

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/08/2023

At the author's request, the full text of this thesis / dissertation will not be available online until August 27, 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

PROTEÔMICA DE TECIDO RUMINAL E CECAL DE BOVINOS NELORE
CONFINADOS COM DIFERENTES ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS

LEONE CAMPOS ROCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor em Zootecnia

BOTUCATU - SP
Agosto – 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

PROTEÔMICA DE TECIDO RUMINAL E CECAL DE BOVINOS NELORE
CONFINADOS COM DIFERENTES ESTRATÉGIAS NUTRICIONAIS

LEONE CAMPOS ROCHA
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha
Coorientadores: Prof. Dr. Danilo Domingues Millen
Dr. José Cavalcante Souza Vieira

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor em Zootecnia

BOTUCATU - SP
Agosto - 2021

R672p

Rocha, Leone Campos

Proteômica de tecido ruminal e cecal de bovinos nelore confinados com diferentes estratégias nutricionais / Leone Campos Rocha. -- Botucatu, 2021

105 p. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: Danilo Domingues Millen

1. 2D-PAGE. 2. Aditivos. 3. Amido. 4. Espectrometria de massas. 5. Proteômica. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Leone Campos Rocha, nascido em 04 de abril de 1994, na cidade de Macarani/BA, filho de José Rocha Filho e Joana Maria Campos Rocha, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Campus de Itapetinga em 14 de fevereiro de 2011 e graduou-se em 31 de outubro de 2015. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica no período de 3 anos (2012-2013, 2013-2014 e 2014-2015) financiado por bolsa da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq). Trabalhou como Zootecnista Trainee na Agropecuária Jacarezinho S/A (Jan-abril de 2016), atuando no gerenciamento de confinamento, nutrição e manejo de bovinos confinados e a pasto. Iniciou o curso de Mestrado em 04 de abril de 2016 pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – PPZ junto à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia com ênfase em Nutrição de Ruminantes e Forragicultura e Pastagens, sendo concluído em 26 de fevereiro de 2018. Iniciou o curso de Doutorado em Zootecnia em 01 de março de 2018 na Unesp - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu, onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e atuou nas áreas de nutrição de bovinos confinados e análise proteômica aplicada à nutrição e metabolismo animal.

Dedicatória

Dedico esta conquista à minha família, meus pais José Rocha Filho, Joana Maria Campos Rocha e meu irmão Lázaro Campos Rocha. Em todos os momentos vocês estiveram comigo, sempre foi e será por vocês. A minha vó Jesuína Ferreira (in memoriam) e meu tio Atevaldo Rocha (in memoriam), vocês me formaram e sempre serão referências de humildade e amor.

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha por acreditar em meu trabalho, me orientar em um momento difícil, além de ser um exemplo de bondade e profissionalismo. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Danilo Domingues Millen, pela orientação e disponibilidade de sempre. Sou grato por confiar e ceder condições para eu pudesse realizar esse trabalho. Muito obrigado!

Ao Dr. José Cavalcante Souza Vieira, exemplo de pessoa e profissional. Sempre disposto a ajudar. Obrigado pela orientação e todo suporte que sempre prestou.

Muito obrigado!

Agradecimentos

À Deus, pelo amor incondicional. No fim, todos seus planos são perfeitos e incontestáveis.

Aos meus pais, José Rocha Filho e Joana Maria Campos, muitas vezes abdicaram de algo em prol dos meus sonhos. Meu eterno carinho, amor e agradecimento. Amo vocês!

Ao meu irmão Lázaro Campos Rocha, por todo apoio e irmandade de sempre.

A Tatiane Souza Santos, minha companheira, por me apoiar e dividir momentos comigo. Meu carinho e amor.

Aos meus companheiros baianos, Bismarck Moreira Santiago e Abias Santos Silva, que aceitaram o desafio de mudar de estado para construirmos esse sonho, além dos bons momentos que dividimos.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Câmpus Botucatu, onde pude realizar meus estudos e crescer como profissional e pessoa.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À DSM nutritional products, por viabilizar e financiar a experimentação animal. E aos colaboradores Alexandre Perdigão e Victor Valério pela execução do experimento.

Ao Departamento de Química e Bioquímica – IB, por conceder a estrutura e equipamentos para realização das análises laboratoriais.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, em especial a Cláudia Cristina Moreci, e aos coordenadores, Prof. Dr. José Roberto Sartori e Profª. Dra. Margarida Maria Barros.

