

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA DESMAMA PRECOCE SUPLEMENTADA COM
CONCENTRADO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO
LONGISSIMUS THORACIS EM BEZERROS DA RAÇA NELORE**

Ariane Enara Pedro

Zootecnista

Jaboticabal - SP - Brasil

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA DESMAMA PRECOCE SUPLEMENTADA COM
CONCENTRADO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO
LONGISSIMUS THORACIS EM BEZERROS DA RAÇA NELORE**

Ariane Enara Pedro

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Luis Pereira

Coorientadora: Dra. Juliana Akamine Torrecilhas

*Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.*

Jaboticabal - SP - Brasil

2023

P372e Pedro, Ariane Enara
Efeito da desmama precoce suplementada com concentrado sobre a expressão gênica do longissimus thoracis em bezerros da raça nelore / Ariane Enara Pedro. -- Jaboticabal, 2023
92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Guilherme Luís Pereira
Coorientadora: Juliana Akamine Torrecilhas

1. RNA-Seq. 2. Metabolismo Lipídico. 3. Expressão Gênica.

I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA DESMAMA PRECOCE SUPLEMENTADA COM CONCENTRADO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO *Longissimus thoracis* EM BEZERROS DA RAÇA NELORE

AUTORA: ARIANE ENARA PEDRO

ORIENTADOR: GUILHERME LUIS PEREIRA

COORIENTADORA: JULIANA AKAMINE TORRECILHAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Genética e Melhoramento Animal pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
GUILHERME LUIS PEREIRA
Data: 26/04/2023 10:13:12 -0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. GUILHERME LUIS PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente
RODRIGO DE NAZARÉ SANTOS TORRES
Data: 26/04/2023 10:07:31 -0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Pós-doutorando RODRIGO DE NAZARÉ SANTOS TORRES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural / FMVZ UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente
MARCELO RICARDO VICARI
Data: 26/04/2023 09:44:49 -0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Prof. Dr. MARCELO RICARDO VICARI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética / Universidade Estadual de Ponta Grossa

Jaboticabal, 17 de abril de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ariane Enara Pedro, nascida no dia 17 de abril de 1995, na cidade de Campinas, São Paulo, Brasil. Filha de Anelise Cristian Aguiar e Noel Francisco Pedro. Iniciou o curso de Bacharelado em Zootecnia em Agosto de 2014 na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus de Dois Vizinhos – PR. Foi bolsista de iniciação científica (Fundação araucária) nos anos de 2015 e 2016 sob a orientação do professor Dr. Ricardo Yuji Sado e bolsista de iniciação científica (CAPES) nos anos 2018 e 2019 sob a orientação da professora Dra. Juliana Morini Kupper Cardoso Perseguini. Obteve o título de bacharel em Zootecnia em fevereiro de 2020. Em março de 2021, ingressou no curso de mestrado pelo programa Pós-Graduação em Ciência Animal com ênfase em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal, sob a orientação do professor Dr. Guilherme Luis Pereira. Foi bolsista CAPES pelo período de março de 2021, até março de 2023.

EPÍGRAFE

“Minha luta diária é para ser reconhecida como sujeito, impor minha existência numa sociedade que insiste em negá-la.”

Djamila Ribeiro

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À minha família que foram o meu alicerce, em especial a minha mãe Anelise e meu irmão Rodrigo que sempre estiveram presentes em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Luis Pereira, pela oportunidade e orientação.

À Dr. Juliana por toda a disponibilidade, profissionalismo e ajuda durante o tempo de mestrado. Saiba que te admiro como pessoa e profissional.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade.

Aos Profs. Drs. Juliana Morini Kupper Cardoso Perseguini, Marcelo Marcos Montagner, Marco Tulio Costa Almeida, Marcela Toste Frata e Douglas Sampaio Henrique (em memória) pelos seus ensinamentos, incentivos e por me aconselharem sabiamente em ser uma pessoa e profissional melhor.

Aos professores Welder Angelo Baldassini e Luis Artur Loyola Chardulo pelos ensinamentos, disponibilidade e exemplos profissionais.

Aos meus amigos do coração Andressa Santana Neves, Camila de Godoy, Ricardo Sousa, Jessica Chieri, Camila Pereira de Oliveira, Andreza Francisco, João Barbosa, Mariana Andrade, Bruno Azevedo, Maria Clara e Matheus Harwalis por todo apoio, respeito e incentivos. Eu admiro e sempre admirarei vocês. Contem sempre comigo!

Aos meus amigos da República Palacete Assobradado em especial: Vitor (Telebixa), Lucas (Privê), Henrique e Eric (Aspirante) pela amizade e convivência sempre regados a muito café, apoios e conselhos. Me sinto extremamente grata por ter conhecido cada um de vocês.

Finalmente, a todos aqueles que indiretamente ou diretamente influenciaram e apoiaram este trabalho.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Metabolismo Lipídico em Ruminantes.....	16
2.2 Tecido Adiposo.....	17
2.3 Sequenciamento de RNA e Análise da Expressão Gênica Diferencial.....	20
3. OBJETIVO GERAL.....	22
3.1 Objetivos Específicos.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2 - EFEITO DA DESMAMA PRECOCE SUPLEMENTADA SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR DE BEZERROS NELORE.....	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Animais e Coleta de Tecido Muscular.....	29
2.2 Extração de RNA total, preparação de bibliotecas e sequenciamento de mRNA.....	30
2.3 Técnica de Extração de RNA.....	30
2.4 Alinhamento de Sequência e Obtenção de Matriz de Contagem.....	30
2.5 Identificação de Genes Diferencialmente expressos.....	31
2.6 Enriquecimento de Termos Funcionais.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICES.....	58

LISTA DE ABREVIações

- ACC** – Enzima acetil-CoA carboxilase
- AGL** – Ácidos graxos livres
- AGM** – Monoinsaturado
- AGS** – Ácido graxo saturado
- ALA** – Ácido alfa-linolênico
- ATP** – Síntese de trifosfato de Adenosina
- cDNA** – DNA complementar
- CLAs** – Ácidos linoleicos conjugados
- CPM** – Contagem por Milhão (do inglês, *Counts per Million*)
- CRH** – Hormônio liberador de corticotropina
- DE** – Genes Diferencialmente Expressos
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- FAS** – Ácido graxo sintase
- FDR** – *False Discovery Rate*
- Fe** – micronutriente Ferro
- GH** – Hormônio de Crescimento
- GHRH** – Hormônio liberador do hormônio de crescimento
- GO** – Gene Ontology
- GWAS** – Associação Genômica Ampla (do inglês, *Genome Wide Association Study*)
- LA** – Ácido linoleico
- miRNA** – Micro ácido ribonucleico
- mRNA** – RNA mensageiro
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- PPARs** – Proliferadores de Peroxissomos
- PUFA** – Ácido graxos Poli-insaturado
- QLTS** – Mapeamento de Características quantitativas
- REL**- retículo endoplasmático liso
- RNA-Seq** –
- SCD** – Enzima estearoli CoA dessaturase

SNC – Sistema nervoso central

i

SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms

SNS - Sistema nervoso simpático

TA – Tecido Adiposo

TAB – Tecido Adiposo Branco

TAG - Triglicerídeos

TAM – Tecido Adiposo Marrom

TH – Hormônio de tireóide

UCP1 - Proteína desacopladora 1

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

Tabela 1. Suplementação e dietas baseadas em forragem natural, farelo de soja, milho, aditivos e minerais, oferecidos a bovinos nelore em diferentes fases de desenvolvimento e submetidos a diferentes protocolos de desmama.....	30
Tabela 2. Médias e desvios-padrão para pesos dos animais aos 110 dias (desmama precoce) e aos 205 dias (desmama convencional); ganho de peso médio diário na fase de cria.....	33
Tabela 3. Parâmetros de Qualidade do Sequenciamento.....	34
Tabela 4. Cobertura de amostras mapeadas.....	34
Tabela 5. Genes diferencialmente expressos (GDE) presentes em vias metabólicas enriquecidas.....	42

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Coordenadas dos componentes principais PC1 e PC2 para cada amostra representados nos eixos x e y, respectivamente (A). *MDplot* em que são representados o \log_2 de *Fold Change* (FC) no eixo y e a expressão média de cada gene no eixo x. GDE *upregulated* e GDE *downregulated* estão representados por pontos azuis e vermelhos, respectivamente.....37
- Figura 2.** Enriquecimento funcional de termos GO relacionados aos processos biológicos por meio da análise de super-representação (ORA – over representation analysis) de genes mais expressos (*upregulated*) e genes menos expressos (*downregulated*) no momento 2.....38
- Figura 3.** Enriquecimento funcional de termos GO relacionados aos processos biológicos e vias metabólicas KEGG por meio da análise de super-representação (ORA – over representation analysis) de genes mais expressos (*up regulated*) e genes menos expressos (*down regulated*) no momento 2, considerando a significância do valor p ajustado menos que <0.05 por Benjamini-Hochberg.....39
- Figura 4.** Relação entre DEGs reguladas em up e down-regulated no momento 1 do desmame e os processos e vias metabólicas enriquecidas do conteúdo de gordura intramuscular (eixo y) e a escala de cores do lado direito da figura indica a inteiração de \log_240
- Figura 5.** Rede de DEGs compartilhados no entre os processos biológicos e as vias KEGG, que se destacaram no ORA. Os genes diferencialmente expressos são enriquecidos em vias de sinalização, como a via de sinalização AMPK, a via de sinalização Wnt e a via de sinalização PPAR, que apresentam relação ao metabolismo de lipídeos.....41

EFEITO DA DESMAMA PRECOCE SUPLEMENTADA COM CONCENTRADO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO *LONGISSIMUS THORACIS* EM BEZERROS DA RAÇA NELORE

RESUMO - Este estudo foi conduzido com bezerros da raça Nelore pertencentes a dois grupos diferentes, desmama precoce (120 dias) e desmama convencional (205 dias), objetivando analisar de forma global as diferenças na expressão gênica muscular (*Longissimus thoracis*, LT) entre amostras de tecido muscular coletadas por meio do sequenciamento do RNA mensageiro utilizando a técnica de RNA-Seq e avaliar a relação entre genes diferencialmente expressos sobre suas funções gênicas enriquecidas e vias metabólicas das fibras de tecido muscular esquelético em bezerros Nelore. Para isso, foram utilizados dezesseis bezerros, dos quais oito foram desmamados precocemente e oito do desmama convencional. Os bezerros desmamados precocemente foram suplementados até duzentos e cinco dias com uma dieta contendo 20% de Proteína Bruta e 75% de NDT, em uma quantidade de 20g de MS/kg de PV, enquanto os desmamados aos duzentos e cinco dias permaneceram a pasto sob aleitamento. Para comparação da expressão gênica entre tratamentos foi realizado o RNA Seq de alíquotas de músculo *Longissimus thoracis* coletadas por biópsia aos duzentos e cinco dias dos dezesseis indivíduos. As análises de enriquecimento funcional foram realizadas por meio de teste hipergeométrico para super-representação de genes diferencialmente expressos em vias metabólicas KEGG utilizando o pacote *clusterProfiler* do programa R, pela metodologia do pacote edgeR. Um total de 14.076 genes estavam presentes, visto que 762 DEGs enriquecidos significativos foram observados após o ajuste de FDR com valor de p ajustado <0,05. Entre os 762 termos de GO, 405 são genes up-regulated e 357 genes down-regulated pertenciam ao processo biológico envolvidos no metabolismo lipídico nos respectivos momentos. Foram selecionados com base nos resultados das análises os primeiros 20 genes regulados positivamente com atuação no metabolismo lipídico em animais desmamados precocemente sendo eles: *ADIPOQ*, *FABP4*, *FADS1*, *FADS2*, *SCD*, *ACSM1*, *ELOVL6*, *HSD17B12*, *PCK2*, *PER2*, *SREBF1*, *FBP1*, *NR4A3*, *PRKAG3*, *ACACA*, *FASN*, *COL4A3*, *ADCY1* e *C8G*. Os resultados de vias KEGG comuns com método e Vias KEGG enriquecidas a partir de DEGs comuns indicaram forte regulação positiva de genes relacionados a adipogênese e lipogênese e regulação negativa da degradação e ácidos graxos no tecido muscular em bezerros que foram desmamados aos cento e vinte dias.

Palavras-chaves: RNA-Seq; Metabolismo lipídico e expressão gênica.

EFFECT OF EARLY WEANING SUPPLEMENTED WITH CONCENTRATE ON LONGISSIMUS THORACIS GENE EXPRESSION IN NELORE CALVES

ABSTRACT- This study was conducted with Nelore calves belonging to two different groups, early weaning (120 days) and conventional weaning (205 days), aiming to analyze globally the differences in muscle gene expression (Longissimus thoracis, LT) between muscle tissue samples collected by messenger RNA sequencing using the RNA-Seq and evaluate the relationship between differentially expressed genes on their enriched gene functions and metabolic pathways of skeletal muscle tissue fibers in Nelore calves. For this, sixteen calves were used, of which eight were weaned early and eight from conventional weaning. Calves weaned early were supplemented until two hundred and five days with a diet containing 20% crude protein and 75% NDT, in an amount of 20g DM/kg BW, while calves weaned at two hundred and five days remained at pasture under suckling. For comparison of gene expression between treatments, RNA Seq of aliquots of Longissimus thoracis muscle collected by biopsy at two hundred and five days from the sixteen individuals was performed. Functional enrichment analyses were performed by hypergeometric test for over-representation of differentially expressed genes in KEGG metabolic pathways using the clusterProfiler package of the R program, by the edgeR package methodology. A total of 14,076 genes were present, as 762 significant enriched DEGs were observed after FDR adjustment with adjusted p-value <0.05. Among the 762 GO terms, 405 are up-regulated genes and 357 down-regulated genes belonged to the biological process involved in lipid metabolism at the respective times. Based on the analysis results, 20 positively regulated genes acting on lipid metabolism in early weaned animals were selected, as follows: *ADIPOQ*, *FABP4*, *FADS1*, *FADS2*, *SCD*, *ACSM1*, *ELOVL6*, *HSD17B12*, *PCK2*, *PER2*, *SREBF1*, *FBP1*, *NR4A3*, *PRKAG3*, *ACACA*, *FASN*, *COL4A3*, *ADCY1* and *C8G*. The results of common KEGG pathways with method and enriched KEGG pathways from common DEGs indicated strong positive regulation of genes related to adipogenesis and lipogenesis and negative regulation of degradation and fatty acids in muscle tissue in calves that were weaned at one hundred and twenty days.

Keywords: gene expression; RNA-Seq; lipid metabolism.

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte tem grande relevância no agronegócio nacional. Em 2021, o setor movimentou cerca de R\$ 169,29 bilhões incluindo movimentações nos valores de insumos utilizados na pecuária, nutrição animal, sanidade animal, investimentos em genética, vendas para o mercado interno e exportações de produtos. Ao todo, 26.485,3 milhões toneladas equivalentes a carcaça (TEC), foram comercializados internamente, enquanto, 9.146,6 milhões de TEC foram destinados ao mercado externo (ABIEC, 2022).

Bovinos de corte da raça zebuína (*Bos taurus indicus*) compõe 80% dos grupos genéticos do rebanho brasileiro. Conhecidos por sua rusticidade, são animais que apresentam bom desempenho em diferentes condições de manejo, além de exibirem resistência a parasitas e doenças (Amancio et al., 2019). Dentre as raças zebuínas, a raça Nelore tem o maior destaque por apresentar potencial em características ligadas à produção de carne, entretanto em comparação com as raças taurinas o produto apresenta menor acabamento (Bittencourt, 2020; Martins, 2020).

Nas duas últimas décadas, foram observados avanços sensíveis nas técnicas utilizadas para o sequenciamento do material genético de um indivíduo, de tal modo, que é possível obter diferentes informações, tais como, de sequências completas do genoma, de diversos tipos de variantes, de genes diferencialmente expressos, dentre muitas outras, à um baixo custo e um curto intervalo de tempo (Berry et al., 2014). Dentre estes avanços, técnicas de genotipagem em larga escala têm sido efetivamente empregadas na seleção de reprodutores dentro de programas de melhoramento por meio da seleção genômica (Boichard et al., 2010). Embora, a seleção genômica já seja empregada na prática, muitos estudos tem tentado aproveitar tais métodos de genotipagem para elucidar questões de governo gênico e adaptações metabólicas de características complexas e economicamente importantes na raça Nelore, como: maciez da carne deposição de gordura e perfis lipídicos (Zhang et al., 2019), conversão alimentar (Weber et al., 2016), precocidade sexual (Irano et al., 2016), entre outras, das quais bovinos Nelore apresentam piores índices se comparado a raças taurinas, contudo, tais estudos são limitados quanto a

indicar como a alteração ambiental, nutricional e sanitária pode afetar tais características por meio da interação genótipo ambiente.

Nesse sentido, tais questões, têm sido melhor compreendidas dentro da cadeia de produção de carne bovina pelo emprego da técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq), a qual permite compreender como perfis de expressão gênica de células ou tecidos são alterados devido a diferentes condições, tratamentos ou ao tempo, bem como, tais genes diferencialmente expressos afetam vias metabólicas por meio de análises de enriquecimento funcional (Molan, 2018).

Dentre as características de importância econômica dentro da bovinocultura corte, muitas estão relacionadas, como visto acima, a precocidade da maturidade fisiológica, eficiência alimentar e qualidade cortes (Londoño-Gil et al., 2022). Além do melhoramento genético, seja o clássico ou o auxiliado por ferramentas moleculares, manejos nutricionais e reprodutivos são importantes para obter incremento na produtividade e qualidade de produtos.

Por meio destes manejos que acarretam ganhos na produtividade, está a desmama precoce de bezerros, a qual visa o aumento da eficiência reprodutiva de vacas, principalmente, as jovens (Aroeira et al., 1987). Este protocolo de desmama, consiste em interromper o aleitamento já a partir dos 60 ou 90 dias de idade, o que possibilita o melhor desempenho reprodutivo de matrizes, principalmente primíparas (Cezar e Euclides Filho, 1966). Isto, por não ser necessário um alto deslocamento de energia para produção de leite, o que conduz ao aumento rápido do escore corporal da vaca, tornando-a apta à reprodução (Lake et al., 2006), ou seja, liberando-as mais cedo para um novo ciclo estral que leva a diminuição do intervalo entre partos e aumento do número de bezerros nascidos por vaca. Além disso, como já avaliado em raças de origem europeia, o desmame precoce pode ter grande efeito sobre a fisiologia de bezerros que serão destinados ao abate, levando a adaptações metabólicas diferentes dos que são desmamados de forma convencional (aos 210 dias de idade) (Scheffler et al., 2014).

O processo de desmama precoce submete os bezerros a elevado estresse devido à mudança de ambiente e ordem social (Blanco et al., 2009). Por outro lado, a desmama precoce proporciona uma possibilidade de aporte nutricional de melhor qualidade ao animal desmamado, o que pode levar a melhorias na carcaça e na qualidade da carne, além de, se bem conduzido, diminuir o ciclo para o abate, isso,

principalmente quando comparados aos indivíduos que permanecem a pasto sob regime de aleitamento convencional (Arthington e Moriel, 2014). Portanto, como visto, existem indícios de haver modulação da expressão gênica devido a mudança de ambiente e dieta durante a cria (pós-natal) na raça Nelore e que isso pode refletir na alteração do metabolismo de lipídeos e de fibras musculares, sendo estas últimas alterações associadas a maciez de carne.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Metabolismo lipídico em ruminantes

Entende-se que lipídeos são compostos químicos orgânicos solúveis em solventes orgânicos que têm em sua composição: carbono, hidrogênio e oxigênio. Os triglicerídeos (TAG) são a principal forma de armazenamento de gordura no tecido animal, compostos por três ácidos em ligação éster com um glicerol e sua principal função é a reserva de energia (Melo,2018).

De acordo com Arrigoni (2016) o processo de oxidação completa de compostos de triglicerídeos fornece em média 9,45 Kcal/g de lipídeos, podendo ser 2,25 vezes mais energético que as proteínas e carboidratos. Todavia, segundo Guimarães (2021) a distinção entre óleos e gorduras, está na diferença do seu estado a temperatura ambiente, não diferindo em sua composição.

Os processos de absorção dos lipídeos acontecem na forma de ácidos graxos esterificados nos enterócitos, sendo que, uma parte dos ácidos graxos livres passam pela circulação portal, visto que os lipídeos esterificados, serão absorvidos pelo sistema linfático na forma de lipoproteínas e/ou na forma de quilomicrons (Silva Oliveira; Santos; Lima, 2019).

Na grande maioria dos animais, em específico em vertebrados, os triglicerídeos são armazenados nas células do tecido adiposo e podem ser mobilizados pela ação da lipase caso o animal demande mais energia do que a obtida por meio da alimentação (Melo,2018), contudo existem alguns fatores como por exemplo, sexo do animal, genótipo, sistema de terminação e alimentação que podem influenciam diretamente no metabolismo lipídico animal (Sousa,2022).

A digestão e a absorção de lipídios são divididas em quatro fases, sendo elas: emulsificação, hidrólise, formação de micelas e absorção. O processo de emulsificação tem início no abomaso, e consiste na redução das gotículas de lipídios que ficam suspensas em água, todavia em razão da ação das enzimas co-lipase e lipase ocorre a hidrólise dos triglicerídeos. No pâncreas é onde secreta a enzima lipase, contudo como a mesma não pode atacar as gotículas de lipídeos emulsificadas no intestino, porque os lipídios estão circundados de produtos biliares, a enzima co-lipase permite a passagem pelos produtos biliares para que a enzima lipase acesse os triglicerídeos (Pessoa; Gois; Campos, 2016).

Os componentes presentes na micela se difundem, exceto os ácidos biliares que são transportados para o fígado e reabsorvidos no íleo, onde são re-esterificados formando triacilglicerídeos e fosfolipídios, os mesmos são estocados com o colesterol após passar pelo processo de atravessar a membrana apical, sendo assim os lipídios a serem capturados pelas moléculas que tem como objetivo conduzir os mesmos para o retículo endoplasmático liso (REL) (Pessoa; Gois; Campos, 2016).

A mobilização de lipídeos ocorre por meio do transporte dos triaglicerídeos, os quais podem ser hidrolisados, liberando glicerol e ácidos graxos no rúmen, sendo que os ácidos graxos neste processo sofrem beta-oxidação, o que resultará em acetil-Coa, a qual será convertida em ATP no ciclo de Krebs. Deste mesmo modo, o glicerol anteriormente liberado também participará do ciclo de Krebs para produção de ATP (Souza; Ribeiro, 2021).

Em especial, os ácidos graxos insaturados resultantes passam pelo processo de biohidrogenação. A biohidrogenação é um mecanismo realizado por microrganismos ruminantes como forma de defesa, uma vez que os lipídeos insaturados podem ser prejudiciais a determinadas bactérias ruminantes e no processo de biohidrogenação ocorre a isomerização das duplas ligações e adição de hidrogênio à essas ligações, ocasionando a alteração da composição e perfil dos ácidos graxos que chegam ao duodeno (Souza; Ribeiro, 2021).

2.2 Tecido Adiposo

O tecido adiposo (TA) tem origem no mesoderma assim como os ossos e o músculo, é um órgão fundamental para a manutenção do equilíbrio energético sendo

que as células adipócitos desempenham funções específicas que permitem a regulação da homeostasia (Oliveira,2021).

