788–5797, out. 2012.

IQBAL, M. et al. Low Feed Efficient Broilers Within a Single Genetic Line Exhibit Higher Oxidative Stress and Protein Expression in Breast Muscle with Lower Mitochondrial Complex Activity. **Poultry Science**, v. 83, n. 3, p. 474–484, 1 mar. 2004.

IQBAL, M. et al. Compromised liver mitochondrial function and complex activity in low feed efficient broilers are associated with higher oxidative stress and differential protein expression. **Poultry science**, v. 84, n. 6, p. 933–41, jun. 2005.

Jl, S. Q. et al. Partial cloning of the bovine leptin gene and its expression in adipose depots and in cattle before and after finishing. **Journal of animal science**, v. 75, p. 167, 1997.

JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 72, n. 7, p. 76–90, jul. 2014.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S.; WEINSHILBOUM, R. M. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 653–683, fev. 2008.

KALINSKI, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 21–28, 1 jan. 2012.

KEARNEY, G. A. The length of test required to measure liveweight change when testing for feed efficiency. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 411–414, 2004.

KELL, D. B.; GOODACRE, R. Metabolomics and systems pharmacology: why and how to model the human metabolic network for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 2, p. 171–182, fev. 2014.

KELLNER, O. **The scientific feeding of animals**. McMillan ed. New York, NY: [s.n.].

KELLY, A. K. et al. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 109–123, 1 jan. 2010a.

KELLY, A. K. et al. Repeatability of feed efficiency, carcass ultrasound, feeding behavior, and blood metabolic variables in finishing heifers divergently selected for residual feed intake. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 10, p. 3214–3225, 1 out. 2010b.

KENNEDY, B. W.; VAN DER WERF, J. H.; MEUWISSEN, T. H. Genetic and statistical properties of residual feed intake. **Journal of animal science**, v. 71, n. 12, p. 3239–50, dez. 1993.

KESSNER, D. et al. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2534–2536, 1 nov. 2008.

KIRWAN, J. Metabolomics for the practising vet. **In Practice**, v. 35, p. 438–445, 2013.

KJELDAHL, K.; BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 7–8, p. 558–564, jul. 2010.

KLEIBER, M. **The fire of life. An introduction to animal energetics**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., New York: London, 1961.

KNOTT, S. A. et al. Rams with poor feed efficiency are highly responsive to an exogenous

adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 261–268, abr. 2008.

KOCH, R. M. et al. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 22, p. 486–94, 1963.

KOLATH, W. H. et al. The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers. **Journal of animal science**, v. 84, n. 4, p. 861–5, abr. 2006.

KOOTS, K. et al. Analyses of published genetic parameter estimates for beef production traits. **Animal Breeding Abstracts**, v. 62, p. 309–338, 1999.

KOTALESKI, J. H.; BLACKWELL, K. T. Modelling the molecular mechanisms of synaptic plasticity using systems biology approaches. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 239–251, abr. 2010.

KUHL, C. et al. CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 283–289, 3 jan. 2012.

KÜHN, C. Metabolomics in animal breeding. In: SUHRE, K. (Ed.). . **Genetics Meets Metabolomics**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 107–123.

LANGFELDER, P.; HORVATH, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 559, 2008.

LANNA, D.P.D.; ALMEIDA, R. A terminação de bovinos em confinamento. **Revista Visão Agrícola**, n. 3, 2005.

LEE, H. et al. Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db. **Nature**, v. 509, n. 7499, p. 195–200, 30 mar. 2014.

LEE, S. H. et al. Cyclooxygenase-2-mediated DNA Damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 31, p. 28337–28346, 5 ago. 2005.

LI, S. et al. Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 7, p. e1003123, 4 jul. 2013.

LINDON, J. C. et al. Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 187, n. 3, p. 137–46, 15 mar. 2003.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 194–204, mar. 2008.

LU, J. et al. Changes in Milk Proteome and Metabolome Associated with Dry Period Length, Energy Balance, and Lactation Stage in Postparturient Dairy Cows. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3288–3296, 5 jul. 2013.