Aos professores que contribuíram e participaram para minha formação pessoal e profissional, em especial, Prof. Dr. Ricardo Orsi, Prof. Dr. Edivaldo Pezzato, Prof. Dr. Mário de Beni Arrigone, Prof. Dr. Otávio Machado Neto e Prof. Dr. André Mendes Jorge.

À Dra. Camila Pereira Braga, pela ajuda e contribuição durante a redação da tese.

À equipe do Laboratório de Bioanálítica e Metaloproteômica – LBM, José Cavalcante Souza Vieira, Grasieli de Oliveira, Andrey Sávio de Almeida Assunção, Renata Aparecida Martins, Wellington Luiz de Paula Araújo, Izabela da Cunha Bataglioli, Otávio Augusto de Freitas Apostólico e Maria Gabriela de Albuquerque Santiago.

Ao Núcleo de Estudos e Extensão em Bovinocultura de Corte e Leite (NERU e NEEL) da UNESP-Dracena, por toda ajuda durante o abate e coleta. Muito obrigado Ana Carolina Janssen Pinto, Antônio Marcos Silvestre, Thaiano Iranildo de Sousa Silva, Maria Bethânia Niehues, Leandro Aparecido Ferreira da Silva, Breno Leite Demartini, Kátia Lirian Rocha Souza, Jéssica Gomes Cardin, Werner Frederico Scheleifer, Vanessa Gomes Leonel Gasparini.

Aos amigos que fiz na UNESP, Fernanda Kaiser, Tânia de Paula Vieira, Beatriz Ribas, Felipe de Barros, Mateus Ferreira, Anderson Kloster, João Paulo Lourenço, Osvaldo Sousa, Isabela Marconato, Marconi Ítalo, Evelyn Prestes, Yasmin Calaça, Lucas Lopes, Jéssica Cruviel, Camila Sabino, Richard Vaquero, Laís Thomaz e Lais Cordeiro.

Aos funcionários da Unesp de Botucatu, pela manutenção e suporte para realização das atividades, em especial, Gabriela Cristina G.V. Athanazio, Renato Agostinho Arruda.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADO!

Epígrafe

“Eis que estarei com vocês todos os dias, até o fim do mundo.”

(Mt 28, 20)

RESUMO GERAL

A literatura apresenta poucos estudos que investigaram o proteoma de ceco e rúmen de bovinos submetidos a estratégias alimentares com uso de aditivos. Essa proposta é pioneira na identificação, expressão e compreensão do perfil proteico ruminal e cecal de bovinos nelore confinados. **Artigo 1:** Objetivou-se avaliar a expressão proteica, a fim identificar possíveis moléculas candidatas a biomarcadores e suas relações com funções metabólicas e nutricionais aplicados a animais confinados com diferentes níveis de amido (25, 35 e 45%) e aditivos (Monensina × blend de óleos essenciais + amilase exógena), as dosagens de monensina sódica, blend de óleos essenciais e amilase exógena foram 26, 90 e 560 mg/kg MS, respectivamente. Foram utilizados machos Nelore (n = 210) (*Bos taurus indicus*), não castrados (Peso Inicial = $\pm$ 380 kg). Após o abate foram coletadas amostras de ceco e acondicionadas imediatamente em nitrogênio líquido. Foi feito um *pool* de amostras utilizando 90 animais (15 animais/tratamento) no processo de precipitação do pellet proteico. A separação e caracterização do proteoma das amostras biológicas foram feitas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e identificadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Os géis de poliacrilamida foram analisados utilizando ImageMaster 2D Platinum 7.0 para verificar as diferenças na expressão de proteínas, para as comparações do % volume normalizado dos *spots*. Após a identificação das proteínas foram analisadas as vias metabólicas usando a função da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG), análise de enriquecimento da via Reactome para mapear as expressões das proteínas que codificam enzimas e suas respectivas funções nas vias afetadas. O uso de *Blend* de Óleo essenciais associado com α -Amilase como aditivo alimentar promoveu maior expressão de enzimas na via da glicólise e gliconeogênese e ausência de proteína ligada a inflamação (Leukocyte elastase inhibitor). Por outro lado, o incremento de amido nas dietas promoveu redução de enzimas ligadas a degradação de carboidrato com aumento de respostas atribuídas à injúrias inflamatórias no rúmen de bovinos Nelore confinados. **Artigo 2:** Objetivou-se mapear o proteoma do epitélio ruminal de bovinos nelore confinados (n=60) com diferentes níveis de amido (Baixo: 25 e Alto: 45%) e aditivos (Monensina × blend de óleos essenciais + amilase exógena). As separações e fracionamento das proteínas foram através da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), e posteriormente a identificação por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS/MS). Após a identificação das proteínas foram utilizados os acessos das proteínas para a classificação em suas funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares utilizando Blast2GO, posteriormente a análise de enriquecimento via String para mapear as