O TA descritos em mamíferos é diferenciado em marrom e branco, sendo que um dos principais objetivos do tecido adiposo marrom (TAM) é manter a temperatura corporal por meio do gasto energético via termogênese, sendo o mesmo desenvolvido durante a vida fetal do animal (Oliveira,2021). Em contrapartida no tecido adiposo branco (TAB), as enzimas lipólise e lipogênese atuam de forma conjunta para manter a homeostase da gordura corporal armazenando-as e é desenvolvido ainda no útero materno, todavia o através o processo chamado *brownização*, surge o tecido adiposo bege, onde os adipócitos com o fenótipo marrom situam-se nos depósitos do tecido adiposo branco (Rodrigues,2019).

O processo de termogênese do tecido adiposo marrom é dependente da expressão da proteína “desacopladora” 1 (UCP1), conduzido pelo sistema nervoso simpático (SNS) (Maliszewska; Kretowski., 2021). Apesar do alto conteúdo mitocondrial e elevada taxa de respiração celular nesse processo, os adipócitos marrons apresentam baixa atividade da síntese de trifosfato de adenosina (ATP), o que afeta diretamente a produção de calor, contudo, o tecido adiposo branco é o principal reservatório energético do organismo que armazena lipídeos em forma de triglicerídeos (TAGs) e que são depositados ao redor dos órgãos internos, abaixo do tecido adiposo subcutâneo (Maliszewska; Kretowski., 2021).

O sistema nervoso simpático não está somente envolvido no processo de termogênese, como também no processo da lipólise e brownização do tecido adiposo, sendo assim, a noradrenalina liberada pelo SNC, ativa o receptor β -adrenérgicos (β -AR) nos receptivos adipócitos marrons, que induz a expressão de mRNA da UCP-1 e que ativa a via de sinalização adenilato ciclase-adenosina monofosfato cíclico-proteína quinase A (AC-AMPc-PKA) (Shin et al., 2017).

Os adipócitos apresentam importantes funções no organismo de ruminantes devido atuarem como células endócrinas e são capazes de secretar o hormônio da leptina, interleucinas e IGF-1, sendo que o hormônio da leptina é secretado, principalmente pelo tecido adiposo e suas principais funções estão relacionadas a regulação do mesmo no corpo do animal, uma vez que, quando os níveis de gordura estão adequados, o hormônio é sintetizado e transportado pela corrente sanguínea

para seguir ao órgão alvo, contudo alterações do balanço energético e jejum podem influenciar na síntese da leptina (Ferrinho, 2020).

A leptina presente na corrente sanguínea é capaz de alterar o consumo alimentar a partir da inibição da formação de neuropeptídeos Y e com o aumento da expressão de neuropeptídeos anorexígenos, como por exemplo o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que permite o aumento do gasto energético corporal e do hormônio estimulante de α -melanócito (α -MSH) (Almeida; Pereira e Pascoal, 2022). Além de que a leptina pode ter ação lipolítica, estimulando e inibindo a lipogênese, levando em consideração o mecanismo de proteção contra a atividade adipotoxicidade provocada pela presença excessiva de triglicerídeos no citosol das células (Almeida; Pereira e Pascoal, 2022).

Segundo Ferrinho (2020), na fase de crescimento animal a leptina tem uma função direta no metabolismo, uma vez que participa da liberação do hormônio de crescimento (GH), via neuropeptídeos, estimulando o fluxo do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH).

Um dos fatores moleculares mais relevantes que estão envolvidos na formação do tecido marrom e do tecido branco é os proliferadores de peroxissomos (PPARs) que são fatores de transcrição influenciados por ácidos graxos, encontrados no citoplasma, capazes de codificar proteínas para a diferenciação da biogênese mitocondrial, adipócitos, oxidação lipídica, realizado pela UCP-1 (Oliveira, 2021).

Em mamíferos os PPARs se apresentam de três formas diferentes com funções exclusivas: PPAR-alfa, ligado ao metabolismo lipídico, é expresso no tecido adiposo marrom, no rim, fígado e coração; o PPAR β/δ atua no processo do balanço energético e na oxidação dos ácidos graxos e o PPAR γ que tem como objetivo principal regular a diferenciação dos adipócitos, bem como a expressão de genes que estão envolvidos no metabolismo de lipídeos e que está mais expresso no tecido adiposo branco em comparação ao tecido adiposo marrom (Hui; Xiaohua e Chunyan, 2020).

Devido ao uso do promotor regulador e a atividade de splicing alternativo no organismo, o PPAR γ pode se apresentar como duas isoformas: PPAR γ 1 e PPAR γ 2, sendo que a isoforma PPAR γ 1 contribui para o desenvolvimento do tecido adiposo e deposição de gordura e a PPAR γ 2 apresenta função reguladora na adipogênese a se considerar a isoforma mais adipogênica (Hui; Xiaohua e Chunyan, 2020).

A ativação do PPAR γ nos adipócitos favorece a expressão de genes envolvidos na esterificação, transporte intracelular e liberação de ácidos graxos livres (AGL), sendo que no tecido adiposo a expressão do PPAR γ aumenta quando o consumo por alimentos ricos em gordura é maior e a expressão é menor quando as condições de jejum ou deficiência de insulina se fazem presentes (Sun et al., 2021).

De acordo com Sun et al (2021), no metabolismo de lipídios o fator regulador de esterol também está envolvido e fica ligado a SREBP-1c que é adjunto a regulação dos genes no processo da lipogênese, atuando diretamente nos genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e que codificam as enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC) e o ácido graxo sintase (FAS), além de controlar a expressão da enzima estearoli CoA dessaturase (SCD), uma vez que as alterações nos níveis de SREBP afeta a síntese da SCD, ocasionando diferenças na composição dos ácidos graxos no tecido adiposo do animal.

2.3 Sequenciamento de RNA e Análise da Expressão Gênica Diferencial

Um dos métodos de análises mais utilizados para identificação de forma completa de transcritos presentes em uma célula é o RNA-Seq e o Microarranjo, sendo eles dois métodos consideráveis eficaz para a quantificação dos níveis de expressão dos genes, todavia a técnica de RNA-Seq apresenta baixo custo, alta sensibilidade e eficiência devido ao seu nível de acurácia em relação ao método de microarranjo, além de identificar a presença de polimorfismos (Salatta, 2019).

A técnica de sequenciamento de RNA-Seq, também conhecido como Whole Transcriptome Shotgun Sequencing permite identificar através de técnicas computacionais e experimentais as sequências de RNA em um determinado estágio de desenvolvimento de acordo com as suas condições fisiológicas e analisar as presentes alterações na expressão dos genes, todavia em processos biológicos o transcriptoma de um organismo é de suma importância, visto que é possível identificar e entender os genes de RNA em todo o processo (Gonçalves., 2017). Para obter informações detalhadas sobre a expressão dos genes é necessário realizar uma coleta amostral do material biológico de RNA para que assim consiga identificar as regiões regulatórias e a presença de novos transcritos (Azambuja, 2017).

O transcriptoma é um conjunto de moléculas de RNA codificadoras e não codificadoras presentes em um organismo, podendo ser provenientes de uma célula e/ou tecido, contudo é possível através do estudo do transcriptoma que é conhecido como transcriptômica identificar todos os transcritos presentes no material biológico, o padrão de splicing, suas modificações nos pós transcricionais, a quantidade de alterações e seus respectivos níveis de expressão, determinar a estrutura dos genes, identificar genes e suas vias metabólicas e a função (Giachetto, 2019).

Existem diferentes programas estatísticos que possibilitam se obter informações sobre a expressão genica diferencial de um material genético, visto que o mesmo tem como objetivo identificar os genes que apresentam um determinado nível de expressão em diferentes condições experimentais e se esses níveis sofrem alguma alteração (Negai et al., 2015).

Nos últimos estudos três ferramentas foram utilizadas para as análises de expressão gênica, sendo elas a ferramenta DESeq, EdgeR e o Cuffdiff2. No estudo realizado por Zhang et al (2014) foi identificado que a DESeq apresenta grande variação em suas profundidades de sequenciamento, porém a utilização do Cuffdiff2 foi recomendada para análises de bibliotecas que apresentam maior profundidade de sequenciamento e a ferramenta EdgeR que é um pacote do R – bioconductor que utiliza a normalização do TMM e se baseia na distribuição binominal negativa e foi classificada como adequada para bibliotecas com maior variação em relação a quantidade de sequencias (Robinson; Mccarthy; Smyth, 2010).

Existem diferentes minerais e micronutrientes que desempenham um papel central em funções bioquímicas do sistema, sejam atuando como componentes proteicos ou como cofatores enzimáticos no metabolismo de energia, transporte de oxigênio, diferenciação celular e regulação genica, sendo assim o micronutriente ferro (Fe) está envolvido no desenvolvimento, crescimento e no metabolismo de vários hormônios como por exemplo o hormônio de crescimento (GH), hormônio de tireóide (TH) e no desenvolvimento e funcionamento muscular (Dauncey et al., 2004).

De acordo com Diniz (2016) o conteúdo do ferro presente no musculo pode afetar a qualidade da carne, sendo que a carne é uma excelente fonte de ferro e contribui com até 18% das necessidades do organismo humano, visto que de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a anemia por falta de ferro (Fe) é um distúrbio

que afeta cerca de 30% da população brasileira, portanto o teor de ferro tende a agregar a qualidade da carne além de contribuir para a saúde humana.

Segundo o estudo realizado por Afonso (2019) foi caracterizado as vias biológicas envolvidas na deposição de minerais musculares em novilhos da raça Nelore através da análise de RNA-Seq de expressão do músculo *Longissimus Thortacis* para identificar genes e processos relacionada à homeostase mineral, visto que os minerais participam de uma variedade de processos biológicos como por exemplo o metabolismo, regulação da replicação celular, diferenciação, crescimento, manutenção de homeostase e cofatores enzimáticos além de exercer uma função biológica sobre as células musculares que estiverem em boa quantidade podendo elas influenciar diretamente nas características econômicas de interesse na produção.

Em um estudo realizado por Oliveira (2018) foi possível levantar pontos a fim de compreender as principais funções regulatórias na expressão de mRNA e miRNA do músculo *Longissimus dorsi* de novilhos da raça Nelore a fim identificar genes alvos que possivelmente afetam a deposição de gordura intermuscular e foi concluído que existe uma grande relação do metabolismo da glicose e os processos inflamatórios na deposição de gordura do músculo, além de que a mesma está associada ao equilíbrio de lipogênese, taxa de lipóse no músculo, atividades catabólicas e tamanho dos adipócitos.

Dessa forma, a sequência de RNA e as análises de expressão de genes se torna uma grande ferramenta em pesquisas na área animal, podendo elas ser na quantificação de expressão gênica e/ou nas identificações de regiões no genoma em características de importância econômica na cadeia produtiva da bovinocultura de corte.

3. OBJETIVO GERAL

Dada a falta de informação sobre alterações da expressão gênica em bezerros submetidos à desmama precoce na raça Nelore, bem como a relação destas alterações com adaptações metabólicas do músculo esquelético estriado, este estudo teve por objetivo: identificar genes diferencialmente expressos no tecido muscular esquelético de bezerros Nelore submetidos a desmama precoce nos momentos antes

e pós desmama precoce, bem como, avaliar o impacto dessas alterações em via metabólicas e em processos biológicos.

3.1 Objetivos específicos

- Analisar de forma global diferenças na expressão gênica muscular (*Longissimus thoracis*, LT) entre amostras de tecido muscular coletadas antes e após a desmama de bezerros Nelore por meio do sequenciamento do RNA mensageiro utilizando a técnica de RNA-Seq;
- Avaliar a relação entre genes diferencialmente expressos sobre suas funções gênicas enriquecidas e vias metabólicas das fibras de tecido muscular esquelético em bezerros Nelore.

REFERÊNCIAS

AFONSO, J., Coutinho, LL, Tizioto, PC, da Silva Diniz, WJ, de Lima, AO, Rocha, MIP, & de Almeida Regitano, LC. Muscle transcriptome analysis reveals genes and metabolic pathways related to mineral concentration in *Bos indicus*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

AMANCIO, Andréia Pires et al. Cariótipo anilhado de gado Nelore (*Bos taurus indicus* Linnaeus, 1758). **Comparative Cytogenetics** , v. 13, n. 3, pág. 265, 2019.

AROEIRA, J. Á. D. C.; ROSA, A. N.; VERNEQUE, R. S. Efeito da desmama precoce sobre o desenvolvimento de bezerros e sobre a eficiência reprodutiva de vacas nelore criadas em jaraguá e campo nativo. Comunicado Técnico 31. **Embrapa**, 1987.

ARTHINGTON, J.D.; MORIEL, P. Impressão Metabólica De Bezerros Desmamados Precocemente: Efeitos no Desempenho Pós Desmama em Machos e Fêmeas, **In Anais...XVIII Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**.Uberlândia, 2014.

AZAMBUJA, Rodrigo Carneiro de Campos. **Eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes composições raciais: Habilidade materna, reprodução, metabolismo e expressão diferencial de genes por meio de sequenciamento de RNA**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas.

BERRY, D. P.; WALL, E.; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and breed cattle. *Animal*, v.8 (suppl. 1), p.105–121, 2014.

BITTENCOURT, ANGELA. Utilização de corridas de homozigose para estimativa de endogamia em bovinos da raça Nelore. **Embrapa Gado de Corte-Tese/dissertação (ALICE)**, 2020.

BLANCO, M.; CASASÚS, I.; PALACIO, J. Effect of age at weaning on the physiological stress response and temperament of two beef cattle breeds. **Animal**, v.3, ed.01, p.108-117, 2009.

BOICHARD, D et al. Genomic selection in French dairy cattle. Manuscript 716 in Proc. **World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**, Leipzig, Germany, 2010.

CEZAR, I.M.; EUCLIDES FILHO, K. Novilho precoce: reflexos na eficiência e economicidade do sistema de produção. Campo Grande: **EMBRAPACNPGC**, 1996. 31 p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 66).

DAUNCEY, MJ; KATSUMATA, M.; WHITE, P. Nutrição, expressão de receptores hormonais e interações gênicas: implicações para o desenvolvimento e doenças. In: **Desenvolvimento muscular de animais de produção: fisiologia, genética e qualidade da carne**. Wallingford Reino Unido: CABI Publishing, 2004. p. 103-124.

DINIZ, Wellison Jarles da Silva, Coutinho et al. Iron content affects lipogenic gene expression in the muscle of Nelore beef cattle. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161160, 2016.

FERRINHO, Adrielle Matias. **Expressão de genes envolvidos no perfil de ácidos graxos e proteólise post mortem de bovinos Nelore e Rubia Gallega x Nelore**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GIACHETTO, Poliana Fernanda. Transcriptoma do carrapato dos bovinos. **Embrapa Informática Agropecuária-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2019.

GONÇALVES, Leilane Oliveira. **Análise de dados de sequenciamento de RNA voltados à comparação de expressão gênica visando a um melhor entendimento dos mecanismos de resistência aos antimoniais**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Concentração Biologia Celular e Molecular) -Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2017.

HUI, WU; XIAOHUA, LI; CHUNYAN, SHEN Receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma na regulação e diferenciação de adipócitos brancos e marrons. **Physiological Research** , v. 69, n. 5, p. 759, 2020.

IRANO, N et al. Genome-wide association study for indicator traits of sexual precocity in nelore cattle. **PLoS ONE**. v.11, e0159502, 2016.

LAKE, S. L et al. Effects of body condition score at parturition and postpartum supplemental fat on metabolite and hormone concentrations of beef cows and their suckling calves. **J. Anim. Sci.** 84:1038–1047, 2006.

LONDOÑO-GIL, Marisol et al. Heritability and genetic correlations between marbling in longissimus dorsi muscle and conventional economic traits in Nelore beef cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54, n. 5, p. 274, 2022.

MALISZEWSKA, Katarzyna; KRETOWSKI, Adam. Tecido adiposo marrom e seu papel na homeostase da insulina e da glicose. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 22, n. 4, pág. 1530, 2021.

MARTINS, Rafaela. **Estudo de associação genômica ampla (GWAS) para características de carcaça mensuradas por ultrassonografia em bovinos da raça Nelore.** 2020. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

MOLAN, André Luiz. **Construção de uma ferramenta para análise de enriquecimento funcional gênico multiespécie entre amostras comparativas.** 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociência, Botucatu.

NAGAI, Luís Augusto Eijy. **Identificação de genes relacionados à maciez da carne de bovinos das raças Angus e Nelore por análise de expressão diferencial.** 2015. 64 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível: 29 . Acesso em: 16 mai. 2021.

OLIVEIRA, G. B et al. Integrative analysis of microRNAs and mRNAs revealed regulation of composition and metabolism in Nelore cattle. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2018.

ROBINSON M D, MCCARTHY DJ, SMYTH GK: edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**. 2010, 26: 139-140. 10.1093/bioinformatics/btp616.

RODRIGUES, D., TEIXEIRA, R., SHOCKLEY, J. Inspection agency monitoring of food safety in an emerging economy: A multilevel analysis of Brazil's beef production industry. **International Journal of Production Economics**, v. 214, n. 7, p. 1–16, 2019.

SALATTA, Bruna Maria. **Expressão de Genes e Proteínas Relacionados à Deposição de Gordura Intramuscular em Bovinos Nelore.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2019.

SCHEFFLER, J. M. et al. Early metabolic imprinting events increase marbling scores in fed cattle. **Journal of Animal Science**. v.92, p.320–324, 2014.

WEBER, K. L. et al. Identification of gene networks for residual feed intake in Angus cattle using genomic prediction and RNA-seq. **PLOS ONE** v.11, e0152274, 2016.

ZHANG, R. et al. Genome-wide association study identifies the PLAG1-OXR1 region on BTA14 for carcass meat yield in cattle, **Physiological Genomics**. 2019.

Zhang, X.; Zhao, F.; Si, Y.; Huang, Y.L.; Yu, C.P.; Luo, C.C.; Zhang, N.; Li, Q.Z.; Gao, X.J. GSK3 β regulates milk synthesis in and proliferation of dairy cow mammary epithelial cells via the mTOR/S6K1 signaling pathway. **Molecules** 2014, 19, 9435–9452.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA DESMAMA PRECOCE SUPLEMENTADA SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR DE BEZERROS NELORE.

RESUMO: Através do manejo de desmama precoce é possível proporcionar ao animal desmamado um aporte nutricional de melhor qualidade o qual terá efeito positivo se bem conduzido em fisiologia corporal, levando a adaptações metabólicas que refletirá na diminuição do ciclo de abate se comparado com animais desmamados em sistemas de manejo convencional (210 dias de idade). O objetivo da realização deste estudo foi identificar genes diferencialmente expressos e alterações metabólicas do músculo esquelético em bezerros da raça Nelore desmamados precocemente. O estudo foi realizado em uma fazenda comercial, localizada no município de Cáceres-MT, Brasil no ano de 2021. Foram utilizados 20 bezerros nelore nascidos no mesmo mês, de vacas de mesma idade e ordem de parto, os quais foram desmamados aos 120 dias e realocados em piquete contendo forragem natural de tifton 85 (ad libitum) e fornecido concentrado contendo 20% de proteína bruta e 75% de nutrientes digestíveis totais em uma proporção de 2g de matéria seca/kg de peso vivo até os 205 dias. Amostras do músculo *Longissimus thoracis* foram coletadas dos 20 bezerros por meio de biópsia aos 120 e 205 dias de idade. A partir das alíquotas do LT foram analisadas as diferenças na expressão gênica em relação ao tratamento do desmama precoce vs desmama convencional (M2vsM1) por meio da técnica de sequenciamento de mRNA (RNA-Seq). Dentre todos os genes anotados, 14.076 estavam sendo expressos no tecido muscular, dos quais 762 genes diferencialmente expressos (DEGs) significativamente diferentes entre os tratamentos (M2vsM1) ($FDR < \text{ou} > |0,5|$). Destes, 405 super- e 357 subexpressos após o tratamento. As análises de enriquecimento funcional realizadas a partir dos genes diferencialmente expressos (DEGs), indicaram genes que participam de vias metabólicas (KEGG) e processos biológicos (GO) relacionados à lipogênicos e adipogênicos após o período de suplementação, contribuindo com a atividade do metabolismo de ácidos graxos, reserva energética, respostas a insulina, biossíntese de ácidos graxos e sinalização de PPAR.

Palavras-chaves: Expressão gênica, *Bos indicus*, RNA-Seq, desmama precoce e metabolismo lipídico.

EFFECT OF SUPPLEMENTED EARLY WEANING ON MUSCLE ENERGY METABOLISM OF NELLORE CALVES.

Through early weaning management it is possible to provide the weaned animal with a better quality nutritional contribution which will have a positive effect if well conducted in body physiology, metabolic adaptations that will reflect the reduction of the slaughter cycle compared to weaned animals in conventional management systems (210 days of age). The objective of this study was to identify differentially expressed genes and metabolic changes of skeletal muscle in Nelore calves weaned early. The study was conducted in a commercial farm, located in the municipality of Cáceres-MT, Brazil in 2021. We used 20 Nelore calves born in the same month, from cows of the same age and order of delivery, which were weaned at 120 days and relocated in paddock containing natural forage Tifton 85 (ad libitum) and supplied concentrate containing 20% crude protein and 75% total digestible nutrients in a proportion of 2g dry matter/kg live weight by 205 days. Samples of the Longissimus thoracis muscle were collected from 20 calves by biopsy at 120 and 205 days of age. From the aliquots of TL were analyzed the differences in gene expression in relation to the treatment of early weaning vs conventional weaning (M2vsM1) through the technique of mRNA sequencing (RNA-Seq). Among all annotated genes, 14,076 were being expressed in muscle tissue, of which 762 differentially expressed genes (Degs) significantly different between treatments (M2vsM1) (FDR < or > |0.5|). Of these, 405 super- and 357 subexpressos after treatment. The functional enrichment analyzes performed from the differentially expressed genes (Degs) indicated genes that participate in metabolic pathways (KEGG) and biological processes (GO) related to lipogenic and adipogenic activity of fatty acid metabolism, energy reserve, insulin responses, fatty acid biosynthesis and PPAR signaling.

Keywords: Gene expression; *Bos indicus*, RNA-Seq, Early weaning and Lipid metabolism

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte no Brasil exerce um crescente impacto na economia nacional, não somente pelo volume de carcaça comercializado interna e externamente (Batistelli et al., 2022), mas, também, pelo aumento da geração e aplicação de recursos tecnológicos em um meio cada vez mais industrializado de produção, o que tem elevado a abrangência da atividade à diversas áreas da sociedade (Menez et al., 2020). O rebanho brasileiro de bovinos de corte é constituído majoritariamente por raças zebuínas, as quais correspondem, aproximadamente, a 80% do efetivo bovino nacional (Amancio et al., 2019). A raça Nelore, por sua vez, representa 90% do rebanho de zebuínos no Brasil. Bovinos da raça Nelore são adaptados ao clima tropical, pois, apresentam grande rusticidade, boa fertilidade e resistência a ecto- e endoparasitas, o que permite que se sobressaiam quando comparadas raças taurinas nestas condições (Viana et al., 2019). Por sua vez, raças taurinas, desde que em ambiente propício, apresentam vantagens frente a raças zebuínas, sobretudo, em aspectos produtivos, incluindo precocidade sexual, de acabamento de carcaça e deposição de gordura intramuscular, além de produzirem cortes mais macios e mais palatáveis (Andrade et al., 2010). Tais características, em ambas as subespécies, são de grande importância econômica, contudo, são consideradas características complexas, por serem em sua maioria de baixa herdabilidade e (ou) de difícil mensuração, o que pode indicar ação importante do meio na sua variação.