LUITING, P.; URFF, E. M.; VERSTEGEN, M. W. A. Between animal variation in biological efficiency as related to residual feed consumption. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 42, p. 59–67, 1994.

MAMAS, M. et al. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 1, p. 5–17, 16 jan. 2011.

MAPA. **PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO: Brasil 2015/16 a 2025/26**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Proj_Agronegocio2016.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2017.

- MAPELLI, V.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 490–497, set. 2008.
- MAŚLANKA, T. Dexamethasone inhibits and meloxicam promotes proliferation of bovine NK cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, n. 2, p. 225–234, abr. 2013a.
- MAŚLANKA, T. Prostaglandin E2 inhibits proliferation of bovine NK cells. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 65, maio 2013b.
- MICHOPOULOS, F. et al. Metabolite Profiles from Dried Biofluid Spots for Metabonomic Studies using UPLC Combined with oaToF-MS. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 6, p. 3328–3334, 4 jun. 2010.
- MINTON, J. E. et al. Serum leptin is associated with carcass traits in finishing cattle. **Journal of animal science**, v. 76, n. 1, p. 231, 1998a.
- MINTON, J. E. E. et al. Serum leptin is associated with carcass traits in finishing cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 231, 1998b.
- MONTANHOLI, Y. R. et al. Assessing feed efficiency in beef steers through feeding behavior, infrared thermography and glucocorticoids. **animal**, v. 4, n. 5, p. 692–701, 16 maio 2010.
- MONTAÑO-BERMUDEZ, M.; NIELSEN, M. K.; DEUTSCHER, G. H. Energy requirements for maintenance of crossbred beef cattle with different genetic potential for milk. **Journal of animal science**, v. 68, n. 8, p. 2279–88, ago. 1990.
- NAKAMURA, K. et al. Large-scale multiplex absolute protein quantification of drug-metabolizing enzymes and transporters in human intestine, liver, and kidney microsomes by SWATH-MS: Comparison with MRM/SRM and HR-MRM/PRM. **PROTEOMICS**, v. 16, n. 15–16, p. 2106–2117, ago. 2016.
- NEUHOUSER, M. L. et al. Serum concentrations of retinol, alpha-tocopherol and the carotenoids are influenced by diet, race and obesity in a sample of healthy adolescents. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 8, p. 2184–91, ago. 2001.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054–1056, 23 out. 2008.
- NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 22 jan. 1999.
- NKRUMAH, J. D. et al. Genetic and phenotypic relationships of feed intake and measures of efficiency with growth and carcass merit of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 10, p. 2711, 2007.
- NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2000.
- NZOUGHET, J. J. et al. First insights into serum metabolomics of trenbolone/estradiol implanted bovines; screening model to predict hormone-treated and control animals’ status. **Metabolomics**, v. 11, n. 5, p. 1184–1196, 23 out. 2015.
- OJANO-DIRAIN, C. et al. Glutathione and respiratory chain complex activity in duodenal mitochondria of broilers with low and high feed efficiency. **Poultry science**, v. 84, n. 5, p. 782–8, maio 2005a.
- OJANO-DIRAIN, C. et al. Biochemical evaluation of mitochondrial respiratory chain in duodenum of low and high feed efficient broilers. **Poultry Science**, v. 84, n. 12, p. 1926–1934, 1 dez. 2005b.
- OLDHAM, E. R.; EBERHART, R. J.; MULLER, L. D. Effects of Supplemental Vitamin A or β -Carotene During the Dry Period and Early Lactation on Udder Health. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p.

3775–3781, nov. 1991.

OLIVEIRA, R. L.; BARBOSA, M. A. A. . **Bovinocultura de Corte: desafios e tecnologias**. [s.l.] Edufba, 2014.

OREŠIČ, M. Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 19, n. 11, p. 816–824, dez. 2009.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 22 mar. 2012.

PAULING, L. et al. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 10, p. 2374–6, out. 1971.

PICKENS, C. A. et al. Obesity is positively associated with arachidonic acid-derived 5- and 11-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE). **Metabolism**, v. 70, p. 177–191, maio 2017.

PLATA, G. et al. Reconstruction and flux-balance analysis of the Plasmodium falciparum metabolic network. **Molecular Systems Biology**, v. 6, 7 set. 2010.