redes e interação entre proteínas caracterizadas suas respectivas funções no metabolismo de glicose e ácidos graxos. Dietas contendo blend de óleos essenciais associados à amilase exógena promoveram maior expressão de macromoléculas que participam da degradação de carboidratos pela via glicolítica e cetogênica. Foram identificadas 14 proteínas com maior expressão e presentes no tecido epitelial do rúmen envolvidas na oxidação da glicose, a proteína hidroximetilglutaril-CoA liase que catalisa parte do metabolismo metabólico intermediário, uma etapa fundamental na cetogênese. Nossos resultados sugerem que houve aumento da glicólise a partir da oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, que participa da primeira etapa da produção de acetato e butirato e da descarboxilação oxidativa no epitélio ruminal de bovinos nelore confinados. A monensina melhora os precursores de propionato, a maior expressão de metilmalonil-CoA mutase sugere síntese de propionato via propionil-CoA que participa do ciclo do ácido cítrico através do succinil-CoA, que pode aumentar a energia metabolizável e reduzir a ingestão de alimentos.

Palavras-chave: 2D-PAGE, amido, aditivos, espectrometria de massas, proteômica

ABSTRACT

Few studies have investigated the proteome of cecum and rumen of cattle feeding different strategies with the use of additives. This proposal is a pioneer in the identification, expression and understanding of the ruminal and cecal protein profile of feedlot Nellore cattle. **Manuscript 1:** The objective was to evaluate protein expression in order to identify possible candidate molecules for biomarkers and their relationships with metabolic and nutritional functions applied to animals fed with different levels of starch (25, 35 and 45%) and additives (Monensin × blend of essential oils + exogenous amylase), the dosages of sodium monensin, blend of essential oils and exogenous amylase were 26, 90 and 560 mg/kg DM, respectively. Nellore bulls (n = 210) (*Bos taurus indicus*) (initial weight = ± 380 kg) were used. After slaughter, cecum samples were collected and immediately placed in liquid nitrogen. Samples were pooled using 90 animals (15 animals/treatment) in the protein pellet precipitation process. The separation and characterization of the proteome of biological samples were performed by two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). Polyacrylamide gels were analyzed using ImageMaster 2D Platinum 7.0 to verify differences in protein expression for the % volume normalized spot comparisons. After identifying the proteins, the metabolic pathways were analyzed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) function, enrichment analysis of the Reactome pathway to map the expressions of proteins encoding enzymes and their respective functions in the affected pathways. The use of blend essential oil associated with α -Amylase as a feeddd additive promoted greater expression of enzymes in the glycolysis and gluconeogenesis pathway and absence of protein linked to inflammation (Leukocyte elastase inhibitor). On the other hand, the increase in starch in the diets reduced enzymes linked to carbohydrate degradation with increased responses attributed to inflammatory injuries in the rumen of feedlot Nellore cattle. **Manuscript 2:** The objective was to map the proteome of the ruminal epithelium of feedlot Nellore cattle (n=60) with different levels of starch (Low: 25 and High: 45%) and additives (Monensin × blend of essential oils + exogenous amylase) the dosages of sodium monensin, blend of essential oils and exogenous amylase were 26, 90 and 560 mg/kg DM, respectively. Protein separations were performed using two-dimensional polyacrylamide gel electrophores (2D-PAGE), followed by identification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). After protein identification, protein accessions were used to classify their molecular functions, biological processes and cellular component using Blast2GO, then enrichment analysis pathways String to map the networks and interaction

between proteins characterized and their respective functions in glucose and fatty acids metabolic. Diets containing blend of essential oils associated with exogenous amylase promoted greater expression of macromolecules that participate in carbohydrate degradation via glycolytic and ketogenic pathways. We identified 14 proteins with greater expression and present in the epithelial tissue of the rumen involved in glucose oxidation, the protein hydroxymethylglutaryl-CoA lyase that catalyzes part of intermediary metabolic metabolism, a fundamental step in ketogenesis. Our results suggest that there was an increase in glycolysis from the oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate, which participates in the first stage of acetate and butyrate production and oxidative decarboxylation in the ruminal epithelium of feedlot Nellore cattle. Monensin improves propionate precursors, the increased expression of methylmalonyl-CoA mutase suggests propionate synthesis via propionyl-CoA that participates in the citric acid cycle through succinyl-CoA, which can increase metabolizable energy and reduce feed intake.