Nesse sentido, de forma eficiente, muito tem sido feito nos últimos anos com vistas a incrementar positivamente tais características na raça nelore (Castagnino et al., 2018). Na área de melhoramento genético tem sido incluído, por parte de programas, a informação de milhares de marcadores de DNA para auxiliar nas estimativas de valores genéticos e na seleção de reprodutores (Gordo et al., 2018). Com este mesmo intuito de melhorias das características supracitadas, muitas estratégias têm sido criadas e implementadas, nas áreas de reprodução, sanitária e nutricional (Castagnino et al., 2018).

Dentre algumas destas estratégias, está a desmama precoce de bezerros, a qual consiste, basicamente, em separar bezerros de até 180 dias de idade de suas

mães, visando, primariamente, a manutenção do escore de condição da vaca no pós-parto e a melhoria de índices reprodutivos do rebanho (Rasby.,2007). Contudo, aos bezerros submetidos a esse manejo, abre-se a possibilidade de receber uma dieta concentrada de maior valor nutricional, o que pode levar a adaptações metabólicas importantes e alterar o modo como o tecido muscular se desenvolve e como os lipídeos se depositam ao longo de sua vida, devido a indução da diferenciação de pré-adipócitos e células miosatélites, levando a maior adipogênese, lipogênese e crescimento muscular (Veland & Chen, 2017). Portanto, ao se adotar a desmama precoce, como já documentado em raças taurinas (Scheffler et al., 2014), há a oportunidade de modificar drasticamente o aporte de nutrientes, o que pode levar a melhorias na carcaça e na qualidade da carne, além de, se bem conduzido, diminuir o ciclo para o abate, isso, principalmente quando comparados aos que permanecem a pasto sob regime de desmama convencional (Moriel et al., 2014).

O conhecimento dos impactos da desmama precoce sobre o metabolismo de bezerros que são submetidos a esta técnica ainda é limitada ou, em zebuínos, inexistentes. Desse modo, conhecer a interação entre diferentes manejos nutricionais e adaptações metabólicas em zebuínos é importante para compreensão dos impactos dessas estratégias sobre característica complexas que tem impacto econômico significativos e para desvendar mecanismos de regulação que possa afetar a eficiência produtiva e qualidade dos cortes (Mota et al., 2022). Nesse sentido, a técnica de sequenciamento do conjunto total de RNAs expressos em uma célula ou tecido, comumente chamada de RNA-Seq, permite realizar a análise completa do transcriptoma, bem como, prospectar genes diferencialmente expressos (DE) entre diferentes tratamentos, condições ou momentos levando ao entendimento do impacto de como tais fatores podem ou não influenciar nos níveis de expressão de alguns genes (Naldurtiker et al., 2023).

Pelo explicitado acima e dada a falta de informação sobre alterações da expressão gênica em bezerros submetidos à desmama precoce na raça Nelore, bem como a relação destas alterações com adaptações metabólicas do músculo esquelético estriado, o objetivo desse estudo foi identificar diferenças na expressão de genes do tecido muscular esquelético de bezerros Nelore submetidos a desmama precoce.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e coleta de tecido muscular

O estudo foi conduzido na cidade de Cáceres no estado do Mato Grosso, em que foram selecionadas 20 vacas nelore com bezerros ao pé, de mesma idade e mesma ordem e mês de parto. Estas, foram separadas dos bezerros aos 120 dias, o quais, portanto, foram desmamados de maneira precoce (DP) em meio ao período de chuvas, em fevereiro de 2021.

Até os 120 dias os bezerros foram mantidos em braquiária junto às vacas, após a DP, estes foram realocados em piquete de tifton 85 e passaram a ser suplementados em cocho até os 205 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Suplementação e dietas baseadas em forragem natural, farelo de soja, milho, aditivos e minerais, oferecidos a bovinos nelore em diferentes fases de desenvolvimento e submetidos a diferentes protocolos de desmama.

Fases da criação	Dieta
Fase de Cria 1: Parto até os 120 dias	Aleitamento convencional em pasto de braquiária
Fase de Cria 2: 120 até 205 dias	Pastagem tifton 85 + ração concentrada (20% de PB ¹ ; 75% de NDT ²): 2g de MS*/kg de PV**

*MS = Matéria Seca; **PV = Peso vivo; ¹Proteína Bruta; ² Nutrientes Digestíveis Totais

Os pesos de todos os bezerros foram obtidos aos 120 e 205 dias de idade para cálculo do ganho de peso médio diário (GPMD).

Amostras do tecido muscular estriado esquelético foram obtidas de todos os bezerros, nos dias 120 e 205, por meio biópsias realizadas no músculo *Longissimus thoracis* entre as 12^a e 13^a costelas. Para isso, foi realizada tricotomização e a administração de anestésico local (cloridrato de lidocaína HCl, 20 mg/mL, 6 mL volume total) via subcutânea. Após higienizado o local, uma incisão de 1 centímetro foi feita com auxílio de bisturi, e obtido 1 grama de tecido *longissimus thoracis* com a agulha esterilizada de biópsia do tipo *Bergstrom* (Life Technologies, EUA). Após, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido por um minuto e dispostas em eppendorfs. Posteriormente foram armazenadas em ultrafreezer com temperatura de -80°C. Além

disso, a fim de evitar contaminações nos animais, a incisão foi lavada, fechada e aplicado spray antibiótico no local.

2.2 Extração de RNA total, preparação de bibliotecas e sequenciamento de mRNA

Dentre os 20 indivíduos do grupo, oito amostras foram selecionadas aleatoriamente para as análises moleculares. Para mensurar a expressão gênica antes e após a suplementação associada a desmama precoce, foram extraídos o RNA total de 16 alíquotas de músculo dos mesmo oito indivíduos, a saber, oito alíquotas de músculo coletados no momento da desmama precoce (120 dias) e oito de alíquotas de músculo coletados após a desmama precoce (205 dias).

2.3 Técnica de Extração de RNA

Para a avaliar as amostras de RNA total obtidas a partir do músculo bovino, elas foram submetidas eletroforese em gel de agarose a partir do equipamento Bioanalyzer®. Além disso, também foi aplicado PCR quantitativa, através do KAPA Library Quantification kit (KAPA Biosystems, EUA), com o objetivo de avaliar a quantidade (ng/µL) e qualidade (260/280 e 260/230) do RNA.

Para investigar os perfis de expressão gênica foram construídas 16 bibliotecas genômicas de cDNA a partir das amostras de RNA previamente extraídas dos oito indivíduos em dois momentos, aos 120 dias e aos 205 dias. As bibliotecas genômicas foram construídas segundo a orientação do fabricante, por enriquecimento de poli-A, utilizando o *kit TruSeq Stranded mRNA™* da Illumina® (Illumina,EUA). A 'clusterização' e o sequenciamento foram realizados por meio da plataforma *NextSeq 550™* da Illumina® com rendimento esperado de 200 milhões de *reads pair-end* utilizando kit de sequenciamento segundo instruções do fabricante (Illumina, EUA).

2.4 Alinhamento de sequências e obtenção de matriz de contagem

No laboratório de LGMA do Departamento de Nutrição e Melhoramento Animal da FMVZ -Unesp, Botucatu, foram realizados procedimentos computacionais

visando o alinhamento das sequências geradas (*reads*) ao genoma referência, bem como obtenção da matriz de contagem para análise de expressão gênica diferencial. Em suma, o controle de qualidade das *reads* (*.fastq) foram previamente realizadas utilizando o programa *FastQC* v.0.11.9 (Andrews, 2010) e analisadas individualmente. A partir dos resultados obtidos, parâmetros foram adotados para limpeza de *reads* por meio do programa *FastP* v.0.20.0 (Chen et al., 2018), em que foram cortados segmentos de insertos (*trimm*) ou excluídos totalmente devido à baixa qualidade de leitura de nucleotídeos (*Phred score* > 20), ao tamanho mínimo de insertos ≤ 25, além da remoção de adaptadores e indexes em e suas extremidades. Tudo isso, ignorando leituras e escores de qualidade de segmentos poli-G, característicos de *reads* nulas obtido pelo novo processo de detecção de fluorescência em dois canais das plataformas de sequenciamento *Illumina NextSeq*. Após controle de qualidade, as *reads* foram mapeadas ao genoma referência, o qual foi previamente indexado, utilizando o programa *STAR* v.2.7.3a (Dobin et al., 2013) e a montagem e anotação recentes do genoma bovino ARS-UCD1.2 (Rosen et al., 2018). As sequências mapeadas (*.bam) foram analisadas individualmente quanto a quantidade e percentagens de leituras *pair-end* alinhadas, não alinhadas e segmentos genômico mapeados (éxon, íntron e intergênico) utilizando o programa *QualiMap* v.2.2.1 (Garcia-Alcalde et al., 2012).

Após as sequências geradas (leituras *pair-end* alinhadas) foram contadas com relação a abundância destas mapeada por gene para gerar uma matriz de contagem (genes x amostras) utilizando o software *featureCount* v.2.0.3 (Liao, Smyth e Shi, 2014) e por fim, para controle de qualidade geral, baseadas em arquivos de saída gerados em cada etapa realizadas após o sequenciamento, um relatório foi gerado utilizando o pacote *MultiQC* v1.12 (Ewels et al., 2016).

2.5 Identificação de genes diferencialmente expressos

Para obtenção de genes diferencialmente expressos foi utilizado o pacote *edgeR* v.3.38.1 (Robinson et al., 2010) do programa *R* v.4.2.1 (R core team, 2021). Inicialmente, visando a normalização das contagens com base no tamanho total de suas bibliotecas, a expressão de genes foi considerada pela função logarítmica das contagens por milhão (CPM – *counts per million*) dada por $\log_2(\text{CPM})$. A partir disso,

foram removidos genes com baixa CPM conforme opção padrão do pacote *edgeR* e foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) apresentada em um eixo cartesiano de duas dimensões, com intuito de checar semelhanças e dissemelhanças entre as amostras com base em seus perfis de expressão gênica.

Os fatores de normalização foram calculados para cada amostra utilizando método de médias aparadas de valores M (TMM - *Trimmed Mean of M-values*) e o hiperparâmetro de dispersão da distribuição binomial negativa foi estimado utilizando o método *robust Empirical Bayes algorithm*. Após, foi ajustado um modelo linear generalizado assumindo uma distribuição binomial negativa com solução por Quasi-Verossimilhança. Os p valores foram obtidos pela razão de verossimilhança entre os modelos reduzido e completo para um cada gene, assumindo os valores de cada teste pertencentes a uma distribuição χ^2 . Posteriormente, os p valores foram ajustados pelo método de Benjamini-Hochberg para correção da taxa de falsos positivos (FDR – *False Discovery Rate*) por múltiplos testes. Por fim, por meio da função logarítmica $\log_2(\text{Fold Change} = \text{mean}(\text{CPM}_{M2})/\text{mean}(\text{CPM}_{M1}))$ da razão entre CPM dos momentos M2 e M1 foram obtidos a expressão relativa dada em $\log_2(\text{FC})$ para cada gene. Valores de $\log_2(\text{FC}) \leq 0,5$ ou $\geq 0,5$ e valores de p ajustado $< 0,05$ foram utilizados como limiar para detecção de genes diferencialmente expressos (GDE) entre os M2 e M1. Os termos referidos como “*upregulated*” (mais expresso) e “*downregulated*” (menos expresso) foram atribuídos para GDE do M2 em relação ao M1.

2.6 Enriquecimento de Termos Funcionais

O enriquecimento funcional de termos GO (*Gene Ontology*) e vias metabólicas KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) foi realizado utilizando os pacotes *enrichR* (Chen et al., 2013) e *clusterProfiler* v.4.4.4 (Wu et al., 2012; 2021) do programa *R* v.4.2.1 (R core team, 2021). O enriquecimento de processos biológicos (BP) e KEGG foram realizados por meio de análise de super-representação (ORA – *Over Representation Analysis*) utilizando teste hipergeométrico considerando nível alfa de significância de 5%. Foram consideradas as frequências de genes relacionados a um termo GO ou via KEGG presentes na lista GDE contra os presentes no universo de genes expressos não GDE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a tabela 2, foram mensurados o ganho de peso médio diário (GPMD) dos 20 animais no momento 2 (120 dias desmama precoce) e no momento 1 (205 dias desmama convencional) e foi possível observar que os animais ganharam em média cerca de 800g (gramas) diário, levando em consideração as fases de alimentação dos dois momentos segundo a tabela 1.

O efeito do estresse pós desmama não afetou negativamente o GPMD dos bezerros que foram desmamados no M2 se comparado com os pesos dos bezerros desmamados do M1, confirmando assim que de acordo com Orihuela et al. (2019), o efeito de estresse por muitas vezes pode contribuir para que os bezerros desmamados precocemente apresentem o GPMD igual, ou, mesmo, menos dos que mantidos em pasto e aleitamento, sendo assim, devido o GPMD dos bezerros do M2 estarem próximo ao encontrado para os bezerros do M1, não houve efeito sobre a taxa de crescimento proporcional semelhante de tecidos entre tais bezerros e as adaptações metabólicas relacionadas ao desenvolvimento e crescimento (Cavallin, 2022).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão para pesos dos animais aos 120 dias (desmama precoce) e aos 205 dias (desmama convencional); ganho de peso médio diário na fase de cria.

	Peso (Kg) 120 dias de idade	Peso (Kg) 205 dias de idade	Ganho de peso médio diário (Kg)
Bezerros DP (n=0)	123,50±11,65	189,89±13,24	0,785±0,130

Os parâmetros de qualidade do sequenciamento de acordo com a tabela 3 permitiu observar uma boa qualidade das leituras de bases, visto que o escore *Phred* foi ≥ 30 ($Q \geq 30$). Aproximadamente 94% dos nucleotídeos sequenciados, representaram em média 2,1 bilhões de bases por amostra, levando em consideração a porcentagem de GC de todas as bases e em todas as sequências, representados em 52,2% de regiões que codificaram um gene, visto que 94,2% de dados foram filtrados e cerca de 5,9% de adaptadores se ligaram em sequências comuns que foram utilizadas no processo de sequenciamento.

Tabela 3. Parâmetros de qualidade do sequenciamento

Sample Name	%>Q30	Mb Q30 bases	GC content	%PF	% Adapter
Sample 1 - M1	94,3%	1.970,00	52,5%	94,0%	6,9%
Sample 2 - M1	94,6%	2.142,80	52,2%	95,6%	6,2%
Sample 3 - M1	94,2%	1.974,80	52,3%	93,7%	5,8%
Sample 4 - M1	94,2%	1.895,80	52,8%	94,0%	6,4%
Sample 5 - M1	94,1%	1.793,10	52,4%	93,3%	6,3%
Sample 6 - M1	94,2%	1.943,90	52,9%	93,9%	5,7%
Sample 7 - M1	94,5%	2.127,20	51,7%	95,1%	6,1%
Sample 8 - M1	94,5%	2.073,00	52,1%	95,0%	4,8%
Sample 25 - M2	94,3%	2.284,60	51,6%	94,6%	5,9%
Sample 26 - M2	94,4%	2.485,50	52,4%	94,8%	5,2%
Sample 27 - M2	94,3%	2.052,30	51,9%	94,1%	6,4%
Sample 28 - M2	94,3%	2.329,30	51,5%	94,4%	5,9%
Sample 29 - M2	94,1%	2.002,10	52,2%	93,6%	4,7%
Sample 30 - M2	94,3%	2.161,40	51,7%	94,6%	4,9%
Sample 31 - M2	94,3%	2.210,30	52,0%	94,3%	6,3%
Sample 32 - M2	94,3%	2.246,00	52,4%	94,2%	7,0%
Média	94,3%	2.127,20	52,2%	94,2%	5,9%

A cobertura das amostras mapeadas (alinhadas) por amostra foi de média 9,9 milhões de leituras (*pair-end reads*), o que representou em média cerca de 88,40% das leituras submetidas ao alinhamento após o filtro de qualidade inicial de acordo com a tabela 4. Destas, 70% foram ancoradas em éxons, o que seria o limiar esperado para indicar uma boa qualidade de mapeamento e 7,90 mapearam em éxons.

Tabela 4. Cobertura de amostras mapeadas

Sample names	% de leituras <i>pair-end</i> mapeadas ¹	Mb de leituras <i>pair-end</i> mapeadas ¹	% de leituras mapeadas em éxons	Mb de leituras <i>pair-end</i> mapeada em éxons
Sample 1 - M1	88,8%	9,40	70,3%	7,55
Sample 2 - M1	91,6%	10,5	73,1%	8,50
Sample 3 - M1	88,2%	9,30	69,8%	7,50
Sample 4 - M1	88,4%	9,00	68,1%	7,05
Sample 5 - M1	87,9%	8,40	69,6%	6,80
Sample 6 - M1	88,5%	9,20	70,7%	7,45
Sample 7 - M1	89,9%	10,2	70,8%	8,20
Sample 8 - M1	89,7%	9,90	72,9%	8,20
Sample 25 - M2	89,3%	10,9	69,0%	8,55
Sample 26 - M2	89,3%	11,8	66,7%	9,00
Sample 27 - M2	87,9%	9,60	67,2%	7,50
Sample 28 - M2	88,4%	11,0	67,1%	8,50
Sample 29 - M2	87,3%	9,30	66,1%	7,20
Sample 30 - M2	89,2%	10,3	68,0%	8,00
Sample 31 - M2	88,2%	10,4	65,7%	7,90
Sample 32 - M2	88,3%	10,6	71,7%	8,85
Média	88,40%	9,90	69,00%	7,90

¹Mapeadas uma única vez em um único locus.

Foi possível observar uma semelhança dentre os indivíduos de grupos maiores em relação os indivíduos de grupos diferentes por meio da análise de PCA, utilizando mensurações da expressão de cada um dos genes, a qual foi dada em \log_2 CPM padronizado (Figura 1A), indicando assim que o perfil geral de expressão gênica foi diferente entre os dois momentos e comuns aos indivíduos em cada momento.

A análise de agrupamento apresentado na forma de heatmap referente a figura 1A, apresenta os indivíduos (n) que são agrupados com base nos níveis expressão comum dos 100 genes (m) mais expressos, uma vez que os genes são agrupados conforme o seu nível de expressão compartilhado entre as amostras, permitindo assim, observar o nível de expressão de cada gene, em cada amostra e em cada um dos momentos.

Na análise de expressão gênica diferencial foram encontrados ao total 14.076 genes (Figura 1B), o qual representou cerca de 50.04% dos genes anotados para espécie bovina, além de que 762 genes diferencialmente expressos (GDE) considerando os momentos ré e pós alteração da dieta no período de desama precoce. Destes, 405 passaram a ser mais expressos (*upregulated*) e 357 passaram a ser menos expresso (*downregulated*) após a desmama precoce (M2).

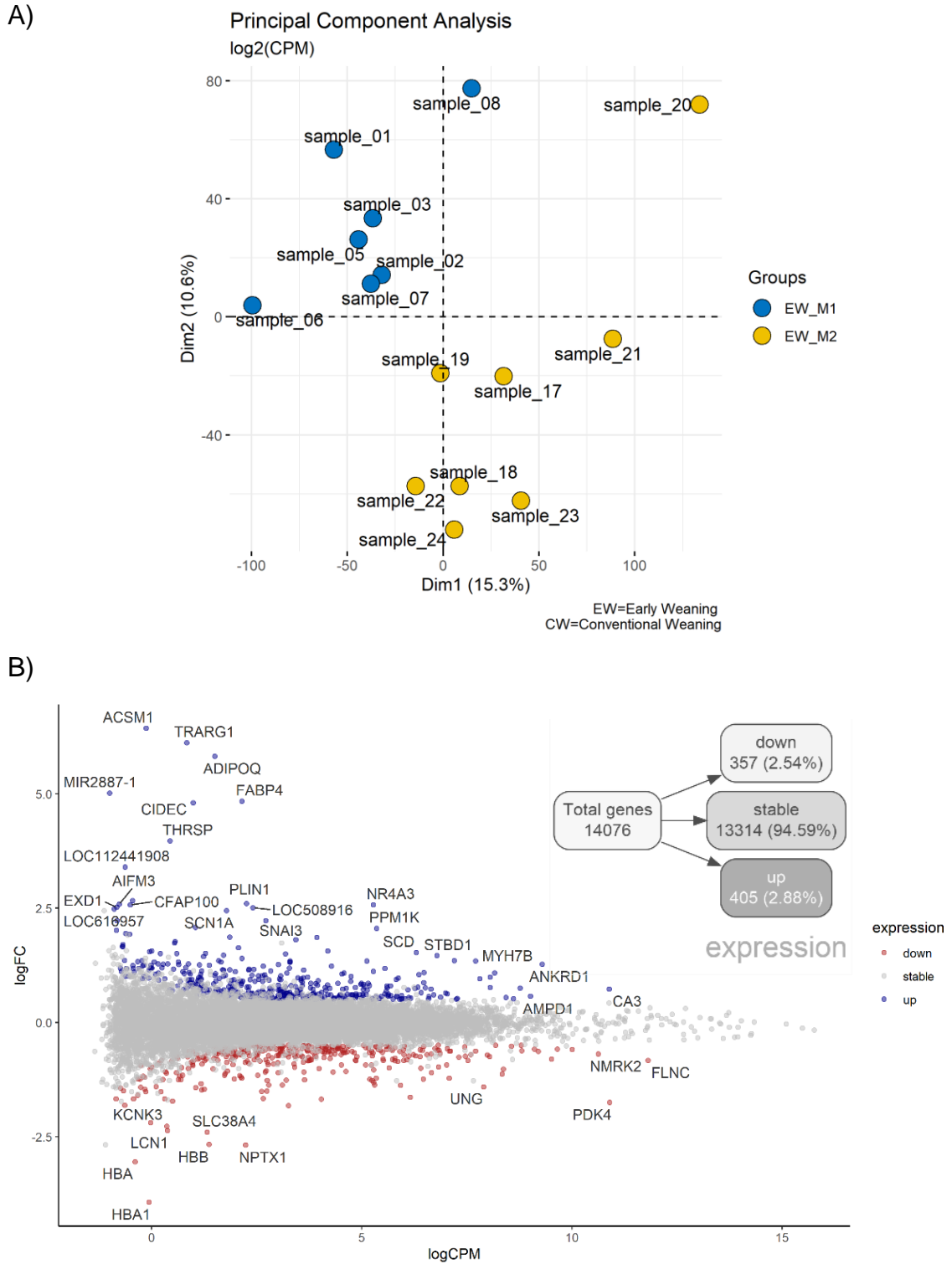


Figura 1. Coordenadas dos componentes principais PC1 e PC2 para cada amostra representados nos eixos x e y, respectivamente (A). *MDplot* em que são representados o log₂ de *Fold Change* (FC) no eixo y e a expressão média de cada gene no eixo x. GDE *upregulated* e GDE *downregulated* estão representados por pontos azuis e vermelhos, respectivamente.

Para melhor elucidar os papéis de cada um dos DEGs prospectados foi realizado a análise de enriquecimento funcional com base em termos GO de processos biológicos e vias metabólicas KEGG. Os resultados da análise funcional indicam um número considerável de DEGs que podem desempenhar papéis importantes no processo de lipogênese e adipogênese (Figuras 2 e 3, Anexos II e III, e apêndice S1 e S2).