PRZYBYSZ, J. et al. The influence of prostaglandin E2 on the production of IFN- γ by bovine CD4+, CD8+ and WC1+ T cells. **Research in Veterinary Science**, v. 105, p. 31–35, abr. 2016.

QI, X.; ZHANG, D. Plant metabolomics and metabolic biology. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 9, p. 814–815, set. 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. In: **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria: [s.n.].

RAMSEY, R. et al. Factors Affecting Beef Cow-Herd Costs, Production, and Profits. **Journal of Agricultural and Applied Economics**, v. 37, n. 1, p. 91–99, 28 abr. 2005.

REGAL, P. et al. Evaluation of the Discriminative Potential of a Novel Biomarker for Estradiol Treatments in Bovine Animals. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 1, p. 370–378, 2014.

REO, N. V. NMR-BASED METABOLOMICS. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 375–382, 9 jan. 2002.

RICHARDSON, E. et al. Pedometers measure differences in activity in bulls selected for high or low net feed efficiency. **Proceedings of Australian Society for the Study of Animal Behaviour**, v. 26, p. 16, 1999.

RICHARDSON, E. C. et al. Possible physiological indicators for net feed conversion efficiency in beef cattle. **Proceedings of Australian Society for the Study of Animal Behaviour**, v. 21, p. 103–106, 1996.

RICHARDSON, E. C. et al. Body composition and implications for heat production of Angus steer progeny of parents selected for and against residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, n. 7, p. 1065, 2001.

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

RIJK, J. C. W. et al. Metabolomics Approach to Anabolic Steroid Urine Profiling of Bovines Treated with Prohormones. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 6879–6888, 15 ago. 2009.

ROBERTSON, D. G.; FREVERT, U. Metabolomics in Drug Discovery and Development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, n. 5, p. 559–561, nov. 2013.

ROESSNER, U.; BOWNE, J. What is metabolomics all about? **BioTechniques**, v. 46, n. 5, p. 363–365, abr. 2009.

ROLF, M. M. et al. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Animal Genetics**, v. 43, n. 4, p. 367–374, ago. 2012.

SANDRA, K. et al. Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4087–4099, jun. 2010.

SANGSTER, T. et al. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabonomic analysis. **The Analyst**, v. 131, n. 10, p. 1075, 2006.

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**, v. 167, p. 80–85, set. 2014.

SANTANA, M. H. A. et al. Short Communication Genome-wide association with residual body weight gain in Bos indicus cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 5229–5233, 2015.

SCHÖNFELD, P.; REISER, G. Rotenone-like Action of the Branched-chain Phytanic Acid Induces Oxidative Stress in Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 7136–7142, 17 mar. 2006.

SCHULMAN, I. G. Liver X Receptors Link Lipid Metabolism and Inflammation. **FEBS Letters**, 27 maio 2017.

SHABAT, S. K. BEN et al. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. **The ISME Journal**, v. 10, n. 12, p. 2958–2972, 6 dez. 2016.

SHAYMAN, J. A. Adding Lyso-Lipids to Arachidonate Metabolism Sets the Stage for New Biology. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 10, p. 1175–1176, out. 2016.

SHERMAN, E. L. et al. Identification of polymorphisms influencing feed intake and efficiency in beef cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 3, p. 225–231, jun. 2008.

SHI, D. et al. The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells. **Molecular Cancer**, v. 8, n. 1, p. 32, 2009.

SILVEIRA, A. C. Produção de bovino superprecoce no Brasil. In: **Bovinocultura de corte v.2**. Piracicaba: FEALQ, 2010.

SMITH, C. A. et al. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 779–787, fev. 2006.

SMITH, C. A. **LC/MS Preprocessing and Analysis with xcms**, 2017. Disponível em: <<https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/xcms/inst/doc/xcmsPreprocess.pdf>>

SPAGOU, K. et al. Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 6–7, p. 716–727, mar. 2010.

STANDING COMMITTEE ON AGRICULTURE. **Ruminants**. East Melbourne, Australia: CSIRO Publications, 2000.

TANUMIHARDJO, S. A. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 2, p. 658S–665S, 1 ago. 2011.