Keywords: 2D-PAGE, additives, starch, mass spectrometry, proteomic

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Representação esquemática da síntese proteica. Adaptado: [www.pixabay.com.br/Google Imagens](http://www.pixabay.com.br/Google%20Imagens)..... 23
- Figura 2.** Fração dos carboidratos para ruminantes (Adaptado de Hall (2003) e NASCEM (2016)..... 26

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Affected pathways generated from KEGG ID input show that metabolism of carbohydrates, glycolysis, gluconeogenesis and immune system is impacted 50
- Figure 2.** Expression protein profile encoding enzymes in glycolysis and gluconeogenesis pathway. KEGG key: EC 4.1.2.13: Fructose-bisphosphate aldolase (ALDOB); EC 5.3.1.1: Triosephosphate isomerase (TPI); EC 1.2.1.12: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); EC 5.4.2.4: Phosphoglycerate mutase (PGAM); Alpha-enolase (ENO1); EC 4.2.1.11 Beta-enolase (ENO3); EC 2.7.1.40 Pyruvate Kinase (PKM); EC 1.1.1.27 L-lactate dehydrogenase (LDH) 51
- Figure 3.** Heatmap of the differentially expressed proteins (ANOVA, $P \leq 0.05$) among the diets contending different starch levels and additives. Color-coded matrix showed the correlation coefficient of the spots expression values. Each row and column represent one group and protein, respective..... 52
- Graphic Abstract 1** 64
- Supplemental Figure 1.** Polyacrylamide gel electrophoresis images 65
- Supplemental Figure 2.** Classification of the proteins sequences found in beef cattle cecum proteome using OMICSBOX software analysis (Blast2GO). 66

CAPÍTULO 3

- Figure 1.** Polyacrylamide gel electrophoresis images of ruminal epithelium protein profile . 74
- Figure 2.** Proteins found in the ruminal epithelium were classified by molecular functions, cell component and biological process using Blast2GO. 77
- Supplemental Figure 1.** Protein-protein interaction of differentially proteins expressed involved glucose and energy metabolism of rumen protein profile. Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (ACADM), Citrate synthase (CS), Eukaryotic translation initiation factor (EIF6), Alpha-enolase (ENO1), Beta-enolase (ENO3), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDHS), Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial (HMGOL), Isocitrate dehydrogenase (IDH1), L actate dehydrogenase A

(LDHA), lactate dehydrogenase B (LDHB), Malate dehydrogenase (MDH2), Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), 6-phosphogluconolactonase; (PGLS), D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH), triosephosphate isomerase (TPI1), UDP-glucose 6-dehydrogenase (UGDH).92

Supplemental Figure 2. Protein-protein interaction of differentially proteins expressed involved fatty acids metabolism of rumen protein profile. Methylmalonyl-CoA mutase (MUT), Electron transfer flavoprotein subunit alpha (ETFA), Acetyl-CoA acetyltransferase (ACAT1), Alcohol dehydrogenase (ADH5), Isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD), V-type proton ATPase subunit B, (ATP6VB1), Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase (ACADS), 3-ketoacyl-CoA thiolase (ACAA2), Enoyl-CoA hydratase (ECHS1), Fatty acid-binding protein, (FABP3), Fatty acid-binding protein (FABP4).93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Experimental diets containing increasing starch levels (25, 35, and 45%) and additives (Monensin, Blend of essential oil + exogenous α -Amylase) in diets for Nellore cattle feedlot	42
Table 2. Differentially expressed spots in Nellore beef cattle cecum fed with diets containing increasing starch levels (25, 35, and 45%) and additives (Monensin, Blend of essential oil + exogenous α -Amylase)	48
Table 3. Protein profile differentially expressed in Nellore cattle cecum fed with diets containing increasing starch levels (25, 35, and 45%) and additives (Monensin, Blend of essential oil + exogenous α -Amylase) using LC-MS/MS	48
Supplemental Table 1. Values of Reactome Statistical analysis.	63
Table 4. Expression values (test t, $P \leq 0.05$) in Nellore cattle cecum protein profile fed starch levels (25, 35 and 45%) and additives (Monensin and Blend Essential Oil + α -Amylase).	53