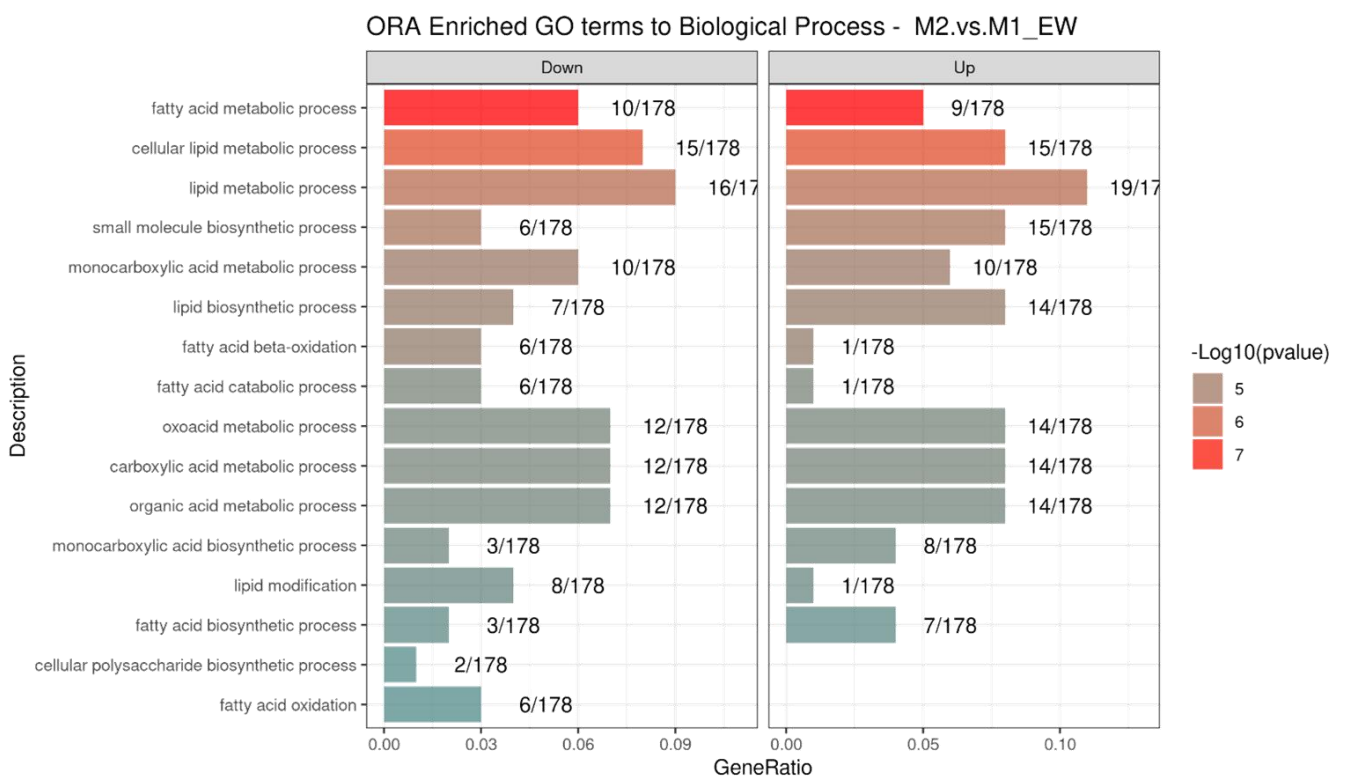


Figura 2. Enriquecimento funcional de termos GO relacionados aos processos biológicos por meio da análise de super-representação (ORA – *over representation analysis*) de genes mais expressos (*upregulated*) e genes menos expressos (*downregulated*) no momento 2.

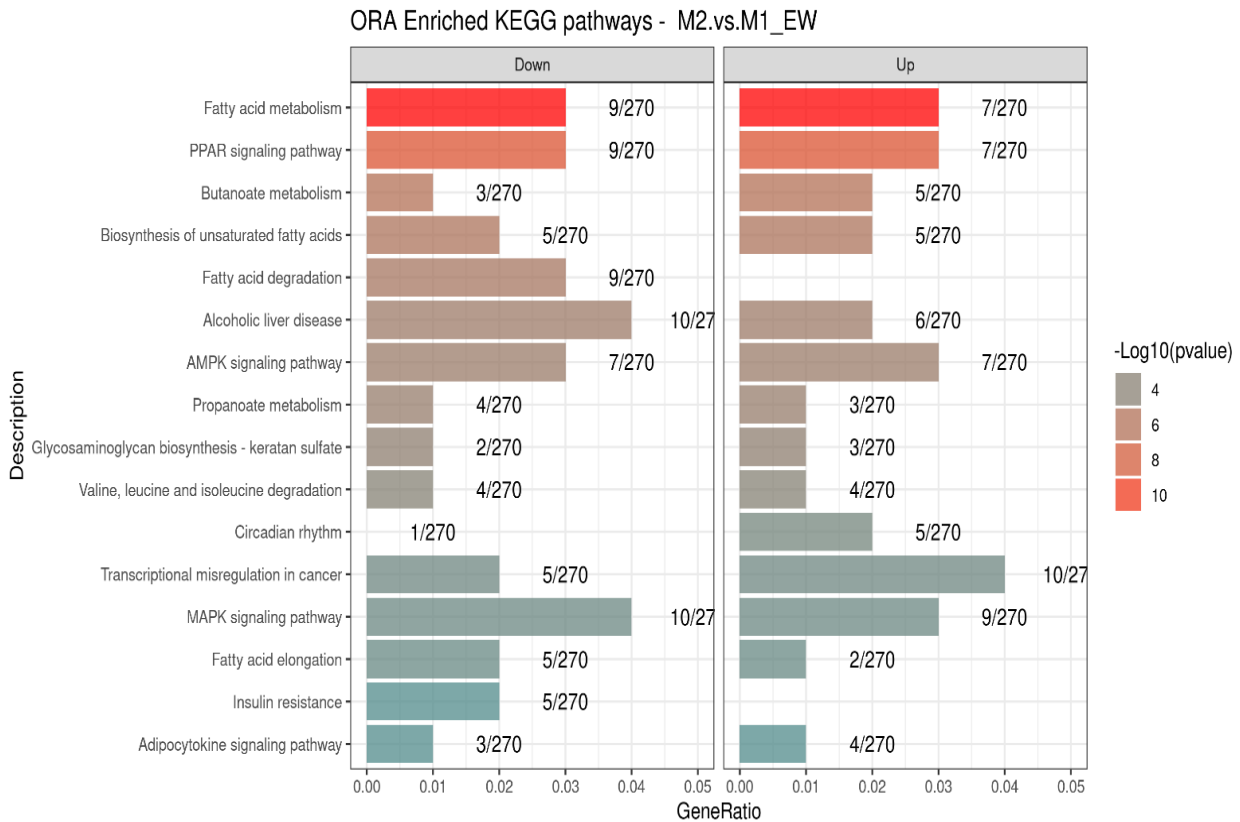


Figura 3. Enriquecimento funcional de termos GO relacionados aos processos biológicos e vias metabólicas KEGG por meio da análise de super-representação (ORA – over representation analysis) de genes mais expressos (up regulated) e genes menos expressos (down regulated) no momento 2, considerando a significância do valor p ajustado menos que <0.05 por Benjamini-Hochberg.

Na Figura 4 é possível observar a participação dos DEGs em relação as vias metabólicas enriquecidas e processos biológicos, permitindo assim identificar as diferenças de expressão gênica entre os tratamentos.

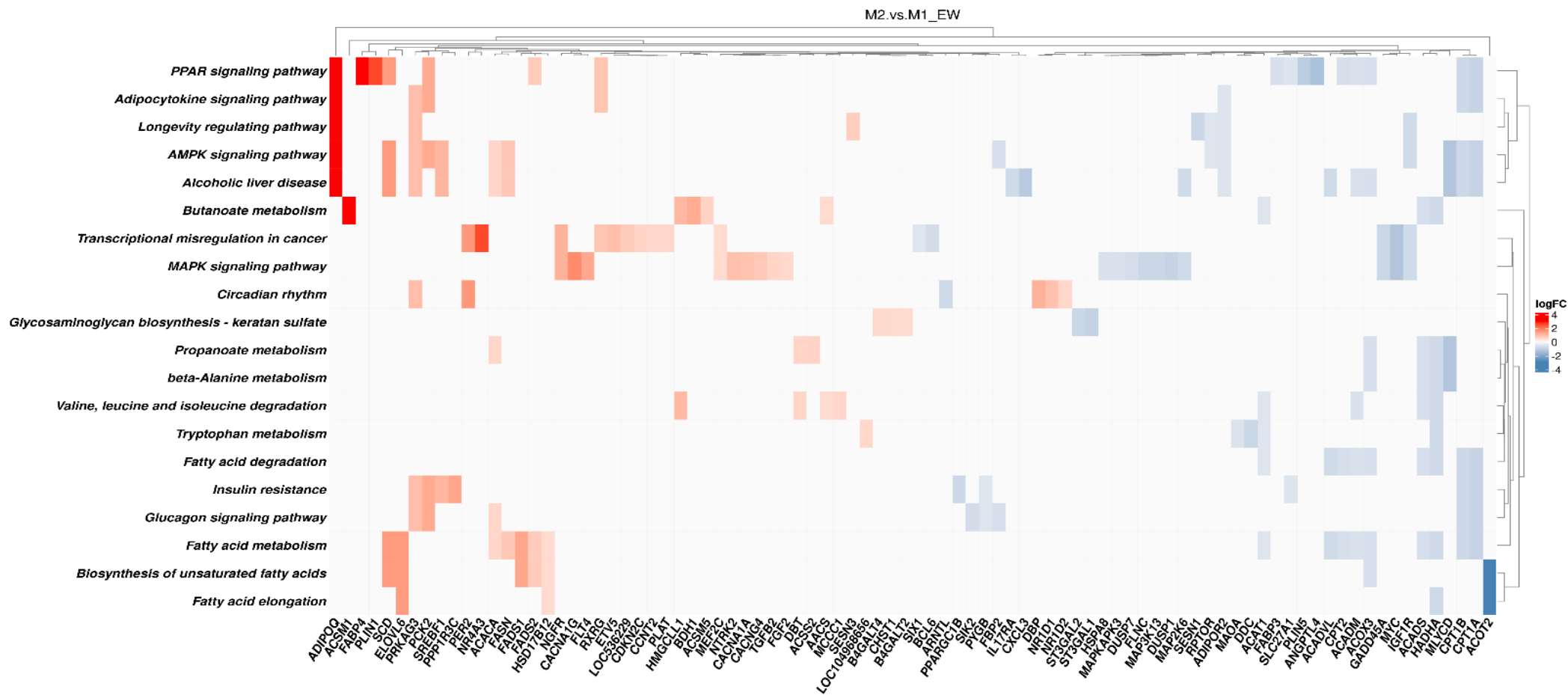


Figura 4. Relação entre DEGs reguladas em up-regulated e down-regulated identificados no M2 do desmame (eixo x) e os processos e vias metabólicas enriquecidas do conteúdo de gordura intramuscular em bovinos (eixo y). Na figura, ao lado direito encontra-se a escala de cores que indica a alteração de log2 foldChang

Na figura 5 observa-se a rede de DEGs abrangendo processos biológicos (GO) e as vias de KEGG (pathways) compartilhados entre as DEGs *up-regulated* e *down-regulated* no M2 (desmama precoce) que apresentam um potencial de relação com os processos de adipogênese e lipogênese em bezerros de corte.

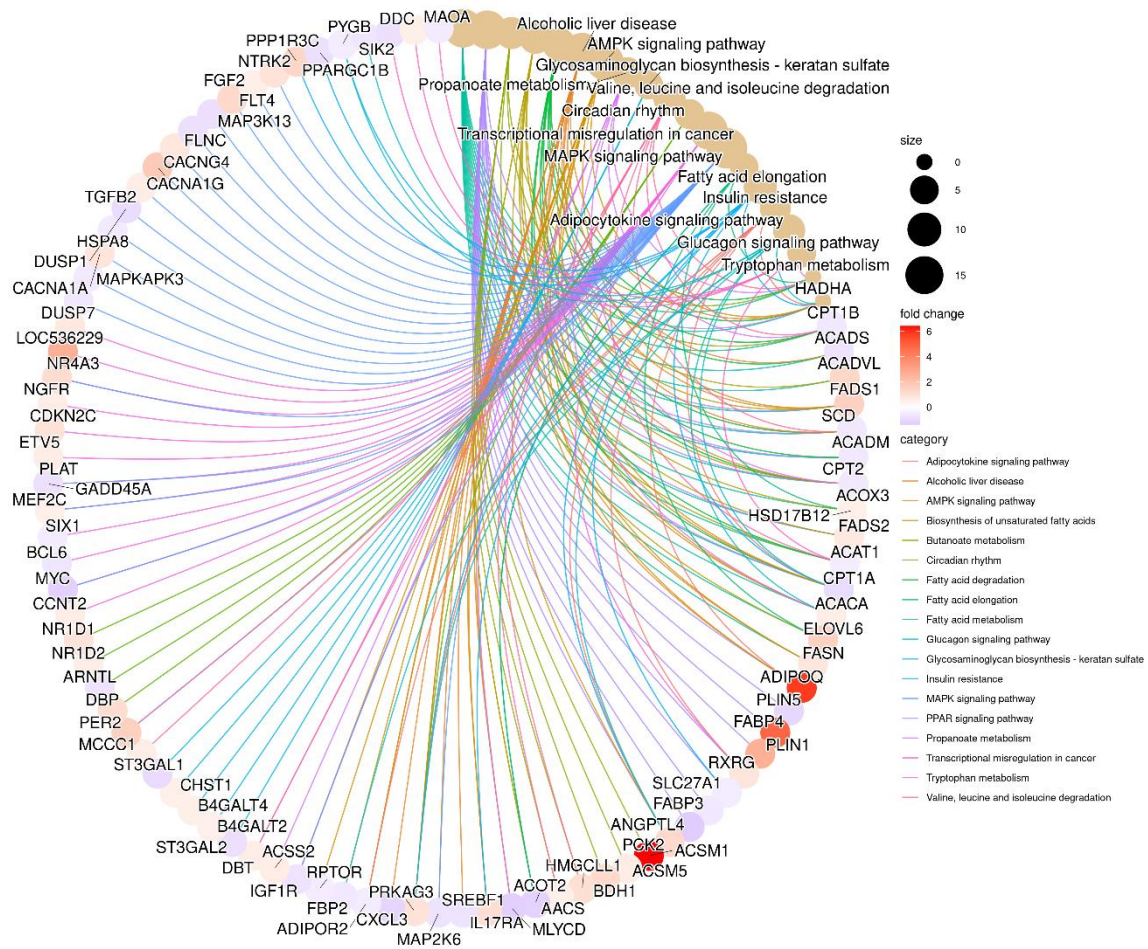


Figura 5. Rede de DEGs compartilhados no entre os processos biológicos e as vias KEGG, que se destacaram no ORA. Os genes diferencialmente expressos são enriquecidos em vias de sinalização, como a vida de sinalização AMPK, a via de sinalização Wnt e a via de sinalização PPAR, que apresentam relação ao metabolismo de lipídeos.

Os genes diferencialmente expressos (GDE) descritos na tabela 5 relacionam-se como top 18 de genes identificados *up-regulated* em relação ao M2 (desmama precoce).

Tabela 5. Genes diferencialmente expressos (GDE) presentes em vias metabólicas enriquecidas.

Gene ID	Log ₂ (FC ¹)	Log ₂ (CPM ²)	FDR ³	
<i>ADIPOQ</i>	5.824	1.503	3.088542e-08	<i>Up</i>
<i>FABP4</i>	4.839	2.152	8.370848e-08	<i>Up</i>
<i>SCD</i>	1.526	6.296	1.349963e-07	<i>up</i>
<i>ACSM1</i>	6.438	-0.132	1.506718e-07	<i>up</i>
<i>ELOVL6</i>	1.509	1.284	2.905058e-03	<i>up</i>
<i>HSD17B12</i>	0.512	4.060	2.405911e-03	<i>up</i>
<i>PCK2</i>	1.262	0.649	1.449268e-02	<i>up</i>
<i>PER2</i>	1.559	4.197	1.851184e-12	<i>up</i>
<i>SREBF1</i>	1.089	6.483	7.073428e-08	<i>up</i>
<i>FBP1</i>	2.224	-0.819	3.751837e-02	<i>up</i>
<i>NR4A3</i>	2.570	5.275	1.123268e-02	<i>up</i>
<i>PRKAG3</i>	0.967	5.869	2.572946e-03	<i>up</i>
<i>ACACA</i>	0.583	3.876	4.050270e-03	<i>up</i>
<i>FASN</i>	0.805	5.187	2.038643e-02	<i>up</i>
<i>COL4A3</i>	1.251	1.379	5.969485e-03	<i>up</i>
<i>ADCY1</i>	1.177	-0.595	3.542252e-02	<i>up</i>
<i>FADS1</i>	533107	3.28918	4.245286e-09	<i>up</i>
<i>FADS2</i>	0.742	4.240	1.470341e-03	<i>up</i>

¹Fold-Change; ²Counts Per Million; ³Valor de p ajustado por False Discovery Rate (FDR).

Através da análise de enriquecimento funcional dos DEGs, foram selecionados aleatoriamente 18 up-regulated dentre eles genes, enzimas e receptores identificados com maior relevância e com atuação no metabolismo energético de lipídeos e de ácidos graxos, sendo *ADIPOQ*, *FABP4*, *FADS1*, *FADS2*, *SCD*, *ACSM1*, *ELOVL6*, *HSD17B12*, *PCK2*, *PER2*, *SREBF1*, *FBP1*, *NR4A3*, *PRKAG3*, *ACACA*, *FASN*, *COL4A3* e *ADCY1* (Figuras 3, 4 e 5; Tabela 5; Apêndice S1 e S2).

De acordo com figura 4 e 5 é possível identificar algumas vias de sinalização que apresentaram relação com as vias metabólicas lipídicas as quais foram enriquecidas no metabolismo energético dos tecidos hepático, muscular e adiposo. As vias de sinalização PPAR tem uma forte relação com as regulações das atividades adipogênicas e lipogênicas no tecido adiposo e conseqüentemente no músculo. Como encontrado no presente estudo, os genes *ADIPOQ*, *FABP4*, *PLIN1*, *FASN*, *SCD* e *ELOVL6* foram regulados em suas expressões positivamente no processo de lipogênese em bezerros desmamados precocemente (M2) (Figura 4 e 5).

Um dos reguladores centrais da atividade dos adipócitos é o PPAR (gama), apresentam uma função específica ao regular a expressão de genes adipogênicos durante o desenvolvimento do animal, plasticidade do tecido adiposo, secreção de adipocitocinas e homeostase energética (Han L; Bittner; Kraemer e Azhar S.,2017). Além disso, a atividade de adipogênese está diretamente relacionada com alta atividade de adiponectina, da sensibilidade de insulina, dos níveis de reservas de ácidos graxos e lipogênese, ante uma queda brusca da atividade de TNF- α .

Nesse experimento, dois dos genes mais diferencialmente expressos após a desmama precoce foram o *FABP4* (transportador de ácido graxo 4) e o *ADIPOQ* (adiponectina), este último importante membro da família das adipocitocinas. Ambos são integrantes da via de sinalização PPAR e são amplamente estudados quanto a distúrbios metabólicos e obesidade (Raposo, 2020).

A isoforma *FABP4* é expresso principalmente no tecido adiposo e são ativados por receptores transmembranas com afinidade por moléculas lipoproteicas. O nível de expressão deste gene tem sido utilizado como marcador de diferenciação de células mesenquimais em pré-adipócito e de atividade lipogênica (Choi, Devis e Chung, 2015).

O *FABP4* atua na modificação de receptores PPAR para o heterodímero PPAR-RXR ativo ao apresentar moléculas efetoras como eicosanoides, AG insaturados que desenvolvem importante papel na adipogênese (Shan T e Kuang S,2013). Por sua vez, a *ADIPOQ* tem atividade sistêmica e é secretado pelo tecido adiposo branco em resposta a alterações nos níveis de energia consumido, o aumento dos níveis de adiponectina é um dos principais mediadores dos efeitos sistêmicos da ativação do PPAR γ . Em uma análise de dados de animais em associações entre características de carcaça e variantes genéticas em regiões genômicas de *ADIPOQ*, foi localizada a sua presença no músculo esquelético, indicando que a proteína está

relacionada a regulação do metabolismo de lipídios e carboidratos, uma vez que influencia no peso e no rendimento de carcaça em bovinos (Morsci et al., 2006).

O estudo realizado por Graugnard et al. (2010), com bovinos da raça Angus desmamados precocemente, foi identificado que animais alimentados por uma dieta rica em fibras durante a fase de crescimento apresentaram um aumento significativo na expressão de genes *DGAT2*, *ACSM1*, *FABP4*, *SCD*, *THRSP* e da via de sinalização PPAR γ durante a fase de terminação, no entanto a regulação crescente do *MLXIPL* e de *SREBF1* no presente estudo, é justificado pelo alto teor de amido na alimentação dos animais em uma idade precoce, sugerindo assim um imprinting metabólico.

Outro importante gene é o *PLIN1* (pirilipina), o qual é expresso nos adipócitos e que regula a síntese de triglicerídeo a fim de viabilizar a formação de grandes gotículas lipídicas, por meio da inibição da hidrólise de triglicerídeos nos adipócitos (Shijun et al., 2020). Este gene atua regulando a atividade da lipase sensível a hormônios (HSL), a qual medeia a hidrólise do triacilglicerol, a principal forma de energia armazenada no corpo. Segundo Martinez et al (2000) a depleção da atividade de *PLIN1* em camundongos levou indivíduos a apresentar fenótipos mais magros e mais musculares do que os controles, com adipócitos brancos 62% menores, e lipólise basal e, também, a resistência à obesidade induzida pela dieta.

Segundo Raza et al. (2020) em seu estudo sobre polimorfismo do gene *PLIN1* e a sua relação com as características corporais e de carcaça do gado Qinchun, foi identificado um alto nível de expressão do gene *PLIN1* no músculo longíssimo, na gordura subcutânea e no coração e um menor nível presente nos rins, concluindo que existem variantes que podem ser mapeadas no gene e que pode ser usado como marcador para as características corporais e para a qualidade de carcaça. Além disso, os genes, *FADS2*, *PCK2* e *SCD1*, também são regulados pela atividade de PPAR, passaram a ser mais expresso após a desmama precoce (Figuras 4 e 5; Apêndice S2 e S3).

De acordo com Matsumoto et al. (2014), em seu estudo sobre variantes genéticas nas regiões promotoras dos genes *FADS2* e *FABP4* e suas relações com a qualidade da carne bovina, a expressão dos genes *FADS2* e *FABP4* na via do metabolismo de lipídeos influenciou na ligação dos fatores de transcrição alterando características relacionadas a gordura. Os *FADS1* e *FADS2* podem codificar as enzimas Δ -5 e Δ -6 dessaturase, que são enzimas limitantes de velocidade na síntese

de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (PUFAs), por tanto os genes *FADS1* e *FADS2* adicionam ligações duplas nas posições Δ -5 e Δ -6 (PUFAs) (Ibeagha-Awemu et al., 2014), sendo assim, a expressão dos genes respectivamente nos bezerros desmamados precocemente (M2) pode ser justificada pela influência da alimentação rica em concentrado na fase inicial de vida.