- THEODORIDIS, G.; GIKA, H. G.; WILSON, I. D. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. **Mass Spectrometry Reviews**, p. n/a-n/a, 2011.
- THORNTON, P. K. Livestock production: recent trends, future prospects. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2853–2867, 27 set. 2010.
- TRETTET, L.; ADAM-VIZI, V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2335–2345, 29 dez. 2005.
- USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- VAN DER WERF, J. It is useful to define residual feed intake as a trait in animal breeding programs? **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 405–410, 2004.
- VINCENT, A. et al. Divergent selection for residual feed intake affects the transcriptomic and proteomic profiles of pig skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 6, p. 2745, 2015.
- VIROONUDOMPHOL, D. et al. The relationships between anthropometric measurements, serum vitamin A and E concentrations and lipid profiles in overweight and obese subjects. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 12, n. 1, p. 73–9, 2003.
- VOS, M. et al. Vitamin K2 Is a Mitochondrial Electron Carrier That Rescues Pink1 Deficiency. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1306–1310, 8 jun. 2012.
- VOY, B. H. Systems Genetics: a Powerful Approach for Gene-Environment Interactions. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 3, p. 515–519, 1 mar. 2011.
- WANDERS, R. J. A.; KOMEN, J.; FERDINANDUSSE, S. Phytanic acid metabolism in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 9, p. 498–507, set. 2011.
- WANG, J. et al. Global Metabolomic and Network analysis of Escherichia coli Responses to Exogenous Biofuels. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 11, p. 5302–5312, nov. 2013.
- WANT, E. J. et al. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. **Nature protocols**, v. 5, n. 6, p. 1005–1018, 2010.
- WEBSTER, A. J. F. et al. The influence of food intake on portal blood flow and heat production in the digestive tract of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 125–139, 9 jul. 1975.
- WERNER, E. et al. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 143–163, ago. 2008.
- WHITE, E. et al. Correlates of serum alpha- and gamma-tocopherol in the Women's Health Initiative. **Annals of epidemiology**, v. 11, n. 2, p. 136–44, fev. 2001.
- WIDMANN, P. et al. A systems biology approach using metabolomic data reveals genes and pathways interacting to modulate divergent growth in cattle. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 798, 2013.
- WIDMANN, P. et al. Systems Biology Analysis Merging Phenotype, Metabolomic and Genomic Data Identifies Non-SMC Condensin I Complex, Subunit G (NCAPG) and Cellular Maintenance Processes as Major Contributors to Genetic Variability in Bovine Feed Efficiency. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0124574, 15 abr. 2015.
- WILSON, I. D. et al. High Resolution “Ultra Performance” Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic

Studies. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 2, p. 591–598, abr. 2005.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 1 nov. 2012.

WU, D.; MEYDANI, S. Age-Associated Changes in Immune Function: Impact of Vitamin E Intervention and the Underlying Mechanisms. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 14, n. 4, p. 283–289, 12 nov. 2014.

WU, Q. et al. UPLC-Q-TOF/MS based metabolomic profiling of serum and urine of hyperlipidemic rats induced by high fat diet. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 6, p. 360–367, dez. 2014.

WU, W.; MASSART, D. L.; DE JONG, S. The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: Theory and algorithms. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 36, n. 2, p. 165–172, abr. 1997.

WU, X.; CHENG, J.; WANG, X. Dietary Antioxidants: Potential Anticancer Agents. **Nutrition and Cancer**, p. 1–13, 31 mar. 2017.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251–W257, 1 jul. 2015.

XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, v. 6, n. 6, p. 743–760, 5 maio 2011.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. In: **Current Protocols in Bioinformatics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 14.10.1–14.10.91.

XU, X. et al. Autophagy is essential for effector CD8⁺ T cell survival and memory formation. **Nature Immunology**, v. 15, n. 12, p. 1152–1161, 2 nov. 2014.

ZELENA, E. et al. Development of a Robust and Repeatable UPLC–MS Method for the Long-Term Metabolomic Study of Human Serum. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 1357–1364, 15 fev. 2009.

ZHANG, A. et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **The Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293–300, 2012.