CAPÍTULO 3

Table 1. Experimental diets containing increasing starch levels (25 and 45%) and additives (Monensin, Blend of essential oil + exogenous α -Amylase) in diets for Nellore cattle feedlot	71
Table 2. Proteins identified by LC/ MS-MS in Nellore Bulls rumen papillae fed with different starch level and additives.	78
Table 3. Expression values (test t, $P \leq 0.05$) in protein profile of Nellore Bulls epithelium rumen fed starch levels (Low=25 % and High= 45%) and additives (Monensin and Blend Essential Oil + α -Amylase).....	80
Table 4. Biological Process related to differentially expressed protein in beef cattle rumen epithelium	82
Supplemental Table 1. Proteins sequences identified by LC-MS/MS in rumen epithelium	

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
3-PGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
6PGL	6-phosphogluconolactonase
ADP	Adenosina difosfato
ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase
Alpha-ETF	Electron transfer flavoprotein subunit alpha
AGV	Ácido graxos voláteis
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BEO	Blend Essential Oil
Ca	Cálcio
CAC	Citric Acid Cycle
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Crude Protein
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DM	Dry Matter
DMI	Dry Matter Intake
DTT	1,4-dithiothreitol
ENO1	Alpha-enolase
ENO3	Beta-enolase
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
IEF	Focalização isoeletrica
IMS	Ingestão de Matéria Seca
IVD	Isovaleryl-CoA dehydrogenase
FDN	Fibra em Detergente Neutro
GA3P	Glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P)
GAPD4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GO	Gene Ontology
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KDa	Quilodalton
LC – MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
LDH-A	L-lactate dehydrogenase A chain
LRNS	Large Ruminant Nutritional System
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MM	Massa Molecular
MON	Monensin
MS	Matéria Seca
NaOH	Cloreto de Sódio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido
NASCEM	National Academies of Sciences, Engineering and Medicine
NE	Net Energy
NDF	Neutral Detergent Fiber
NRBC	Nutrient Requirements of Beef Cattle
P	Phosphorus
PBS	Phosphate Buffered Saline

peNDF	Physically Effective Neutral Detergent Fiber
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKM	Pyruvate Kinase
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
SDS-PAGE	Second Dimension of the Electrophoretic Process
TIM	Triosephosphate isomerase
TPI	Triosephosphate isomerase
VFA	Volatile Fatty Acid
XR	L-xylulose reductase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	20
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	21
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.1 Proteômica	22
1.2 2D-PAGE	23
1.3 Espectrometria de massas (MS)	24
1.4 Bioinformática e análise de dados proteômicos	25
1.5 Digestão e absorção de carboidratos	25
1.6 Aditivos alimentares	28
1.6.1 Monensina	28
1.6.2 Blend de Óleos Essenciais e α -Amilase	29
1.7 Utilização de amido em bovinos de corte	29
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	30
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 2	37
1. Introduction	38
2. Material and Methods	40
2.1 Animals, facilities, feeding and animal care	41
2.2 Experimental design	43
2.3 Sample Collection and preparation	43
2.4 Extraction, precipitation and quantification of proteins	44
2.5 Electrophoretic separations of protein fractions using 2D-PAGE	44
2.6 Protein identification by mass spectrometry (LC- MS/ MS)	46
2.7 Statistical analysis	46
2.8 Pathways enrichment analysis	47
3. Results	47
3.1 Image analysis and protein expression	47
3.2 Proteins characterization by LC-MS/MS	48
3.3 Pathways enrichment and Reactome analysis	50
4. Discussion	52
4.1 Effects of feed additives and starch level on glucose and energy metabolism	52
4.2 Inflammatory response	55
5. Conclusions	56

<i>Declaration of Competing Interest</i>	56
<i>Authors declare that have no conflict of interest.</i>	56
<i>Acknowledgments</i>	56
<i>References</i>	57
<i>Supplemental Material</i>	63
CAPÍTULO 3	67
1. <i>Introduction</i>	69
2. <i>Material and Methods</i>	70
2.1 <i>Animals, facilities, treatments and collection</i>	70
2.2 <i>Extraction, precipitation and quantification of proteins</i>	72
2.3 <i>Electrophoresis separation of proteins fraction</i>	72
2.4 <i>Image analysis</i>	73
2.5 <i>Protein identification by mass spectrometry (LC- MS/ MS)</i>	74
2.6 <i>Statistical analysis</i>	75
2.7 <i>String and network analysis</i>	76
3. <i>Results</i>	76
4. <i>Discussion</i>	83
4.1 <i>Upregulation and proteins expressed in the cattle epithelium fed essential oil</i>	83
4.2 <i>Upregulation and proteins expressed in the cattle epithelium fed monensin</i>	84
5. <i>Conclusion</i>	86
<i>Declaration of Competing Interest</i>	86
<i>Authors declare that have no conflict of interest.</i>	86
<i>Acknowledgments</i>	86
<i>References</i>	86
<i>Supplemental Material</i>	94
CAPÍTULO 4	104
IMPLICAÇÕES	105