Na presente pesquisa os bezerros alimentados com um nível de concentrado nos primeiros meses de vida (desmama precoce/M2), apresentaram uma regulação positiva na expressão do gene fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica (*PCK1*), fosfoenolpiruvato carboxiquinase mitocondrial (*PCK2*) e o piruvato carboxilase (*PC*), uma vez que a via gliconeogênica que é originada do propionato e atua como percursos para gerar glicose (Zhan et al., 2020), visto que, a ingestão da suplementação de concentrado pode permitir um maior aporte energético e de glicose circulante no sangue dos animais.

De acordo com Vadder (2014), a *PCK2* tem um papel crítico na conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato nas mitocôndrias, uma vez que a fosfoenolpiruvato carboxiquinase citosólica é encarregada em converter o oxaloacetato em fosfoenolpiruvato como parte da gliconeogênese no citosol, devido o oxaloacetato não conseguir atravessar diretamente a mitocôndria para o citosol e o propionato que pode provoca a expressão de genes envolvidos na gliconeogênese via eixo intestino e cérebro a fim de promover benefícios na homeostase energética e no metabolismo do controle da glicose.

O gene acetil-CoA carboxilase α (*ACACA*) e o gene da sintase de ácido graxo (*FASN*) estão localizados no cromossomo 19 e segundo Ladeira et al. (2016) o gene *ACACA* é responsável em codificar a enzima acetil-CoA-carboxilase, que realiza a carboxilação do acetil-CoA para produzir a malonil-CoA, um substrato para a ação do complexo multienzimático ácido graxo sintase codificado pelo gene *FASN*, sendo assim, o resultado faz com que a síntese de SFAs com C16:0 seja o produto final, uma vez que o C16:0 pode ser convertido em ácido graxos insaturados via ação da esteroil-CoA dessaturase, que é codificada pelo gene *SCD1* ou sofre alongamento.

De acordo com Bartoñ et al. (2021), em sua pesquisa dá um prenúncio que os diferentes tecidos e as principais expressões lipogênicas pode ter contribuído para as diferenças entre os tecidos na composição de ácidos graxos, devido os níveis de mRNAs de *ACACA* e *FASN* terem sido elevados e refletidos em maiores proporções no C14:0 e C16:0, que são os produtos finais das ações das enzimas *ACACA* e *FASN*.

Nesta pesquisa foi possível observar resultados similares ao estudo realizado por Bartoñ e seus colaboradores, confirmando assim que os genes *ACACA* e *FASN* participam de processos lipogênicos (Figuras 4 e 5; Apêndice S2 e S3).

O gene adenilil ciclase (*ADCY1*) é ligada a membrana e faz parte das principais famílias de enzimas efetoras para receptores acoplados à proteína G, além de ser um membro da família de enzimas que catalisam a formação de cAMP (Ludwig e Seuwen et al., 2002). Em mamíferos o gene *ADCY1* possui nove isoformas transmembrana, denominadas de AC1-9 e exibem diferentes padrões de expressão nos tecidos, dando o potencial de uma ampla gama de funções fisiológicas.

De acordo com Ostrom et al. (2022), as células expressam múltiplas isoformas de adenilil ciclase e todas transmembrana são ativadas por proteínas acopladoras, sendo assim as isoformas além de participarem em diferentes microdomínios da membrana plasmática, formam complexos de sinalização específicos que contribuem para os compartimentos de sinalização de cAMP. A expressão up-regulated do gene *ADCY1* em relação ao tratamento com os animais desmamados precocemente (M2) no presente estudo pode ser justificada pela influência do consumo de concentrado nessa fase (Tabela 1), uma vez que a catalisação a conversão de ATP em cAMP, um cofator importante na homeostase energética é realizado por esse gene (Abdel-Halim et al.,2020).

O gene da subunidade γ 3 ativada por adenosina monofosfato de proteína quinase (*PRKAG3*) codifica uma isoforma específica do músculo que é reguladora da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina, a mesma tem como principal papel funcional regular a homeostase energética em eucariotos, uma vez que as mutações decorrentes do gene *PRKAG3* irá permitir o aumento do teor glicogênico no músculo esquelético (Yu et al., 2005). Yu et al. (2005) no mesmo foi constatado que o gene *PRKAG3* em *Bos taurus* foi expresso somente no tecido muscular esquelético, ressaltando que o gene pode estar envolvido em características de qualidade da carne e em doenças musculares.

A expressão do gene *PRKAG3* em tecido muscular foi comparado em duas raças bovinas italianas, a fim de identificar diferenças significativas em relação a maciez da carne e foi possível concluir que o armazenamento deficiente de glicogênio no músculo pode afetar os níveis de expressão do gene (Bongiorni et al.,2016). No presente estudo foi possível verificar uma regulação positiva do gene *PRKAG3* em músculo esquelético de bezerros desmamados precocemente que foram

suplementados com concentrado, e, portanto, pode-se assumir que a dieta colaborou para a expressão do mesmo, uma vez que pode influenciar no armazenamento de glicogênico, visto que o seu conteúdo pode afetar o nível de pH final da carcaça, processos de maturação e com efeito na maciez da carne.

Membro 1 da família de cadeia média de acil-CoA sintetase, o gene *ACSM1* é necessário para a utilização do ácido lipóico, que é decorrente de uma via de recuperação e um mecanismo de lipoilação não reconhecido (Paredes et al., 2018). Segundo Prasad et al. (1998), a síntese de ácido lipóico e os mecanismos de lipoilação são pouco compreendidos em mamíferos, contudo existem duas propostas de vias de atuação.

A primeira proposta é de que a via do ácido lipóico a partir de uma proteína transportadora octanoil-acil fornecida pela via de síntese de ácidos graxos é sintetizado na mitocôndria, sendo que a porção de octanoil é acesa a enzimas dependentes de lipoato pela ligase LIPT2 que posteriormente, a enzima LIAS contendo cluster [Fe-S] é catalisada a inserção mediada por radicais com dois átomos de enxofre nas posições C-6 e C-8 da porção octanoil ligada a lipoil de enzimas dependentes de lipoato (Prasad et al., 1998).

Wang et al. (1999), ressalta em seu estudo que a segunda proposta que pode ocorrer com a via do ácido lipóico, e de que a via de resgate que usa o lipoato exógeno captado via transportador multivitamínico dependente de sódio. Contudo, segundo Paredes et al. (2018), a eliminação exógena do ácido lipóico é ativado pela adição de AMP e transportado por enzimas com lipoato.

Neste estudo o gene *ACSM1* apresentou uma regulação positiva em animais desmamados precocemente (M2), deve-se isso devido o mesmo participar de processos de síntese e esterificação de ácidos graxos, acredita-se que a dieta de concentrado teve relação com a sua expressão uma vez que gene participa do metabolismo de lipídios e de glicose (Yang et al., 2019).

Segundo Nikolaou e Constantino (2022), o gene que codifica o colágeno IV: *COL4A3*, *COL4A5* e *COL45* é relatado que as mutações nos genes autossômicos *COL4A3* e *COL4A4* são responsáveis pelos casos com herança autossômica recessiva, visto que foi observado que o gene *COL4A4* em camundongo é caracterizado pela redução do peso corporal começando após 2 meses de vida.

De acordo com Courbon et al. (2021), em seu estudo sobre a estimulação da lipocalina para o fator de crescimento de fibroblastos ósseos, menciona que a

expressão do gene *COL4A3* ocasionou a diminuição do ferro circulante no sangue, bem como o número de glóbulos vermelhos, hemoglobina, ferritina e o volume corpuscular médio com o desenvolvimento de anemia microcíta em camundongos. Todavia, foi observado em um outro grupo de camundongos a presença de *LCN2* em *COL4A3*, corrigindo parcialmente os níveis de ferro circulante e conseqüentemente contribuindo para o metabolismo desordenado do ferro. A regulação positiva da expressão do gene *COL4A3* no presente estudo permitiu acreditar que a sua expressão positiva pode ter contribuído para o metabolismo do ferro, mantendo o funcionamento do organismo equilibrado. Contudo, é necessários novos estudos a fim de compreender os mecanismos e vias que o gene *COL4A3* participa em bezerros de corte.

Pertencente a super-família da hidroxisteróide (17) desidrogenase, o gene 17-beta-hidroxisteróide desidrogenase tipo 12 (*HSD17B12*) tem como principal objetivo codificar uma enzima multifuncional a qual está envolvida no processo de prolongamento do ácido graxo de cadeia longa, na síntese do ácido araquidônico e na conversão do ácido palmítico em ácido araquidônico, sendo assim a enzima está envolvida no metabolismo lipídico, bem como na síntese de esteroides (Karisa et al.,2013). Entretanto, existem poucos estudos investigando a atuação e processos que o gene participa, principalmente em ruminantes. Acredita-se que a regulação positiva do gene se deve ao prolongamento de ácido graxo influenciado pela dieta que os animais consumiram no M2.

Conhecido como o gene central do relógio circadiano, o regulador do período circadiano 2 (*PER2*), desempenha um papel fundamental no metabolismo de lipídeos (Jing et al., 2021). Em um estudo realizado por Grimaldi et al. (2010) com ratos, foi relatado que o gene *PER2* realizou o controle do metabolismo lipídico através da expressão do gene *PPARG*, entretanto o gene *PER2* em bovinos pode representar um novo ponto de controle, visto que compartilha diferentes ligações moleculares com os osciladores do ciclo celular.

De acordo com Osório et al. (2016), a expressão do gene *SRBF1* e *PPARG* pode regular a síntese de lipídios, atuando com vários sinais moleculares e resultando a ativação em processos de adipogênese e lipogênese através dos genes *PPARG* e *SREBF1* (Zhang et al.,2014).

Dentre os genes enriquecidos positivamente três enzimas se destacaram nesse processo, sendo elas: *ELOVL6*, *PEPCK* e *FBP1* que participam do metabolismo

de lipídios. A enzima *ELOVL6* em mamíferos tem a função de catalisar o alongamento de MUFA e SFA que contém 12, 14 e 16 átomos de carbono e são os principais reguladores da composição geral dos ácidos graxos, atuando na diminuição de ácido oleico ou aumento de palmitato (C16:0) (Junjvlieke et al., 2020). De acordo Mei (2017), a análise genômica e de transcriptoma em seu estudo mostra que a enzima *ELOVL6* afeta a qualidade da carne bovina, principalmente em relação ao teor de gordura intramuscular e marmoreio. Contudo, esse estudo permite compreender que a expressão da enzima na fase em que os animais se encontram pode colaborar positivamente para uma relação com o fenótipo de marmoreio na fase final de vida dos animais.

Segundo Du et al. (2022), o estudo sobre funções gênicas relacionadas a deposição de gordura em bovinos tornou-se um foco em sua pesquisa, uma vez que foi identificado 11 genes candidatos que afetam a deposição de gordura e que impacta na síntese, metabolismo e oxidação de ácidos graxos, incluindo os genes do metabolismo de cetoácidos (*ACADSB* e *OCXT1*), genes de síntese de ácidos graxos (*ELOVL6*, *SCD* e *ACACA*), genes de oxidação de ácidos graxos (*EHHADH* e *CPT2*) e genes de transporte de ácidos graxos (*FABP7* e *CHPT1*), que tem relação com a via de sinalização PPAR, confirmando assim a sua importância na deposição de gordura, confirmando assim a sua relação com a presente pesquisa (Figura 4 e 5).

A enzima gliconeogênica, fosfoenolpiruvato carboxicinase (*PEPCK*) atua na síntese de aminoácidos, cataplerose e gliceroneogênese, sendo que existe dois genes que codificam a isoforma de *PEPCK*, a *PCK1* que codifica para *PEPCK* citosólica e a *PCK2* que codifica para *PEPCK-M* que é regulador no metabolismo de células cancerígenas e está associado ao metabolismo energético. Sendo assim, a expressão do gene em regulação positiva confirma mais uma vez que a dieta consumida pelos animais no M2 influenciou em sua expressão, uma vez que o mesmo está envolvido em processos do metabolismo de energia.

A enzima frutose-1,6-bisfosfatase (*FBP1*) é reguladora da gliconeogênese que catalisa a hidrólise da frutose-1,6-bifosfato para gerar fosfato inorgânico e frutose-6-fosfato (Guo et al.,2007). Segundo Divari et al. (2020) em seu estudo sobre a influência na deposição de glicogênio e a expressão gênica no fígado em bovinos, foi possível identificar que a transcrição dos genes *PCK1*, *PC*, *FBP1*, *PFKFB1* e *G6PC* é estimulada por glicocorticoides, sendo que no fígado, a regulação das modificações pós-traducionais ocorre pela atividade do gene *GYS2*, que é fosforilado e inativado

pela proteína quinase A e GSK3B, sendo assim o gene GSK3B controla a expressão de genes gliconeogênicos. No mesmo estudo realizado por Divari et al. (2020), os genes *PC*, *PCK1* e *FBP1* tiveram o efeito up-regulation, um efeito que é esperado, uma vez que o aumento na deposição de glicogênio e gliconeogênese no fígado ocorre.

O receptor NR4A3 apresentou regulação positiva em relação aos bezerros que foram desmamados precocemente (M2). Pertencente a subfamília do gene *NR4A* da superfamília de receptores hormonais nucleares consiste em *NR4A3/NOR1* em conjunto com *NR4A1/Nur77* e *NR4A2/Nurr1*, que são moléculas reconhecidas como receptores órfãos que induzem os fatores de transcrição constitutivamente ativos, com base na estrutura tridimensional identificada do domínio de ligação ao ligante de *NR4A2* (Nagaoka et al., 2017).

Zhao et al. (2010), ressalta que uma das funções do receptor *NR4A3* tem relação direta com células hematopoiéticas específicas e com as células que apresentam linhagem de monócitos, apesar do receptor *NR4A3* ser expresso em diferentes tipos de células. Terashima et al. (2021) relata mais uma função importante do gene receptor com relação funcional ao processo de liberação do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), após a realização da avaliação de gonodrosos hipofisários em relação a expressão do hormônio folículo estimulante.

A expressão positiva da regulação do receptor em bezerros desmamados precocemente estudados em questão, evidencia que o mesmo é necessário para a homeostase da glicose em todo o corpo, uma vez que a diminuição da expressão de *NR4A3* predispõe os animais a intolerância à glicose e obesidade quando alimentados com alto teor de gordura (Yang et al., 2020).

4. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que o manejo do desmame precoce aos 120 dias de idade em bezerros da raça Nelore, suplementados com concentrado pode levar a alterações em níveis de expressão gênica, bem como processos biológicos e vias metabólicas enriquecidas associados a atividade de adipogênese e lipogênese. Foram identificados genes diferencialmente expressos com regulação positiva que desempenham papel chave na regulação do metabolismo lipídico contribuindo em vias de sinalização PPAR e AMPK. Desse modo,

a suplementação com concentrado em bezerros que foram desmamados precocemente parece afetar a atividade do tecido adiposo intramuscular abrindo possibilidade de alterações na deposição de gordura intramuscular, composição de carcaça e qualidade da carne de indivíduos adultos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HALIM, Samy M. et al. Increased plasma levels of adenylate cyclase 8 and cAMP are associated with obesity and type 2 diabetes: results from a cross-sectional study. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 244, 2020.

ALFORMA, Antónia Mendes Paizano et al. Influence of weaning management at 30, 75 and 180 days of age on non-esterified fatty acids and reproductive performance in beef cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2022.

ANDREWS, S. (2010). **FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]**. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

BARTOŇ, L. et al. Tissue-specific fatty acid composition, cellularity, and gene expression in diverse cattle breeds. **Animal**, v. 15, n. 1, p. 100025, 2021.

BATISTELLI, Juliana Carla de Oliveira Rodrigues et al. Estimativas de rastreabilidade e certificação da carne bovina no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e4111427079-e4111427079, 2022.

BONGIORNI, S. et al. Transcriptomic investigation of meat tenderness in two Italian cattle breeds. **Animal genetics**, v. 47, n. 3, p. 273-287, 2016.

Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **Bioinformatics** **14**, 128 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128>.

CHOI, Yoonjeong; DAVIS, Michael E.; CHUNG, Hoyoung. Effects of genetic variants in the promoter region of the bovine adiponectin (ADIPOQ) gene on marbling of Hanwoo beef cattle. **Meat science**, v. 105, p. 57-62, 2015.

COURBON, Guillaume et al. Lipocalin 2 stimulates bone fibroblast growth factor 23 production in chronic kidney disease. **Bone research**, v. 9, n. 1, p. 35, 2021.

DEL CORVO, Marcello et al. Methylome patterns of cattle adaptation to heat stress. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 633132, 2021.

DIVARI, S. et al. Dexamethasone and prednisolone treatment in beef cattle: influence on glycogen deposition and gene expression in the liver. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 72, p. 106444, 2020.

DOBIN A, DAVIS CA et al. **STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner**. *Bioinformatics*. 2013 Jan 1;29(1):15-21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23104886; PMCID: PMC3530905.

DU, Lili et al. Transcriptomics and Lipid Metabolomics Analysis of Subcutaneous, Visceral, and Abdominal Adipose Tissues of Beef Cattle. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 37, 2022.

Elgersma, A.: Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: a review of the contributing factors, challenges and future perspectives, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 117, 1345–1369. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400469>, 2015.

EWELS P, MAGNUSSON M, LUNDIN S, KÄLLER M. **MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report**. *Bioinformatics*. 2016 Oct 1;32(19):3047-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27312411; PMCID: PMC5039924.

FERRINHO, Adrielle Matias. **Expressão de genes envolvidos no perfil de ácidos graxos e proteólise post mortem de bovinos Nelore e Rubia Gallega x Nelore**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FURLAN, Luiz Roberto; FERRAZ, André Luiz Julien; BORTOLOSSI, Julio César. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 331-341, 2007.

GARCÍA-ALCALDE, et al. **Qualimap: evaluating next generation sequencing alignment data**. *Bioinformatics*(2012) 28 (20): 2678-2679.

GRAUGNARD, Daniel E. et al. High-starch diets induce precocious adipogenic gene network up-regulation in longissimus lumborum of early-weaned Angus cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 7, p. 953-963, 2010.

Grimaldi, B.; Bellet, M.M.; Katada, S.; Astarita, G.; Hirayama, J.; Amin, R.H.; Granneman, J.G.; Piomelli, D.; Leff, T.; Sassone-Corsi, P. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . **Cell Metab**. 2010, 12, 509–520.

GUO, H. et al. Characterization and mapping of the bovine FBP1 gene. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, n. 9, p. 1319-1326, 2007.

Han L, Shen WJ, Bittner S, Kraemer FB, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . **Future Cardiol**. 2017 May;13(3):279-296. doi: 10.2217/fca-2017-0019. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28581362; PMCID: PMC5941699.

HARVEY, Kelsey M.; COOKE, Reinaldo F.; MORIEL, Philippe. Impacts of nutritional management during early postnatal life on long-term physiological and productive responses of beef cattle. **Frontiers in Animal Science**, v. 2, p. 730356, 2021.

HUGGINS, Christopher J. et al. C/EBP γ is a critical regulator of cellular stress response networks through heterodimerization with ATF4. **Molecular and cellular biology**, v. 36, n. 5, p. 693-713, 2016.

JING, Yujia et al. Circadian gene PER2 silencing downregulates PPARG and SREBF1 and suppresses lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells. **Biology**, v. 10, n. 12, p. 1226, 2021.

JUNJVLIEKE, Zainaguli et al. Effect of ELOVL6 on the lipid metabolism of bovine adipocytes. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2282-2290, 2020.

KACZOR, Urszula et al. The g. 4290 C> G Polymorphism in the FADS2 Gene Modifies the Fatty Acid Profile of the Pectoralis Superficialis Muscle of Ross 308 Broiler Chickens. **Animals**, v. 12, n. 15, p. 1882, 2022.

KARISA, B. K. et al. Candidate genes and biological pathways associated with carcass quality traits in beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 93, n. 3, p. 295-306, 2013.

KĘSEK-WOŹNIAK, Marzena M.; WOJTAS, Edyta; ZIELAK-STECIWKO, Anna E. Impact of SNPs in ACACA, SCD1, and DGAT1 genes on fatty acid profile in bovine milk with regard to lactation phases. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 997, 2020.

LADEIRA, Marcio M. et al. Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 6, p. 918, 2016.

LI, Cong et al. Genome wide association study identifies 20 novel promising genes associated with milk fatty acid traits in Chinese Holstein. **PLoS one**, v. 9, n. 5, p. e96186, 2014.

LI, Shijun et al. Overexpression of PLIN1 promotes lipid metabolism in bovine adipocytes. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1944, 2020.

LI, Yunhai et al. Variation in the stearoyl-CoA desaturase gene (SCD) and its influence on milk fatty acid composition in late-lactation dairy cattle grazed on pasture. **Archives Animal Breeding**, v. 63, n. 2, p. 355-366, 2020.

LIAO Y, SMYTH GK, SHI W. **featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features**. *Bioinformatics*. 2014 Apr 1;30(7):923-30. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24227677.

Liu, M.; Liu, F. Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. *Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014, 28, 25–31.

LUDWIG, Marie-Gabrielle; SEUWEN, Klaus. Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 22, n. 1-4, p. 79-110, 2002.

Martinez-Botas, J., Anderson, J., Tessier, D. *et al.* Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr^{db/db}* mice. **Nat Genet** **26**, 474–479 (2000). <https://doi.org/10.1038/82630>.

MATSUMOTO, Hirokazu *et al.* The SNPs in the promoter regions of the bovine FADS2 and FABP4 genes are associated with beef quality traits. **Livestock Science**, v. 163, p. 34-40, 2014.

MEI, CG. **Research on the genetic characteristics of qinchuan cattle, japanese black cattle, angus cattle and gayal based on multi-omics analysis.** Northwest A&F University (2017).

MENEZ, Jhonatas Rosa *et al.* ANÁLISE DA PECUÁRIA DE CORTE NO SUDESTE DO BRASIL: COMPARATIVO DOS DOIS ÚLTIMOS CENSOS (2006-2017). **Revista Científica da Ajes**, v. 9, n. 19, 2020.

MILUCHOVÁ, Martina; GÁBOR, Michal; GAŠPER, Juraj. Analysis of the Genetic Structure of Slovak Holstein Cattle Using Seven Candidate Genes Related to Milk Quality. **Diversity**, v. 14, n. 11, p. 989, 2022.

MOTA, Lucio FM *et al.* Meta-analysis across Nellore cattle populations identifies common metabolic mechanisms that regulate feed efficiency-related traits. **BMC genomics**, v. 23, n. 1, p. 1-12, 2022.

N.S. Morsci, E.M. Sellner, R.D. Schnabel, J.F. Taylor. **Association analysis of adiponectin and somatostatin polymorphisms on BTA1 with growth and carcass traits in Angus cattle.** *Animal Genetics*, 37 (2006), pp. 554-562.

NAGAOKA, Masanori *et al.* The orphan nuclear receptor NR4A3 is involved in the function of dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 8, p. 2958-2967, 2017.

NALDURTIKER, Aditya *et al.* Differential gene expression analysis using RNA-seq in the blood of goats exposed to transportation stress. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1984, 2023.

NIKOLAOU, Stavros; DELTAS, Constantinos. A Comparative Presentation of Mouse Models That Recapitulate Most Features of Alport Syndrome. **Genes**, v. 13, n. 10, p. 1893, 2022.

Ntambi, J. M. and Miyazaki, M.: Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism, *Prog. Lipid Res.*, 43, 91–104, [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00039-0), 2004.

ORIHUELA, Agustín; GALINA, Carlos S. Efeitos da separação de vacas e bezerros no desempenho reprodutivo e no bem-estar animal em bovinos de corte tropicais. **Animais**, v. 9, n. 5, pág. 223, 2019.

Osorio, J.S.; Lohakare, J.; Bionaz, M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: Roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiol. Genom.* **2016**, *48*, 231–256.

OSTROM, Katrina F. et al. Physiological roles of mammalian transmembrane adenylyl cyclase isoforms. *Physiological Reviews*, v. 102, n. 2, p. 815-857, 2022.

PANNIER, L. et al. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle. *Meat science*, v. 85, n. 3, p. 515-518, 2010.

PAREDES, Felipe et al. Poldip2 is an oxygen-sensitive protein that controls PDH and α KGDH lipoylation and activation to support metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, n. 8, p. 1789-1794, 2018.

Patel, MS, e Srinivasan, M. (2011). Metabolic programming in the immediate postnatal life *Ana Nutr. Metab* . 58, 18-28. doi: 10.1159/000328040.

PAZZOLA, Michele et al. Novel Genes Associated with Dairy Traits in Sarda Sheep. *Animals*, v. 11, n. 8, p. 2207, 2021.

PRASAD, Puttur D. et al. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 13, p. 7501-7506, 1998.

RAPOSO, Helena Fonseca. Tecido adiposo: suas cores e versatilidade. *HU Revista*, v. 46, p. 1-12, 2020.

RASBY, Rick. Early weaning beef calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 23, n. 1, p. 29-40, 2007.

RAZA, Sayed Haidar Abbas et al. Polymorphism of the PLIN1 gene and its association with body measures and ultrasound carcass traits in Qinchuan beef cattle. *Genome*, v. 63, n. 10, p. 483-492, 2020.

REDDY, Kondreddy Eswar et al. Effect of different early weaning regimens for calves on adipogenic gene expression in Hanwoo loin at the fattening stage. *Livestock Science*, v. 195, p. 87-98, 2017.

ROBINSON M D, MCCARTHY DJ, SMYTH GK. **edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.** *Bioinformatics*. 2010, 26: 139-140. 10.1093/bioinformatics/btp616.

ROSEN, B.D.; BICKHART, D.M.; SCHNABEL, R.D.; et al. 2018. Modernizing the bovine reference genome assembly. Proc. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018. Auckland, New Zealand. p. 802, 2018.

S. Wei, L.S. Zan, H.B. Wang, G. Cheng, M. Du, Z. Jiang, G.J. Hausman, D.C. McFarland, M.V. Dodson. **Adenovirus-mediated interference of FABP4 regulates mRNA expression of ADIPOQ, LEP and LEPR in bovine adipocytes.** *Genetics and Molecular Research*, 27 (2013), pp. 494-505.

SBARDELLA, Ana Paula et al. Genome-Wide Association Study Provides Insights into Important Genes for Reproductive Traits in Nelore Cattle. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1386, 2021.

SCHUH, Katharina. **Establishment of an experimental model for dairy cows of divergent peripartal mobilization of body reserves: Profiling circulating steroid hormones and the mRNA abundance of steroid metabolizing enzymes in liver and in adipose tissue.** 2021. Tese de Doutorado. Universitäts-und Landesbibliothek Bonn.

Shan T, Liu W, Kuang S. **Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues.** *FASEB J.* 2013 Jan;27(1):277-87. doi: 10.1096/fj.12-211516. Epub 2012 Oct 9. PMID: 23047894; PMCID: PMC3528316.

SHIJUN, Li et al. Function and characterization of the promoter region of perilipin 1 (PLIN1): Roles of E2F1, PLAG1, C/EBP β , and SMAD3 in bovine adipocytes. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2400-2409, 2020.

TANG, Ni et al. The controversial role of adiponectin in appetite regulation of animals. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3387, 2021.

TERASHIMA, Ryota et al. Sequential preovulatory expression of a gonadotropin-releasing hormone-inducible gene, Nr4a3, and its suppressor Anxa5 in the pituitary gland of female rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 67, n. 3, p. 217-221, 2021.

VADDER, Filipe et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 84-96, 2014.

VIANA, Alexandra Fabielle Pereira et al. **Avaliação genética de bovinos da raça Nelore em diferentes condições de criação.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM), Santa Maria – Rio Grande do Sul. 2019.

W. Barendse, R.J. Bunch, M.B. Thomas, B.E. Harrison. **A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle.** *Anim. Genet.*, 40 (2009), pp. 770-773.

WANG, Chong et al. Weaning performance of beef cattle calves based on concentrate intake. **Animals**, v. 10, n. 1, p. 18, 2019.

WANG, Haiping et al. Human placental Na⁺-dependent multivitamin transporter: Cloning, functional expression, gene structure, and chromosomal localization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14875-14883, 1999.

XIAO, Zhijie et al. Glomerular podocytes express type 1 adenylate cyclase: inactivation results in susceptibility to proteinuria. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 118, n. 3, p. e39-e48, 2011.

YANG, Haokun et al. Full body loss of the nuclear hormone receptor Nr4a3 results induces obesity and glucose intolerance. **The FASEB Journal**, v. 34, n. S1, p. 1-1, 2020.

YANG, Yuwei et al. MiR-152 regulates apoptosis and triglyceride production in MECs via targeting ACAA2 and HSD17B12 genes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 417, 2018.

YANG, Zhuqing et al. Uncovering the mechanism whereby dietary nicotinic acid increases the intramuscular fat content in finishing steers by RNA sequencing analysis. **Animal Production Science**, v. 59, n. 9, p. 1620-1630, 2019.

YU, S. L. et al. Molecular cloning and characterization of bovine PRKAG3 gene: structure, expression and single nucleotide polymorphism detection. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 122, n. 5, p. 294-301, 2005.

ZHAN, Kang et al. Propionate enhances the expression of key genes involved in the gluconeogenic pathway in bovine intestinal epithelial cells. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 6, p. 5514-5524, 2020.

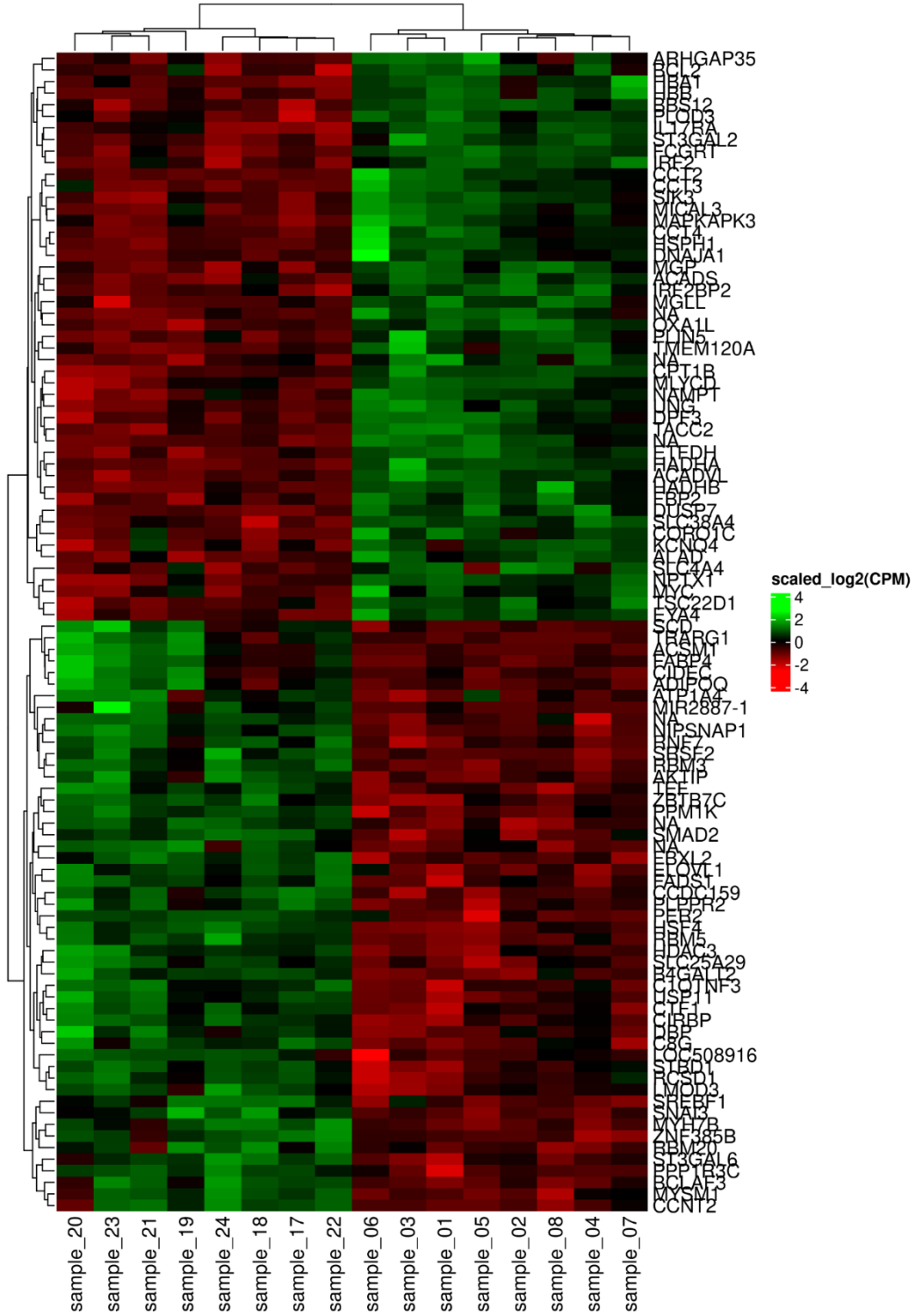
Zhang, X.; Zhao, F.; Si, Y.; Huang, Y.L.; Yu, C.P.; Luo, C.C.; Zhang, N.; Li, Q.Z.; Gao, X.J. GSK3 β regulates milk synthesis in and proliferation of dairy cow mammary epithelial cells via the mTOR/S6K1 signaling pathway. **Molecules** 2014, 19, 9435–9452.

ZHAO, Yue et al. Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 decreases monocyte adhesion and atherosclerosis. **Circulation research**, v. 107, n. 4, p. 501-511, 2010.

APÊNDICES

Apêndice S1: Clustering heatmap

Clustering HeatMap:
top 100 expressed genes to M2.vs.M1_EW contrast



Apêndice S2: Tabela de DEG significativos do M2 vs M1

SYMBOL	ENTREZID	logFC	logCPM	LR	PValue	FDR	expression
RBM3	509771	1.340	5.127	102.791	3.724036e-24	5.241954e-20	up
FCGRT	338062	-1.223	7.084	93.850	3.404048e-22	2.395769e-18	down
PPM1K	540329	2.054	5.354	92.456	6.885179e-22	3.230526e-18	up
UNG	511381	-1.412	7.902	70.679	4.203582e-17	1.479241e-13	down
MYH7B	521764	1.342	7.711	70.096	5.648130e-17	1.590062e-13	up
SLC38A4	527476	-2.402	1.319	69.648	7.088658e-17	1.662999e-13	down
TACC2	533768	-1.023	8.374	66.981	2.741842e-16	5.513453e-13	down
PER2	512237	1.559	4.197	64.330	1.052108e-15	1.851184e-12	up
HSPH1	507165	-1.312	5.281	63.664	1.475684e-15	2.307970e-12	down
HSF4	614788	1.005	4.750	61.172	5.229295e-15	7.360756e-12	up
HADHA	281810	-0.764	7.314	58.319	2.229311e-14	2.852707e-11	down
MICAL3	532244	-1.001	6.404	57.396	3.564127e-14	4.180721e-11	down
NIPSNAP1	614972	1.345	3.296	53.446	2.658416e-13	2.878451e-10	up
PPP1R3C	539466	1.347	7.204	52.050	5.410632e-13	5.440004e-10	up
CIRBP	507120	1.048	6.359	51.728	6.376103e-13	5.983335e-10	up
ZNF385B	613328	1.865	1.856	50.915	9.644719e-13	8.484942e-10	up
FADS1	533107	1.318	3.289	47.638	5.127158e-12	4.245286e-09	up
CPT1B	509459	-0.817	6.077	47.029	6.993378e-12	5.468822e-09	down
MLYCD	512341	-1.274	5.243	46.714	8.214940e-12	6.085974e-09	down
		-0.771	4.099	46.176	1.081112e-11	7.608866e-09	down
EYA4	538786	-0.975	6.824	45.980	1.194404e-11	8.005917e-09	down
HBA1	100140149	-3.938	-0.057	45.693	1.382878e-11	8.847905e-09	down

IRF2BP2	781665	- 0.859	5.858	43.558	4.114835e- 11	2.518279e- 08	down
LOC508916	508916	2.508	2.415	43.318	4.653111e- 11	2.729050e- 08	up
ACADVL	282130	- 0.750	8.043	43.191	4.965997e- 11	2.796055e- 08	down
ADIPOQ	282865	5.824	1.503	42.919	5.704894e- 11	3.088542e- 08	up
DUSP7	785016	- 0.666	5.186	42.816	6.014803e- 11	3.135717e- 08	down
NPTX1	513538	- 2.682	2.239	42.703	6.372413e- 11	3.203503e- 08	down
SIK3	506539	- 0.798	5.509	42.209	8.202972e- 11	3.981553e- 08	down
MGP	282660	- 0.996	5.651	41.853	9.838510e- 11	4.551003e- 08	down
CTF1	514803	1.084	3.220	41.817	1.002281e- 10	4.551003e- 08	up
RNF7	515595	0.704	5.132	41.471	1.196461e- 10	5.262933e- 08	up
ACADS	511222	- 0.639	5.905	41.109	1.439957e- 10	6.142073e- 08	down
C1QTNF3	531659	1.059	4.533	40.850	1.644129e- 10	6.806693e- 08	up
SREBF1	539361	1.089	6.483	40.718	1.758809e- 10	7.073428e- 08	up
FABP4	281759	4.839	2.152	40.334	2.140882e- 10	8.370848e- 08	up
TSC22D1	510359	- 0.817	5.726	40.011	2.525189e- 10	9.606638e- 08	down
MGLL	505290	- 0.752	6.393	39.701	2.959174e- 10	1.096140e- 07	down
SCD	280924	1.526	6.296	39.244	3.740306e- 10	1.349963e- 07	up
ACSM1	282576	6.438	-0.132	38.980	4.281667e- 10	1.506718e- 07	up
ST3GAL2	444879	- 0.842	5.793	38.316	6.016085e- 10	2.065425e- 07	down
		1.042	2.687	37.966	7.200252e- 10	2.413113e- 07	up
ZBTB7C	614110	1.150	1.858	37.444	9.409706e- 10	3.080256e- 07	up
ETFDH	768074	- 0.601	6.394	37.352	9.863184e- 10	3.155322e- 07	down
PLIN5	531199	- 1.072	4.620	36.977	1.195222e- 09	3.712789e- 07	down
CCDC159	785202	1.185	3.283	36.948	1.213330e- 09	3.712789e- 07	up

IRF2	337916	- 0.642	4.114	36.572	1.470931e- 09	4.405281e- 07	down
LMOD3	509978	1.084	8.167	36.425	1.586290e- 09	4.651797e- 07	up
ALAD	510679	- 0.833	5.515	35.488	2.566340e- 09	7.324944e- 07	down
SNAI3	526694	2.227	2.723	35.461	2.601927e- 09	7.324944e- 07	up
STBD1	513376	1.459	6.789	35.183	3.000968e- 09	8.282671e- 07	up
TRARG1	527604	6.120	0.836	34.718	3.810695e- 09	1.031526e- 06	up
HBB	280813	- 2.673	1.368	34.450	4.372471e- 09	1.161262e- 06	down
RBM20	525419	0.851	4.995	34.184	5.013051e- 09	1.306735e- 06	up
SRSF2	508312	0.520	7.276	34.045	5.384587e- 09	1.378063e- 06	up
PLPPR2	520247	1.082	4.577	33.942	5.677578e- 09	1.427100e- 06	up
MIR2887-1	100498812	5.017	-0.994	33.546	6.960436e- 09	1.713938e- 06	up
DPF3	787359	- 1.064	2.727	33.518	7.062264e- 09	1.713938e- 06	down
ATP1A4	537960	1.495	3.186	33.158	8.496890e- 09	2.027156e- 06	up
CCNT2	521089	0.587	5.606	32.980	9.311670e- 09	2.184518e- 06	up
		- 0.617	5.730	32.471	1.209834e- 08	2.791743e- 06	down
CIDEC	534607	4.807	0.993	32.096	1.467662e- 08	3.332065e- 06	up
CCT3	504735	- 0.613	6.445	32.012	1.532499e- 08	3.424040e- 06	down
NAMPT	520472	- 1.102	6.659	31.902	1.621707e- 08	3.566742e- 06	down
MAPKAPK3	615215	- 0.597	5.594	31.540	1.954108e- 08	4.231697e- 06	down
TMEM120A	520173	- 1.089	4.320	31.412	2.087218e- 08	4.451468e- 06	down
BCLAF3	511003	0.813	3.949	31.317	2.191681e- 08	4.589325e- 06	up
MYC	511077	- 1.266	3.200	31.295	2.217065e- 08	4.589325e- 06	down
SLC4A4	282360	- 1.261	3.644	30.849	2.788363e- 08	5.640869e- 06	down
		2.079	1.043	30.836	2.807938e- 08	5.640869e- 06	up

SLC25A29	507686	0.932	3.071	30.795	2.868147e-08	5.640869e-06	up
PLOD3	514996	- 0.637	3.953	30.783	2.885355e-08	5.640869e-06	down
IL17RA	525040	- 0.739	3.473	30.691	3.025161e-08	5.833173e-06	down
HDAC3	404125	0.525	4.565	30.554	3.246721e-08	6.175789e-06	up
RCSD1	512205	0.651	6.411	30.139	4.021018e-08	7.546647e-06	up
C8G	517356	0.787	3.428	29.908	4.529642e-08	8.389374e-06	up
MIR12060	114482212	1.320	0.641	29.754	4.905863e-08	8.954791e-06	up
TEF	616076	0.765	4.846	29.685	5.082891e-08	8.954791e-06	up
DBP	503577	1.160	2.436	29.658	5.153013e-08	8.954791e-06	up
ATP2B2	613800	1.229	4.281	29.575	5.378286e-08	9.232287e-06	up
KCNQ4	528741	- 0.785	5.792	29.391	5.914421e-08	9.807701e-06	down
FBXL2	616212	1.120	1.195	29.389	5.922525e-08	9.807701e-06	up
DNAJA1	528862	- 0.664	4.604	29.297	6.209477e-08	1.005527e-05	down
BCL2	281020	- 1.224	2.142	29.295	6.214896e-08	1.005527e-05	down
GSTM3	615507	0.986	3.708	29.079	6.949740e-08	1.111643e-05	up
FBP2	514066	- 0.637	9.201	28.893	7.647220e-08	1.209464e-05	down
		- 1.820	3.260	28.425	9.740656e-08	1.521285e-05	down
FITM2	518159	- 0.840	4.865	28.406	9.834962e-08	1.521285e-05	down
ST3GAL6	444860	0.720	5.041	28.350	1.012273e-07	1.548778e-05	up
SCN3B	540925	- 1.680	4.039	28.262	1.059787e-07	1.604039e-05	down
		- 0.642	4.210	28.066	1.172385e-07	1.755584e-05	down
B4GALT2	100125390	0.501	4.621	27.860	1.304427e-07	1.932749e-05	up
PLIN1	520598	2.600	2.262	27.627	1.471315e-07	2.147791e-05	up
RBFOX2	514951	0.710	6.102	27.615	1.480078e-07	2.147791e-05	up

TMEM26	100125281	- 1.160	1.738	27.358	1.690592e- 07	2.428242e- 05	down
THRSP	515940	3.969	0.442	27.325	1.719657e- 07	2.445039e- 05	up
ARHGAP35	540310	- 0.618	6.839	27.253	1.784712e- 07	2.512160e- 05	down
CASZ1	536765	- 0.750	4.885	26.957	2.080735e- 07	2.899844e- 05	down
SLC12A2	286845	0.833	5.039	26.907	2.135183e- 07	2.946552e- 05	up
CORO1C	515798	- 0.569	4.328	26.597	2.506825e- 07	3.425833e- 05	down
		2.664	-0.454	26.524	2.602751e- 07	3.522724e- 05	up
UGP2	281565	- 0.715	7.987	26.274	2.961965e- 07	3.970725e- 05	down
ADAMTSL5	107131164	0.724	6.648	26.221	3.044416e- 07	4.042755e- 05	up
MYSM1	515332	0.558	5.339	26.123	3.203509e- 07	4.150597e- 05	up
DYNLL1	404151	- 0.715	3.191	26.120	3.208998e- 07	4.150597e- 05	down
MAMSTR	505540	- 1.039	5.287	26.117	3.214089e- 07	4.150597e- 05	down
SLC9A5	512686	1.118	5.274	25.908	3.580608e- 07	4.581877e- 05	up
ATXN7L2	541097	0.849	3.912	25.711	3.965635e- 07	5.028854e- 05	up
AZIN1	532835	0.562	6.596	25.633	4.128550e- 07	5.188702e- 05	up
MIR29C	791043	1.348	1.600	25.258	5.014520e- 07	6.246406e- 05	up
		- 0.639	4.773	25.212	5.135955e- 07	6.341552e- 05	down
BBS12	516376	- 0.723	2.487	25.010	5.702175e- 07	6.812302e- 05	down
LSS	615906	0.713	2.836	25.007	5.710796e- 07	6.812302e- 05	up
CACNA1A	282648	0.881	2.049	24.982	5.786146e- 07	6.844185e- 05	up
SLC39A14	515437	- 0.729	3.877	24.918	5.981009e- 07	7.015724e- 05	down
DDC	280762	- 0.848	2.272	24.834	6.249096e- 07	7.269609e- 05	down
GNL3L	507679	0.518	6.037	24.745	6.542315e- 07	7.548330e- 05	up
CCDC86	540913	- 0.731	3.400	24.568	7.172227e- 07	8.097113e- 05	down

PPP1R14B	617154	0.618	5.637	24.559	7.207733e-07	8.097113e-05	up
RXRG	509500	0.853	3.786	24.548	7.248055e-07	8.097113e-05	up
		- 2.275	0.362	24.485	7.490794e-07	8.302395e-05	down
DDX10	528483	- 0.760	1.931	24.391	7.862173e-07	8.578911e-05	down
CHORDC1	505144	- 0.615	5.450	24.348	8.039434e-07	8.704852e-05	down
CCDC15	512305	0.758	3.777	24.144	8.940300e-07	9.606387e-05	up
SLC2A3	282358	- 0.869	3.607	24.102	9.134319e-07	9.699329e-05	down
CFAP100	519687	2.570	-0.508	24.095	9.171199e-07	9.699329e-05	up
		- 0.575	3.967	24.082	9.233519e-07	9.699329e-05	down
VGLL2	541260	0.870	6.479	23.996	9.652403e-07	1.002850e-04	up
IQCA1L	101903592	1.858	3.932	23.988	9.692744e-07	1.002850e-04	up
		0.591	2.851	23.975	9.760620e-07	1.002850e-04	up
		1.503	0.208	23.934	9.970634e-07	1.017005e-04	up
ADAM19	510907	- 0.795	4.247	23.865	1.033424e-06	1.046509e-04	down
CA3	513212	0.724	10.893	23.718	1.115427e-06	1.121482e-04	up
INF2	538493	0.562	4.461	23.674	1.140997e-06	1.139055e-04	up
		0.904	2.120	23.638	1.162812e-06	1.144354e-04	up
ACOT2	785383	- 1.523	0.220	23.629	1.168200e-06	1.144354e-04	down
SLC16A9	539514	- 1.674	0.317	23.625	1.170695e-06	1.144354e-04	down
EIF4A2	286819	- 0.503	8.796	23.444	1.286095e-06	1.248488e-04	down
GON7	505131	0.644	3.208	23.311	1.378113e-06	1.319613e-04	up
MAP6D1	614904	0.661	2.793	23.197	1.462289e-06	1.368808e-04	up
BTNL9	100125313	- 0.934	5.228	23.195	1.463974e-06	1.368808e-04	down
ARNTL	530705	- 0.755	3.260	23.184	1.471804e-06	1.368808e-04	down