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As atualidades e perspectivas da cadeia produtiva da carne nacional têm expressado enorme potencial econômico. O Brasil é determinante na produção de carne mundial, em 2021 as exportações totais do Brasil devem aumentar em 5% quando comparado ao ano anterior, sendo o décimo ano consecutivo de alta, o que expressa competitividade e relevância no mercado global (USDA, 2021) Nota-se que em 10 anos, o crescimento ponderal foi de 39% na série histórica das exportações (ABIEC, 2021). Em contrapartida ao crescimento da demanda, temos a necessidade de aperfeiçoamento do sistema de produção, logo, o uso de estratégias que busquem o encurtamento do período necessário para abate é eficaz em um mercado promissor como descrito.

A manipulação das dietas tem movido produtores e nutricionistas para busca de ferramentas que maximizem, encurtem o ciclo e tragam eficiência à cadeia produtiva. Preconiza-se então, abate de animais jovens, os quais são submetidos a dietas com alto concentrado. Ao passo que a nutrição caminha em busca de maximização de respostas produtivas, o limite fisiológico é testado, distúrbios metabólicos e limitações fisiológicas surgem como principais impedimentos aos altos níveis de amido em dietas para bovinos de corte.

Estratégias alimentares são adotadas para aumentar o metabolismo energético, principalmente em ruminantes com alta demanda energética, que confere maior sensibilidade a desordens metabólicas pelo excesso de fermentação de carboidratos. Majoritariamente, suprimento de energia dos ruminantes é obtido pela gliconeogênese hepática através de derivados da fermentação ruminal (propionato) e aminoácidos, porém há questionamentos quanto ao entendimento do aproveitamento a nível de intestino. O maior aporte de carboidratos altamente fermentescíveis é caracterizado por desordens digestivas em função do acúmulo de ácidos orgânicos, provocado pela assimetria entre a capacidade de absorção via lúmen ruminal e taxa de síntese microbiana (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2010; NASCEM, 2016). Posteriormente, no intestino há limitações fisiológicas que devem ser ressaltadas principalmente em dietas com maiores níveis de amido, que aumenta o fluxo de glicose na forma de amido para sofrer digestão intestinal. Assim, falta clareza quanto à capacidade de digestão de enzimas pancreáticas, disponibilidade de transportadores lúmen-sistema aporta e possíveis alterações nos tecidos trazidos pelo aumento de carboidratos nas dietas.

Assim, a partir de estudos proteômicos é possível verificar a expressão de centenas de proteínas através do mapeamento do proteoma correspondente ao fenótipo do organismo analisado, em que esse fenótipo pode ser em função de diferentes estratégias alimentares ao

qual os animais foram submetidos. Em estudo constatado por Looor et al. (2015) observaram notável tendência no uso de ferramentas proteômicas integradas a biologia de sistemas, nutrição, fisiologia e metabolismo animal com o objetivo de elucidar como proteínas podem regular vias metabólicas, e como a síntese e degradação dessas macromoléculas afetam fenótipos complexos (nutrientes e/ou fatores dietéticos). Ao aprimorar mecanismos complexos por meio da proteômica, com possibilidade de identificar biomarcadores vinculados ao estado nutricional e doenças digestivas que a posteriori podem ser prevenidas e/ou evitadas, aumentando a eficiência de sistemas produtivos.

No estudo proposto por Campos et al. (2020) utilizaram a proteômica pela técnica 2D-PAGE (Gel de poliacrilamida) para caracterizar o perfil proteico de animais suplementados com vitamina A e os possíveis efeitos na supressão da deposição de gordura intramuscular. Assim nesse estudo foi possível identificar a expressão de proteínas do grupo HSP70 para os animais que não receberam a suplementação de vit. A, corroborando com a hipótese que o uso de vitaminas prejudica a expressão dessas proteínas que estão associadas ao metabolismo energético e melhora a captação de glicose pelo tecido para uso do carbono na síntese de gordura intramuscular. Foi identificada a proteína GAPDH para o grupo suplementado, essa é uma enzima glicolítica que demonstra que houve glicólise ao invés de metabolismo oxidativo e assim menor teor de gordura intramuscular.