METTTL7B	506952	- 1.341	1.176	23.168	1.484200e- 06	1.368808e- 04	down
NR1D1	768225	0.896	4.737	23.164	1.487835e- 06	1.368808e- 04	up
POMGNT2	497030	- 0.820	2.723	23.053	1.575821e- 06	1.439935e- 04	down
GLRX	515416	- 0.619	4.582	23.041	1.585606e- 06	1.439935e- 04	down
ASB18	100141009	1.110	1.988	22.983	1.634451e- 06	1.474778e- 04	up
LOC100848869	100848869	0.512	8.612	22.879	1.725081e- 06	1.546639e- 04	up
DNAJC1	781036	- 0.678	3.288	22.811	1.787547e- 06	1.582485e- 04	down
SCAMP4	538819	- 0.560	3.433	22.636	1.957589e- 06	1.722089e- 04	down
SAP30	781150	- 0.827	1.579	22.614	1.980787e- 06	1.722089e- 04	down
HOXD9	100295338	- 0.630	3.709	22.598	1.997164e- 06	1.722089e- 04	down
		0.602	4.738	22.589	2.006362e- 06	1.722089e- 04	up
ORMDL3	615368	0.534	4.996	22.589	2.006412e- 06	1.722089e- 04	up
SPSB2	613651	0.713	3.544	22.504	2.097442e- 06	1.789309e- 04	up
ARRDC1	786098	0.804	3.322	22.371	2.247523e- 06	1.899327e- 04	up
VWA8	524159	- 0.664	4.567	22.359	2.260924e- 06	1.899327e- 04	down
SLC25A20	518758	- 0.517	5.632	22.354	2.266887e- 06	1.899327e- 04	down
PEG3	444864	- 0.840	3.727	22.278	2.358667e- 06	1.964532e- 04	down
DKK2	541161	1.148	1.694	22.236	2.410993e- 06	1.996302e- 04	up
VWA7	505555	0.536	4.350	22.214	2.438803e- 06	2.007520e- 04	up
HSDL2	404131	- 0.595	5.390	22.175	2.489162e- 06	2.037061e- 04	down
AHDC1	522105	- 0.671	5.271	22.076	2.621234e- 06	2.115820e- 04	down
ACOT2	511033	- 1.198	2.129	22.067	2.632575e- 06	2.115820e- 04	down
ACADM	505968	- 0.605	5.991	22.067	2.633539e- 06	2.115820e- 04	down
MAP2K6	286883	- 0.739	6.120	22.054	2.651371e- 06	2.115820e- 04	down

GPATCH8	534759	0.518	6.589	22.047	2.660557e-06	2.115820e-04	up
NR1D2	532076	0.568	5.841	21.990	2.740766e-06	2.167361e-04	up
KIAA1671	533883	- 1.012	3.990	21.970	2.769915e-06	2.178175e-04	down
SLC27A1	513787	- 0.522	6.478	21.954	2.793075e-06	2.184184e-04	down
HDAC9	535415	1.263	3.023	21.893	2.882278e-06	2.241489e-04	up
UBE2E2	784326	0.656	4.048	21.747	3.110490e-06	2.405674e-04	up
HUS1	514142	0.683	3.159	21.698	3.190793e-06	2.454295e-04	up
BCOR	784529	- 0.690	4.269	21.600	3.358396e-06	2.569173e-04	down
		0.989	8.055	21.478	3.578936e-06	2.708446e-04	up
MRLN	101902281	- 0.935	4.520	21.454	3.623948e-06	2.727845e-04	down
COQ10A	538821	- 0.541	7.453	21.316	3.894399e-06	2.900400e-04	Down
RNPC3	768060	0.542	4.439	21.294	3.938833e-06	2.918053e-04	Up
ARHGEF40	527362	- 0.704	4.508	21.255	4.020913e-06	2.963266e-04	Down
		1.145	2.312	21.166	4.211314e-06	3.071422e-04	Up
SLC31A1	518976	0.739	4.631	21.130	4.292364e-06	3.114398e-04	Up
RETREG1	540068	1.180	5.551	20.967	4.673779e-06	3.373750e-04	Up
CPT2	504502	- 0.635	4.065	20.927	4.770591e-06	3.426063e-04	Down
SESN1	538226	- 0.834	5.999	20.867	4.923950e-06	3.518250e-04	Down
		1.068	0.774	20.783	5.144886e-06	3.639239e-04	Up
RWDD3	614557	0.957	1.614	20.781	5.148489e-06	3.639239e-04	Up
DHRS12	507276	0.724	3.535	20.773	5.170843e-06	3.639239e-04	Up
CHRDL1	100336905	0.955	3.553	20.705	5.357288e-06	3.751700e-04	Up
SCN1A	529590	2.446	1.786	20.683	5.420149e-06	3.766482e-04	Up
EXD1	617602	2.524	-0.829	20.679	5.431911e-06	3.766482e-04	Up

CHRNE	281688	0.852	5.155	20.644	5.531124e-06	3.816475e-04	Up
TBC1D8	527162	-0.647	3.825	20.605	5.645281e-06	3.876242e-04	Down
RPTOR	507056	-0.503	4.451	20.527	5.880842e-06	4.016661e-04	Down
VAMP4	616923	0.559	2.819	20.518	5.906854e-06	4.016661e-04	Up
LRSAM1	507008	0.647	2.671	20.467	6.066131e-06	4.105138e-04	Up
AIFM3	526295	2.587	-0.769	20.446	6.133993e-06	4.131200e-04	Up
CCDC190	617478	1.402	2.148	20.416	6.229382e-06	4.175466e-04	Up
PARP3	507426	1.631	2.067	20.347	6.458758e-06	4.308695e-04	Up
HSP90AB1	767874	-0.521	8.566	20.305	6.602672e-06	4.383925e-04	Down
SERTAD3	767935	-0.533	4.421	20.237	6.840443e-06	4.499349e-04	Down
IFT140	100139697	-1.013	0.879	20.035	7.603674e-06	4.955061e-04	Down
		1.024	1.510	19.862	8.323804e-06	5.350039e-04	Up
PRR22	616551	1.051	1.165	19.811	8.546719e-06	5.443602e-04	Up
SHQ1	507486	-0.617	2.275	19.590	9.596654e-06	6.057511e-04	Down
MFSD8	515944	0.521	4.340	19.531	9.898175e-06	6.219943e-04	Up
FBXO44	785057	0.896	2.640	19.419	1.049799e-05	6.531390e-04	Up
CKS2	767985	-1.066	1.807	19.416	1.051285e-05	6.531390e-04	Down
ANXA7	533360	0.572	5.636	19.412	1.053300e-05	6.531390e-04	Up
VIPR2	790124	0.919	1.105	19.348	1.089340e-05	6.725241e-04	Up
CROCC	530641	0.581	3.758	19.274	1.132210e-05	6.959384e-04	Up
ERFE	101905782	1.763	0.564	19.227	1.160346e-05	7.080880e-04	Up
KALRN	540675	-0.746	3.419	19.225	1.162037e-05	7.080880e-04	Down
MPDZ	536863	0.642	6.998	19.215	1.167647e-05	7.084398e-04	Up
PLA2G7	282311	-0.842	3.716	19.137	1.216751e-05	7.350641e-04	Down

ARSG	513067	- 1.274	2.753	19.103	1.238447e- 05	7.449737e- 04	Down
SGCG	506155	0.767	6.340	19.054	1.270782e- 05	7.611713e- 04	Up
CLN6	617615	0.591	3.040	19.034	1.283888e- 05	7.657631e- 04	Up
INTS2	534471	0.615	3.517	19.010	1.300488e- 05	7.723909e- 04	Up
HSPA8	281831	- 0.597	10.008	18.993	1.312161e- 05	7.760496e- 04	Down
SH3BP4	520462	- 0.674	4.117	18.974	1.324806e- 05	7.769990e- 04	Down
CERS1	615296	0.532	3.000	18.861	1.405642e- 05	8.146955e- 04	Up
RAPGEF4	537312	- 0.877	1.788	18.832	1.427342e- 05	8.234126e- 04	Down
DUSP1	539175	- 0.930	7.022	18.652	1.568717e- 05	8.903732e- 04	Down
SIK2	539570	- 0.693	4.364	18.582	1.627413e- 05	9.118250e- 04	Down
ESRRG	536732	- 1.477	1.190	18.576	1.632423e- 05	9.118250e- 04	Down
ACSM5	100298888	0.610	4.937	18.522	1.679537e- 05	9.307545e- 04	Up
SMOC1	508379	1.230	2.659	18.513	1.687843e- 05	9.316893e- 04	Up
WBP1L	782651	- 0.816	3.785	18.443	1.750303e- 05	9.623934e- 04	Down
OPTN	534150	0.546	8.436	18.373	1.816209e- 05	9.870640e- 04	Up
IFT81	519602	0.778	2.316	18.358	1.830108e- 05	9.907925e- 04	Up
SMTN	528013	0.513	5.940	18.284	1.902938e- 05	1.025187e- 03	Up
ACOX3	510065	- 0.610	4.367	18.279	1.908206e- 05	1.025187e- 03	Down
TMED8	614106	- 1.520	-0.135	18.242	1.945671e- 05	1.041341e- 03	Down
CIAO2A	512871	0.509	3.848	18.222	1.965693e- 05	1.048072e- 03	Up
NCAM1	281941	0.972	3.607	18.215	1.973555e- 05	1.048293e- 03	Up
SLC7A8	536818	- 1.242	6.467	18.184	2.005740e- 05	1.061383e- 03	Down
SLC43A2	511955	- 1.637	6.149	18.093	2.103209e- 05	1.108793e- 03	Down
MYL3	618352	- 0.803	9.519	18.026	2.179364e- 05	1.140399e- 03	Down

SNX25	533174	- 0.625	2.576	17.993	2.217329e- 05	1.147468e- 03	Down
WIPF3	786606	- 0.608	4.219	17.960	2.255813e- 05	1.163107e- 03	Down
ANKRD1	510376	1.270	9.290	17.927	2.295828e- 05	1.176731e- 03	Up
SMRP1	540767	- 0.527	4.658	17.835	2.408737e- 05	1.228456e- 03	Down
BCL6	539020	- 0.693	6.651	17.799	2.454809e- 05	1.247433e- 03	Down
ESCO1	535035	- 0.518	4.403	17.753	2.515761e- 05	1.264709e- 03	Down
PCSK5	528098	- 0.762	2.515	17.642	2.666906e- 05	1.331184e- 03	Down
IGFLR1	617594	0.644	3.252	17.594	2.734592e- 05	1.356207e- 03	Up
PGRMC2	534021	0.529	6.164	17.593	2.736309e- 05	1.356207e- 03	Up
WDR7	536469	- 0.537	4.154	17.564	2.777463e- 05	1.366978e- 03	Down
ETNPPL	515186	0.500	5.905	17.550	2.798579e- 05	1.368936e- 03	Up
TDRD7	506702	0.556	4.017	17.548	2.801566e- 05	1.368936e- 03	Up
ACSS2	506459	0.611	4.658	17.535	2.820342e- 05	1.368936e- 03	Up
ZNRF3	535441	- 0.918	0.979	17.482	2.900491e- 05	1.403000e- 03	Down
RHBDF1	529167	0.608	4.492	17.472	2.915221e- 05	1.405296e- 03	Up
FADS2	521822	0.742	4.240	17.373	3.071045e- 05	1.470341e- 03	Up
C21H15orf39	784903	- 0.780	1.144	17.357	3.097793e- 05	1.478120e- 03	Down
TAGLN3	515562	0.935	2.343	17.350	3.108638e- 05	1.478283e- 03	Up
UCP3	281563	- 1.134	8.343	17.190	3.381349e- 05	1.591835e- 03	Down
ODC1	281365	- 0.683	6.865	17.179	3.401097e- 05	1.595795e- 03	Down
CPT1A	506812	- 0.934	5.092	17.161	3.434145e- 05	1.605947e- 03	Down
STX2	519148	0.510	3.038	17.124	3.502428e- 05	1.628009e- 03	Up
CNTFR	539548	- 1.088	3.624	17.107	3.532712e- 05	1.630572e- 03	Down
LOC786948	786948	1.279	0.874	17.101	3.544721e- 05	1.630572e- 03	Up

ADGRL4	535066	- 0.612	4.543	16.997	3.744512e- 05	1.716865e- 03	Down
NLGN2	787986	0.817	1.188	16.952	3.833797e- 05	1.752095e- 03	Up
PKD2L2	521683	1.660	-0.681	16.927	3.884587e- 05	1.763673e- 03	Up
SLC25A36	510392	0.544	6.125	16.920	3.898959e- 05	1.763673e- 03	Up
RAP1GAP2	786649	- 1.122	1.753	16.914	3.910798e- 05	1.763673e- 03	Down
MIR1-2	100312988	0.907	3.966	16.904	3.932073e- 05	1.763673e- 03	Up
KNOP1	511442	- 0.602	2.701	16.903	3.934309e- 05	1.763673e- 03	Down
PFN2	539034	0.587	5.941	16.834	4.078683e- 05	1.822589e- 03	Up
APBB3	525278	0.561	3.246	16.804	4.144840e- 05	1.840466e- 03	Up
PPP1R1B	282459	1.064	1.524	16.739	4.288649e- 05	1.898334e- 03	Up
MSS51	508577	0.953	7.807	16.707	4.363042e- 05	1.924105e- 03	Up
		- 0.983	3.404	16.700	4.377112e- 05	1.924105e- 03	Down
		1.167	2.324	16.696	4.387878e- 05	1.924105e- 03	Up
IGF1R	281848	- 0.752	3.907	16.653	4.488264e- 05	1.962013e- 03	Down
SLIT3	615883	- 0.899	2.311	16.536	4.773478e- 05	2.080231e- 03	Down
DPH1	534099	- 0.541	3.057	16.505	4.852193e- 05	2.102852e- 03	Down
CD300LG	615388	- 0.550	5.794	16.504	4.855264e- 05	2.102852e- 03	Down
RFTN1	506782	- 0.588	4.141	16.496	4.876256e- 05	2.105466e- 03	Down
IGF2R	281849	- 0.581	7.033	16.487	4.897661e- 05	2.108241e- 03	Down
ART3	407147	- 0.705	6.551	16.478	4.920854e- 05	2.111766e- 03	Down
		0.978	3.480	16.421	5.072145e- 05	2.163500e- 03	Up
METTL21E	513822	- 1.373	5.310	16.405	5.115751e- 05	2.168955e- 03	Down
ANKRD37	509139	1.503	0.604	16.396	5.139330e- 05	2.172409e- 03	Up
ZNF385C	100298918	- 1.727	0.498	16.372	5.205542e- 05	2.187260e- 03	Down

LOC515547	515547	- 0.814	1.897	16.337	5.301277e- 05	2.220856e- 03	Down
CBS	514525	0.929	1.956	16.248	5.556132e- 05	2.300239e- 03	Up
ERAP1	514617	- 0.539	4.431	16.171	5.787616e- 05	2.382061e- 03	Down
HSD17B12	789567	0.512	4.060	16.143	5.872494e- 05	2.405911e- 03	Up
LAPTM4B	404155	- 0.520	5.335	16.135	5.898324e- 05	2.406516e- 03	Down
ASB15	282591	0.800	5.600	16.084	6.058238e- 05	2.457184e- 03	Up
DBT	280759	0.600	4.260	16.079	6.075177e- 05	2.457184e- 03	Up
ADCK1	533372	- 0.732	1.536	16.065	6.119992e- 05	2.457184e- 03	Down
ASB5	516722	0.763	8.056	16.063	6.127249e- 05	2.457184e- 03	Up
DAPK3	525506	- 0.539	5.342	16.038	6.208336e- 05	2.482629e- 03	Down
FER	536759	0.619	2.711	16.014	6.285972e- 05	2.506554e- 03	Up
AP4S1	618267	0.657	3.066	15.958	6.477130e- 05	2.561014e- 03	Up
PRKAG3	511961	0.967	5.869	15.944	6.525588e- 05	2.572946e- 03	Up
ANK3	511203	0.618	7.039	15.930	6.572849e- 05	2.584341e- 03	Up
ASPN	507990	- 0.727	2.982	15.855	6.838917e- 05	2.681465e- 03	Down
FAM13C	540918	- 0.875	2.759	15.827	6.942129e- 05	2.714373e- 03	Down
KCNE4	615761	- 1.083	0.328	15.810	7.003384e- 05	2.724244e- 03	Down
KLF15	407241	0.876	3.587	15.808	7.011819e- 05	2.724244e- 03	Up
MTHFR	497032	0.520	5.253	15.804	7.025437e- 05	2.724244e- 03	Up
PJA1	786612	0.564	2.529	15.770	7.153427e- 05	2.766254e- 03	Up
ADORA1	282133	- 1.677	-0.428	15.714	7.366610e- 05	2.825406e- 03	Down
NNAT	353114	0.922	2.798	15.662	7.571317e- 05	2.896029e- 03	Up
MMRN2	512308	0.584	4.476	15.632	7.695239e- 05	2.905058e- 03	Up
ELOVL6	533333	1.509	1.284	15.631	7.698114e- 05	2.905058e- 03	Up

LOC112441908	112441908	3.398	-0.632	15.606	7.800892e-05	2.935972e-03	Up
FAM98C	508569	0.847	1.885	15.570	7.950898e-05	2.971873e-03	Up
PRDM8	507890	0.899	0.684	15.568	7.959620e-05	2.971873e-03	Up
DIPK1A	541171	0.569	3.715	15.560	7.994049e-05	2.975921e-03	Up
NICN1	614730	0.515	4.330	15.555	8.012744e-05	2.975921e-03	Up
CACNA1G	282411	1.737	0.550	15.466	8.401285e-05	3.103845e-03	Up
RBFA	510927	-0.537	3.076	15.456	8.446065e-05	3.112220e-03	Down
RNF128	535869	0.638	3.866	15.441	8.513809e-05	3.125100e-03	Up
CXHXorf58	515411	1.106	0.744	15.431	8.557706e-05	3.128565e-03	Up
ACAT1	511082	-0.501	6.820	15.361	8.879485e-05	3.225574e-03	Down
MIR133A-2	100313253	0.730	4.548	15.359	8.891181e-05	3.225574e-03	Up
GIPC3	618265	1.189	-0.021	15.327	9.043493e-05	3.272396e-03	Up
		-1.375	2.789	15.321	9.071236e-05	3.274018e-03	Down
CNKSR2	534112	-0.616	3.712	15.280	9.266998e-05	3.319142e-03	Down
UBALD1	618672	-0.595	5.692	15.244	9.446913e-05	3.369589e-03	Down
NAV1	531974	0.568	3.838	15.242	9.455724e-05	3.369589e-03	Up
PPARGC1B	514750	-0.818	3.801	15.175	9.799876e-05	3.457437e-03	Down
SLC19A2	532860	1.033	2.388	15.175	9.800494e-05	3.457437e-03	Up
SPIDR	512910	-0.875	2.229	15.165	9.851200e-05	3.458163e-03	Down
		0.579	2.335	15.165	9.851686e-05	3.458163e-03	Up
LOC112444957	112444957	0.839	0.866	15.149	9.935477e-05	3.469735e-03	Up
SPTSSA	615641	0.759	5.604	15.091	1.024697e-04	3.548744e-03	Up
AMPD1	512748	0.569	9.017	15.088	1.026100e-04	3.548744e-03	Up
SIX1	511371	-0.503	5.453	15.066	1.038182e-04	3.581727e-03	Down

ZNF3	618141	0.583	3.238	15.059	1.042090e-04	3.586420e-03	Up
EEPDI	511767	0.608	5.107	15.047	1.048856e-04	3.599215e-03	Up
NLRX1	539974	0.621	2.380	15.043	1.050922e-04	3.599215e-03	Up
NCEH1	534212	-0.673	3.064	15.025	1.060888e-04	3.624530e-03	Down
TNS3	516555	-0.571	3.573	14.997	1.076820e-04	3.661189e-03	Down
KCNK3	519188	-2.196	-0.023	14.972	1.090907e-04	3.690566e-03	Down
ANGPTL4	509963	-1.380	5.918	14.968	1.093326e-04	3.690566e-03	Down
LNK2	526424	-0.531	4.291	14.946	1.106261e-04	3.716824e-03	Down
		0.984	1.125	14.942	1.108647e-04	3.716824e-03	Up
LUM	280847	0.833	4.979	14.910	1.127668e-04	3.770321e-03	Up
NPR3	281358	1.808	3.436	14.888	1.140578e-04	3.797011e-03	Up
GADD45A	505463	-0.827	4.849	14.848	1.165102e-04	3.843910e-03	Down
BDH1	534090	1.255	1.137	14.845	1.167397e-04	3.843910e-03	Up
KCNA5	508960	-0.851	2.583	14.842	1.168793e-04	3.843910e-03	Down
CRABP2	493998	1.560	-0.0001	14.808	1.190022e-04	3.904603e-03	Up
LRRN1	539619	0.918	3.553	14.758	1.222382e-04	3.982927e-03	Up
ZFH2	539758	-0.629	2.479	14.741	1.233441e-04	4.009681e-03	Down
ABCC5	511769	0.601	6.712	14.713	1.251927e-04	4.050270e-03	Up
ACACA	281590	0.583	3.876	14.709	1.254559e-04	4.050270e-03	Up
RBP4	281444	1.469	1.710	14.698	1.261795e-04	4.055028e-03	Up
		1.701	-0.683	14.646	1.296896e-04	4.148889e-03	Up
VWA1	505917	0.602	3.136	14.633	1.305963e-04	4.166798e-03	Up
CDC14A	614777	-0.577	3.899	14.630	1.308415e-04	4.166798e-03	Down
DDAH2	540386	0.633	3.469	14.568	1.352189e-04	4.258034e-03	Up