Ferramentas bioquímicas tal como a proteômica são potencialmente aplicáveis à ciência animal, com o intuito de compreender processos biológicos, identificar perfil proteico e suas respectivas funções, permitem maior assertividade e inferência na nutrição e metabolismo animal. Assim, objetiva-se nessa proposta caracterizar proteínas do ceco e rúmen de bovinos nelore confinados submetidos a modificações dietéticas e possíveis vias metabólicas afetadas

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Proteômica

Os organismos desempenham diversas atividades celulares continuamente, dado ao estímulo exógeno aplicado ao indivíduo. Logo, conhecer a expressão de um determinado proteoma permite considerar proteínas sub ou superexpressas e assim, inferir suas funções nos processos celulares e possíveis respostas ao ambiente (FRANÇOIS, 2010).

Estudos proteômicos permitem a identificação e caracterização do perfil proteico (quali e quantitativamente) e possíveis mudanças pós traducionais, sendo possível compreender como mecanismos moleculares alteram fenótipos complexos. A síntese proteica confere ampla possibilidade de proteínas sintetizadas por um mesmo genoma, logo, há complexidade na

- Allen MS, Bradford BJ, Oba M. 2009. Board Invited Review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J Anim Sci.* 87, 3317-34. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1779>
- Ash, R., & Baird, G. D. (1973). Activation of volatile fatty acids in bovine liver and rumen epithelium. Evidence for control by autoregulation. *Biochemical Journal*, 136, 311-319. <https://doi.org/10.1042/bj1360311>
- Baldwin, R. (1998). Use of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen metabolism. *The Journal of nutrition*, 128, 293S-296S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.293S>
- Benchaaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145, 209-228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Braga, C.P., Bittarello, A.C., Padilha, C.C.F., Leite, A.L., Moraes, P.M., Buzalaf, M.A.R., Zara, L.F., Padilha, P.M., 2015. Mercury fractionation in dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) of the Madeira River in Brazil using metalloproteomic strategies. *Talanta* 132, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.021>
- Cardozo, P. W., Calsamiglia S., Ferret, A., Kamel, C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J Anim Sc*, 83, 2572–2579. <https://doi.org/10.2527/2005.83112572x>
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.

Bioinformatics 21, 3674–6. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>

Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J., Peters, T., Schaffer, R., 1981. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. Clin. Chem. 27, 1642–50. PMID: 6169466

Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>

Drong, C., Meyer, U., Von Soosten, D., Frahm, J., Rehage, J., Breves, G., & Dänicke, S. (2016). Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. J. Anim. Physiol. Anim. Nutrit, 100, 537–551. <https://doi.org/10.1111/jpn.12401>

Fox, D., Tedeschi, L., Tylutki, T., Russell, J., Van Amburgh, M., Chase, L., Pell, A., Overton, T., 2004. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. Anim. Feed Sci. Technol. 112, 29–78. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.10.006>

Garcia, F., Colombatto, D., Brunetti, M. A., Martínez, M. J., Moreno, M. V., Scorcione Turcato, M., Martínez Ferrer, J. (2020). The reduction of methane production in the in vitro ruminal fermentation of different substrates is linked with the chemical composition of the essential oil. Animals, 10, 786. <https://doi.org/10.3390/ani10050786>

Hassan, F., Arshad, M.A., Ebeid, H.M., Rehman, M.S., Khan, M.S., Shahid, S., Yang, C., 2020. Phytogetic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet–microbe interaction. Frontiers in Veterinary Science 7, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575801>

- Joch, M., Kudrna, V., Hakl, J., Božík, M., Homolka, P., Illek, J., Výborná, A. (2019). In vitro and in vivo potential of a blend of essential oil compounds to improve rumen fermentation and performance of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol*, 251, 176-186. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.03.009>
- Li, F., Hitch, T. C., Chen, Y., & Creevey, C. J. (2019). Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. *Microbiome*, 7, 1-21. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0618-5>
- Manns, J. G., Boda, J. M., & Willes, R. F. (1967). Probable role of propionate and butyrate in control of insulin secretion in sheep. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 212, 756-764. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.4.756>
- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A., Newbold, C.J., 2003. Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5011–5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>
- Meschiatti, M.A.P., Gouvêa, V.N., Pellarin, L.A., Batalha, C.D.A., Biehl, M. V, Acedo, T.S., Dórea, J.R.R., Tamassia, L.F.M., Owens, F.N., Santos, F.A.P., 2019. Feeding the combination of essential oils and exogenous α -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle¹. *J. Anim. Sci.* 97, 456–471. <https://doi.org/10.1093/jas/sky415>
- Mirzaei-Alamouti, H., Moradi, S., Shahalizadeh, Z., Razavian, M., Amanlou, H., Harkinezhad, T., ... & Aschenbach, J. R. (2016). Both monensin and plant extract alter ruminal fermentation in sheep but only monensin affects the expression of genes involved in acid-

base transport of the ruminal epithelium. *Anim. Feed Sci. Technol*, 219, 132-143.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.06.009>

Moraes, P.M., Santos, F.A., Padilha, C.C.F., Vieira, J.C.S., Zara, L.F., De M. Padilha, P., 2012.

A preliminary and qualitative metallomics study of mercury in the muscle of fish from amazonas, Brazil. *Biol. Trace Elem. Res.* 150, 195–199. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9502-x>

National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, NASCEM, 2016. Nutrient Requirements of Beef Cattle, 8th Revised Edition, 8th ed. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/19014>

Neves, R.C.F., Lima, P.M., Baldassini, W.A., Santos, F.A., Moraes, P.M., Castro, G.R., Padilha, P.M., 2012. Fracionamento de cobre em proteínas do plasma, músculo e fígado de tilápia do Nilo. *Quim. Nova* 35, 493–498. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000300010>

Ogunade I, Schweickart H, Andries K, Lay J, Adeyemi J. Monensin Alters the Functional and Metabolomic Profile of Rumen Microbiota in Beef Cattle. *Animals*. 11, 211. <https://doi.org/10.3390/ani8110211>

Penner, G. B.; Steele, M. A.; Aschenbach, J R.; McBride, B. W. 2011. Ruminant nutrition symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *J. Ani. Sci.*, 89, 108–1119. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2010-3378>

Santos, F.A., Lima, P.M., Neves, R.C.F., Moraes, P.M., Pérez, C.A., Silva, M.O.A., Arruda, M.A.Z., Castro, G.R., Padilha, P. de M., 2011. Metallomic study on plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D PAGE: Initial results. *Microchim. Acta* 173, 43–49. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0522-y>

- Schären, M., Drong, C., Kiri, K., Riede, S., Gardener, M., Meyer, U., Dänicke, S., 2017. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100, 2765–2783. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11994>
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., Mann, M., 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- Silva, F.A., Cavecci, B., Baldassini, W.A., Lima, P.M., Moraes, P.M., Roldan, P.S., Padilha, C.C.F., Padilha, P.M., 2013. Selenium fractionation from plasma, muscle and liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Food Meas. Charact.* 7, 158–165. <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9151-6>
- Torres, R. N. S., Paschoaloto, J. R., Ezequiel, J. M. B., da Silva, D. A. V., & Almeida, M. T. C. 2021. Meta-analysis of the effects of essential oil as an alternative to monensin in diets for beef cattle. *The Veterinary Journal.* 272, 105659. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105659>
- Toseti, L.B., Goulart, R.S., Gouvêa, V.N., Acedo, T.S., Vasconcellos, G.S.F.M., Pires, A. V., Leme, P.R., Saran, A., Silva, S.L., 2020. Effects of a blend of essential oils and exogenous α -amylase in diets containing different roughage sources for finishing beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 269, 114643. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114643>
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4606–4610. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4606-4610.1999>
- Ungerfeld, E. M. (2020). Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and

IMPLICAÇÕES

Com a necessidade de dietas com alta densidade energética, progressivamente pesquisas destinadas aos efeitos do uso de carboidratos fermentescíveis e aditivos alimentares serão necessárias. O presente estudo demonstra grande contribuição para elucidação do metabolismo de carboidrato e uso de aditivos no aproveitamento ruminal e cecal.

Foi comprovada a hipótese apresentada, encontrou-se macromoléculas envolvidas na degradação de carboidratos em tecidos do ceco bovino, dietas com maiores teores de amido demonstrando que o aproveitamento de energia a nível de ceco é afetado tanto para o nível de amido e/ou tipo de aditivo incorporado. Para o estudo do rúmen, os dados utilizando a proteômica com técnica 2D-PAGE demonstram que a utilização de diferentes aditivos nas dietas de bovinos confinados proporciona distintas rotas e síntese energética. Destaca-se que talvez a utilização de fitas com pH 4-7 poderia favorecer melhor separação dos *spots* proteicos no tecido ruminal.

O trabalho fortalece a necessidade de estudos posteriores para melhor entendimento da digestão e absorção de amido e efeitos de aditivos pós rúmen e comprova elucida como a síntese pode ocorrer no rúmen. Para novos estudos é necessário que haja redução de grupos ou tratamentos, pois, dificulta a análise e conclusão na expressão de proteínas em estudos utilizando eletroforese bidimensional, em contrapartida, essa técnica aliada a Shotgun (Gel Free) pode dar robustez a estudos futuros.