PSD3	531459	- 0.729	3.028	14.487	1.411097e- 04	4.396925e- 03	Down
ADAMTS12	525276	- 0.926	2.773	14.487	1.411558e- 04	4.396925e- 03	Down
SIPA1L1	787248	- 0.525	3.384	14.486	1.411914e- 04	4.396925e- 03	Down
SPATA5	100297992	- 0.656	2.502	14.466	1.427403e- 04	4.435347e- 03	Down
PDK4	507367	- 1.750	10.901	14.451	1.438628e- 04	4.460382e- 03	Down
SESN3	515914	0.708	3.010	14.441	1.446069e- 04	4.463786e- 03	Up
FABP3	281758	- 0.618	6.801	14.420	1.462351e- 04	4.478376e- 03	Down
LY6G5B	539236	0.646	2.389	14.412	1.468624e- 04	4.484241e- 03	Up
IRF2BPL	613845	- 0.519	4.704	14.349	1.518902e- 04	4.617725e- 03	Down
PAPLN	614084	1.163	0.524	14.335	1.530079e- 04	4.641681e- 03	Up
		- 0.576	2.582	14.297	1.561079e- 04	4.715010e- 03	Down
ETV5	541166	0.948	3.043	14.280	1.575184e- 04	4.737668e- 03	Up
NKPD1	789234	1.318	0.059	14.266	1.587427e- 04	4.764311e- 03	Up
ARHGAP27	789296	- 0.628	3.292	14.250	1.600891e- 04	4.789675e- 03	Down
TGFB2	534069	0.596	3.578	14.245	1.604642e- 04	4.789675e- 03	Up
INHBB	530430	0.917	1.907	14.240	1.608734e- 04	4.789675e- 03	Up
GNPTAB	509610	- 0.666	4.826	14.240	1.609489e- 04	4.789675e- 03	Down
IQANK1	506831	0.709	2.862	14.202	1.642112e- 04	4.866184e- 03	Up
ACTA2	515610	- 0.738	6.282	14.183	1.658266e- 04	4.894013e- 03	Down
CHD1L	524787	0.688	3.465	14.151	1.686726e- 04	4.966252e- 03	Up
CAMTA1	504811	1.029	1.759	14.148	1.689994e- 04	4.966252e- 03	Up
TSHZ2	515677	- 0.598	3.267	14.137	1.700120e- 04	4.975959e- 03	Down
RASL11A	101903585	- 1.409	0.106	14.136	1.700367e- 04	4.975959e- 03	Down
NMRK2	780788	- 0.690	10.629	14.100	1.733647e- 04	5.062824e- 03	Down

SCG3	525941	- 1.254	0.269	14.092	1.740907e- 04	5.071943e- 03	Down
		0.818	4.187	14.089	1.743976e- 04	5.071943e- 03	Up
		1.017	3.076	14.071	1.760102e- 04	5.103861e- 03	Up
MEF2C	512254	0.505	7.249	14.065	1.766089e- 04	5.104615e- 03	Up
MYLK4	518025	- 0.909	3.388	14.052	1.778092e- 04	5.128777e- 03	Down
GALNT10	787200	- 0.653	3.089	14.047	1.782696e- 04	5.131538e- 03	Down
SIM2	100337422	- 1.428	1.056	14.031	1.798147e- 04	5.144456e- 03	Down
ATXN1	616399	- 0.581	4.422	13.968	1.859099e- 04	5.286600e- 03	Down
		- 0.837	3.761	13.902	1.925597e- 04	5.444375e- 03	Down
RUSC2	507809	0.572	5.833	13.902	1.926186e- 04	5.444375e- 03	Up
LOC616957	616957	2.476	-0.891	13.875	1.954189e- 04	5.512458e- 03	Up
FGD6	539481	- 0.635	3.455	13.866	1.962673e- 04	5.522636e- 03	Down
PIERCE1	618654	- 0.577	2.806	13.864	1.965644e- 04	5.522636e- 03	Down
PDK3	510841	- 0.538	2.507	13.845	1.985384e- 04	5.566985e- 03	Down
IPP	785293	0.560	4.120	13.815	2.017442e- 04	5.626581e- 03	Up
ACER3	615110	0.931	0.904	13.813	2.019295e- 04	5.626581e- 03	Up
POLQ	535323	- 1.252	0.699	13.810	2.022627e- 04	5.626581e- 03	Down
FLNC	528415	- 0.832	11.815	13.802	2.030695e- 04	5.637882e- 03	Down
BRCA1	353120	- 0.583	2.142	13.733	2.106668e- 04	5.825828e- 03	Down
GALE	523154	0.798	0.953	13.715	2.127925e- 04	5.861581e- 03	Up
POLR3GL	505641	0.561	2.123	13.710	2.133233e- 04	5.864725e- 03	Up
PLAT	281407	0.573	4.583	13.704	2.140506e- 04	5.869702e- 03	Up
SCNM1	505644	0.506	3.932	13.701	2.143384e- 04	5.869702e- 03	Up
COL4A3	317711	1.251	1.379	13.666	2.184061e- 04	5.969485e- 03	Up

MYO19	508229	0.654	3.287	13.658	2.192779e-04	5.981698e-03	Up
HIPK2	510158	-0.739	3.587	13.645	2.208798e-04	6.013741e-03	Down
ARHGDIB	327676	-0.503	5.038	13.637	2.217929e-04	6.026944e-03	Down
CTXN3	100125915	1.147	3.617	13.624	2.232794e-04	6.054501e-03	Up
GPATCH2L	509393	0.508	5.249	13.574	2.293731e-04	6.173339e-03	Up
HBA	512439	-3.050	-0.394	13.560	2.310592e-04	6.206851e-03	Down
C19H17orf113	116601118	-1.461	-0.161	13.551	2.321916e-04	6.223569e-03	Down
FZD4	445416	-0.554	5.092	13.548	2.325659e-04	6.223569e-03	Down
BMPR1B	407128	1.017	2.541	13.518	2.363311e-04	6.312327e-03	Up
CACNG4	519331	0.802	3.588	13.509	2.373964e-04	6.328771e-03	Up
CRELD2	515222	-0.748	1.773	13.468	2.427078e-04	6.458138e-03	Down
MXRA8	522392	0.748	2.810	13.447	2.454508e-04	6.518802e-03	Up
MYBPHL	538875	0.908	1.167	13.380	2.543741e-04	6.730394e-03	Up
NAPRT	399559	0.602	3.152	13.372	2.554393e-04	6.745898e-03	Up
SHISA2	617336	0.938	5.821	13.325	2.618398e-04	6.901980e-03	Up
		-0.571	2.500	13.317	2.630517e-04	6.920964e-03	Down
ADAMTS20	536137	0.605	4.782	13.292	2.665701e-04	6.993913e-03	Up
AHNAK2	527701	0.981	1.157	13.290	2.668181e-04	6.993913e-03	Up
RPUSD4	516934	-0.530	3.135	13.225	2.762191e-04	7.200110e-03	Down
FAH	508724	0.901	2.164	13.207	2.789368e-04	7.230781e-03	Up
PPDPFL	100126183	-1.224	5.348	13.134	2.900604e-04	7.505313e-03	Down
CYP2D14	282211	1.011	1.711	13.126	2.912762e-04	7.522943e-03	Up
RIPOR2	539635	-0.758	3.585	13.105	2.945675e-04	7.594015e-03	Down
		0.868	0.922	13.101	2.951741e-04	7.595742e-03	Up

LOC574091	574091	- 0.510	3.968	13.094	2.961879e- 04	7.602793e- 03	Down
ZNF703	782419	- 0.704	3.025	13.086	2.975800e- 04	7.602793e- 03	Down
ARHGAP6	100140016	0.548	2.470	13.085	2.976903e- 04	7.602793e- 03	Up
NALF2	613918	- 0.929	1.937	12.951	3.197329e- 04	8.051093e- 03	Down
ANPEP	404191	1.438	1.237	12.920	3.250987e- 04	8.171589e- 03	Up
ARMC12	540812	- 1.666	2.657	12.858	3.360069e- 04	8.378254e- 03	Down
GRIP2	509537	0.759	4.130	12.853	3.368920e- 04	8.378254e- 03	Up
CIART	104968463	1.023	2.635	12.825	3.419539e- 04	8.459301e- 03	Up
ECE2	281134	- 0.794	1.485	12.803	3.461351e- 04	8.541292e- 03	Down
WLS	528123	- 0.547	3.965	12.798	3.469594e- 04	8.541292e- 03	Down
C6H4orf54	101904203	- 0.632	7.092	12.786	3.492634e- 04	8.578639e- 03	Down
SLC25A17	506631	0.528	3.615	12.749	3.562403e- 04	8.705623e- 03	Up
CPQ	540923	1.327	-0.328	12.709	3.639935e- 04	8.864313e- 03	Up
ARPP21	618648	- 0.523	5.590	12.697	3.662638e- 04	8.900840e- 03	Down
		- 0.866	0.945	12.694	3.667581e- 04	8.900840e- 03	Down
BCL7A	616240	- 0.760	1.225	12.678	3.700250e- 04	8.964667e- 03	Down
LRRC8D	539204	- 0.706	1.981	12.673	3.710168e- 04	8.973251e- 03	Down
PTGER4	282331	- 0.533	3.795	12.637	3.781916e- 04	9.084343e- 03	Down
CXCL3	613667	- 1.158	2.526	12.606	3.845935e- 04	9.206697e- 03	Down
RCN2	512717	0.608	3.878	12.586	3.886676e- 04	9.256997e- 03	Up
SHLD2	508335	0.613	2.406	12.561	3.938919e- 04	9.349784e- 03	Up
PRL	280901	- 1.817	-0.637	12.553	3.955638e- 04	9.373663e- 03	Down
		- 0.914	1.196	12.538	3.987377e- 04	9.432994e- 03	Down
HR	785815	- 0.650	3.326	12.532	4.001332e- 04	9.450127e- 03	Down

KLHDC8B	527321	0.578	2.418	12.429	4.227598e-04	9.901444e-03	Up
CDKN2C	505691	0.594	3.013	12.414	4.261148e-04	9.946917e-03	Up
ZNF641	538714	-0.706	2.113	12.395	4.304408e-04	9.998160e-03	Down
LNPEP	521633	-0.632	5.240	12.392	4.311911e-04	9.999088e-03	Down
NUP43	520174	0.534	4.851	12.370	4.363497e-04	1.005247e-02	Up
HOXA7	615851	-0.632	1.930	12.356	4.395141e-04	1.009254e-02	Down
		-0.667	2.297	12.356	4.395232e-04	1.009254e-02	Down
COL27A1	513668	0.697	2.302	12.351	4.407077e-04	1.010326e-02	Up
RNF24	767991	-1.181	-0.195	12.340	4.434357e-04	1.011925e-02	Down
PRPS2	537688	0.856	0.987	12.338	4.438255e-04	1.011925e-02	Up
ZNF827	104974573	-0.696	2.108	12.337	4.441570e-04	1.011925e-02	Down
PYGB	505560	-0.507	2.379	12.312	4.500253e-04	1.020057e-02	Down
TMBIM1	404134	0.514	5.958	12.301	4.526744e-04	1.024412e-02	Up
AVPI1	614488	-0.549	4.105	12.277	4.585218e-04	1.034319e-02	Down
ZNF239	100848535	0.638	2.512	12.137	4.942433e-04	1.111211e-02	Up
TSPYL5	615997	-0.809	1.300	12.117	4.996350e-04	1.119883e-02	Down
NR4A3	528877	2.570	5.275	12.108	5.019435e-04	1.123268e-02	Up
PLEKHA6	107133475	0.728	1.533	12.102	5.037624e-04	1.125549e-02	Up
CEBPD	281678	-1.246	5.193	12.094	5.057281e-04	1.128150e-02	Down
MYF5	281335	0.796	1.272	12.038	5.211393e-04	1.155206e-02	Up
HMGCLL1	535508	1.058	0.925	11.992	5.342611e-04	1.175040e-02	Up
CCNB1IP1	615932	0.719	1.907	11.959	5.439146e-04	1.189944e-02	Up
		0.685	1.994	11.953	5.456383e-04	1.190760e-02	Up
HRH2	521257	0.977	2.720	11.935	5.509584e-04	1.198654e-02	Up

TUFT1	282104	0.944	1.183	11.898	5.618211e-04	1.216114e-02	Up
BTBD11	539986	- 1.238	1.964	11.893	5.633736e-04	1.216265e-02	Down
NAV2	100139508	- 0.764	3.734	11.872	5.697933e-04	1.226363e-02	Down
		0.936	2.549	11.863	5.727074e-04	1.230524e-02	Up
		0.605	3.284	11.860	5.734752e-04	1.230524e-02	Up
NSMF	615854	0.534	3.777	11.847	5.775859e-04	1.235577e-02	Up
MGST1	493719	0.851	2.142	11.783	5.977609e-04	1.266707e-02	Up
FLT4	338031	1.279	0.383	11.781	5.984372e-04	1.266707e-02	Up
MAP3K13	505369	- 0.837	0.228	11.777	5.995192e-04	1.267092e-02	Down
KLF13	789710	- 0.723	2.011	11.773	6.009920e-04	1.268300e-02	Down
DNAJA4	528615	- 0.704	6.009	11.695	6.266114e-04	1.312432e-02	Down
TIAM2	100139161	0.771	2.268	11.691	6.281495e-04	1.312432e-02	Up
MYOM3	532872	- 0.705	7.599	11.688	6.289607e-04	1.312432e-02	Down
RUNDC1	539525	- 0.557	2.837	11.677	6.327756e-04	1.315650e-02	Down
HPCAL4	531339	- 0.881	3.007	11.624	6.511271e-04	1.343880e-02	Down
ADAMTS3	534082	- 1.418	-0.258	11.592	6.623313e-04	1.363008e-02	Down
MAPK4	529183	1.320	1.652	11.568	6.710676e-04	1.375909e-02	Up
GYG2	505258	0.560	3.677	11.513	6.912206e-04	1.408049e-02	Up
PHTF2	520774	0.511	5.744	11.507	6.933434e-04	1.410333e-02	Up
SAMD11	100140500	0.714	3.044	11.474	7.057187e-04	1.431368e-02	Up
PCK2	282856	1.262	0.649	11.443	7.176328e-04	1.449268e-02	Up
GPR19	540647	- 1.242	-0.275	11.425	7.247010e-04	1.459355e-02	Down
LOC100337457	100337457	- 0.630	4.243	11.402	7.334905e-04	1.470743e-02	Down
SLC16A13	538855	0.784	1.928	11.396	7.359204e-04	1.471443e-02	Up

RFX2	534475	- 1.091	2.703	11.396	7.359306e- 04	1.471443e- 02	Down
GSS	525059	0.579	2.180	11.367	7.476323e- 04	1.486394e- 02	Up
CLU	280750	0.522	5.416	11.361	7.500079e- 04	1.489014e- 02	Up
CALHM5	101903708	- 0.606	2.166	11.342	7.575400e- 04	1.499737e- 02	Down
GPRC5B	516334	0.567	3.360	11.326	7.644017e- 04	1.510194e- 02	Up
		- 1.205	-0.164	11.300	7.749560e- 04	1.525520e- 02	Down
FAM174C	616355	- 0.666	1.724	11.284	7.817825e- 04	1.534780e- 02	Down
SLC6A1	407118	0.619	4.865	11.262	7.911888e- 04	1.548699e- 02	Up
CHODL	613942	0.690	2.638	11.257	7.932738e- 04	1.548699e- 02	Up
TMCC2	768080	- 0.847	0.475	11.251	7.959468e- 04	1.551766e- 02	Down
LHX6	541261	- 0.778	2.868	11.229	8.054726e- 04	1.563839e- 02	Down
COL4A1	282191	- 0.585	9.109	11.181	8.263751e- 04	1.597810e- 02	Down
TANC2	529494	0.620	3.990	11.154	8.384891e- 04	1.616791e- 02	Up
ADIPOR2	407234	- 0.520	6.016	11.113	8.570850e- 04	1.636951e- 02	Down
		- 0.519	3.732	11.104	8.614925e- 04	1.640916e- 02	Down
SPATA7	510352	0.509	3.673	11.068	8.783392e- 04	1.666240e- 02	Up
MIR29E	100313099	1.275	0.156	11.056	8.840224e- 04	1.674764e- 02	Up
MCCC1	513504	0.587	3.456	11.042	8.905065e- 04	1.682519e- 02	Up
PLXDC1	536989	0.768	3.186	10.992	9.150405e- 04	1.724245e- 02	Up
CBX6	513830	- 0.533	2.240	10.989	9.163283e- 04	1.724363e- 02	Down
CNTN1	281705	1.052	0.096	10.978	9.221056e- 04	1.732918e- 02	Up
APOE	281004	0.727	3.063	10.975	9.236108e- 04	1.733433e- 02	Up
CSRP2	539381	- 0.643	2.202	10.953	9.346719e- 04	1.747203e- 02	Down
FAM185A	531996	- 0.673	2.054	10.948	9.368457e- 04	1.748944e- 02	Down

HID1	540436	- 0.584	3.691	10.938	9.420550e- 04	1.756340e- 02	Down
NGFR	353110	1.154	-0.060	10.931	9.456152e- 04	1.760645e- 02	Up
EFS	508559	0.818	1.032	10.889	9.671211e- 04	1.795936e- 02	Up
ADAMTS9	537051	0.572	4.864	10.877	9.735796e- 04	1.805548e- 02	Up
		- 1.465	1.249	10.857	9.843325e- 04	1.817789e- 02	Down
ITGB6	282644	0.623	5.033	10.855	9.853460e- 04	1.817789e- 02	Up
THAP1	538615	- 0.643	1.784	10.851	9.871608e- 04	1.818753e- 02	Down
KLHL40	514526	- 0.835	7.523	10.843	9.915544e- 04	1.822224e- 02	Down
PI16	507058	0.730	3.838	10.843	9.916335e- 04	1.822224e- 02	Up
RRS1	510956	- 0.569	2.885	10.834	9.966516e- 04	1.829057e- 02	Down
GLDC	507688	1.662	-0.698	10.830	9.988138e- 04	1.830638e- 02	Up
PTER	782020	0.599	3.813	10.812	1.008505e- 03	1.841038e- 02	Up
KIF4A	537127	0.660	2.631	10.809	1.009887e- 03	1.841038e- 02	Up
ATF5	515654	0.897	2.459	10.778	1.026881e- 03	1.857889e- 02	Up
TMEM86A	532018	- 0.699	1.811	10.775	1.028575e- 03	1.858566e- 02	Down
		1.081	0.164	10.746	1.045157e- 03	1.883691e- 02	Up
PVR	526865	0.571	5.465	10.740	1.048707e- 03	1.887672e- 02	Up
FAT4	781683	- 0.570	4.438	10.705	1.068423e- 03	1.911111e- 02	Down
CHRNA3	282702	0.901	1.529	10.691	1.076408e- 03	1.922782e- 02	Up
GLMN	504211	0.514	2.584	10.672	1.087522e- 03	1.932824e- 02	Up
PTGDR	515331	- 0.582	4.486	10.652	1.099625e- 03	1.946959e- 02	Down
TMEM25	504393	1.097	0.890	10.631	1.111951e- 03	1.959083e- 02	Up
MANBA	281909	0.820	2.138	10.628	1.114000e- 03	1.959083e- 02	Up
		1.239	-0.214	10.626	1.114823e- 03	1.959083e- 02	Up

DIRAS1	618387	1.182	-0.437	10.617	1.120607e-03	1.963330e-02	Up
RILPL2	533228	-0.685	2.539	10.591	1.136698e-03	1.985132e-02	Down
NT5E	281363	0.794	0.978	10.586	1.139243e-03	1.987111e-02	Up
NEK8	532332	0.928	0.173	10.580	1.143127e-03	1.988957e-02	Up
LOC112445076	112445076	-0.634	1.718	10.560	1.155436e-03	2.000482e-02	Down
CHST1	506932	0.513	3.435	10.544	1.165364e-03	2.012719e-02	Up
SPTLC3	100336940	-0.604	3.056	10.535	1.171588e-03	2.018515e-02	Down
LIPG	509808	1.144	1.716	10.514	1.184823e-03	2.032561e-02	Up
FASN	281152	0.805	5.187	10.503	1.191793e-03	2.038643e-02	Up
AACS	505842	0.527	2.353	10.485	1.203771e-03	2.052053e-02	Up
MYH15	526674	1.549	-0.042	10.469	1.213927e-03	2.064440e-02	Up
PAQR6	516498	0.517	2.965	10.455	1.223385e-03	2.077246e-02	Up
SEMA5A	506636	-0.508	2.750	10.448	1.227615e-03	2.081916e-02	Down
DYNC2I2	531489	-0.539	2.231	10.444	1.230497e-03	2.082849e-02	Down
		0.634	3.229	10.443	1.231124e-03	2.082849e-02	Up
ABRACL	505914	-1.109	0.354	10.408	1.254893e-03	2.112903e-02	Down
PRR32	783116	1.312	3.292	10.402	1.258782e-03	2.114393e-02	Up
MIR133A-1	100313361	0.840	1.473	10.381	1.273351e-03	2.133103e-02	Up
DDR1	534092	0.622	3.831	10.379	1.274368e-03	2.133103e-02	Up
NUPR2	614047	0.795	0.626	10.370	1.281107e-03	2.141671e-02	Up
KIF3C	777770	0.530	2.715	10.354	1.292283e-03	2.152450e-02	Up
CDH6	537946	-0.889	0.180	10.350	1.294959e-03	2.152450e-02	Down
VMAC	515212	0.733	1.202	10.349	1.295201e-03	2.152450e-02	Up
B4GALT4	511328	0.541	1.940	10.346	1.297848e-03	2.154305e-02	Up

LOC100297302	100297302	0.521	3.029	10.336	1.304693e-03	2.161353e-02	Up
OLFML2B	513053	0.595	3.360	10.327	1.310778e-03	2.163165e-02	Up
TTC12	515758	1.245	-0.444	10.327	1.311185e-03	2.163165e-02	Up
SETBP1	617265	0.702	4.151	10.325	1.312406e-03	2.163165e-02	Up
SFRP2	510821	-0.991	0.713	10.309	1.324061e-03	2.171135e-02	Down
NECAB3	514695	0.768	1.964	10.296	1.333205e-03	2.177633e-02	Up
		0.831	1.089	10.295	1.333560e-03	2.177633e-02	Up
ST3GAL1	282351	-0.948	0.981	10.289	1.338466e-03	2.183111e-02	Down
		-0.756	1.995	10.274	1.348937e-03	2.190789e-02	Down
KIAA0895L	512420	1.180	-0.305	10.225	1.385533e-03	2.236555e-02	Up
ALKAL2	616690	1.115	-0.717	10.216	1.392408e-03	2.242510e-02	Up
MTAP	782907	-0.597	1.874	10.175	1.423394e-03	2.287180e-02	Down
		-1.510	2.618	10.132	1.457256e-03	2.330255e-02	Down
LMCD1	540474	0.548	6.878	10.131	1.458222e-03	2.330255e-02	Up
		-1.445	-0.734	10.124	1.463463e-03	2.335568e-02	Down
RAB7B	538050	-0.517	3.110	10.104	1.479488e-03	2.355801e-02	Down
TEX9	518432	0.910	1.106	10.098	1.484447e-03	2.361026e-02	Up
CYP51A1	505060	0.662	2.539	10.090	1.490362e-03	2.367757e-02	Up
ESPNL	524380	-0.634	1.637	10.058	1.516851e-03	2.399623e-02	Down
TAGLN	513463	-0.659	5.493	10.044	1.528517e-03	2.407591e-02	Down
IFRD1	541283	0.798	5.686	10.035	1.535531e-03	2.412291e-02	Up
B3GNT6	540848	1.946	-0.615	10.026	1.543049e-03	2.421400e-02	Up
CYP2R1	541302	-0.736	2.331	10.010	1.557308e-03	2.438338e-02	Down
CHAC1	505991	-1.594	-0.328	9.991	1.572831e-03	2.459908e-02	Down

		1.250	-0.015	9.987	1.576269e-03	2.462548e-02	Up
SAYSD1	618888	-0.757	0.860	9.978	1.583813e-03	2.468855e-02	Down
		1.251	-0.182	9.975	1.587167e-03	2.471346e-02	Up
ZSCAN2	539320	-0.677	1.566	9.972	1.589009e-03	2.471479e-02	Down
GLIPR1	767905	-1.500	-0.669	9.951	1.607252e-03	2.484169e-02	Down
CDK5R1	282173	-0.739	0.600	9.924	1.631328e-03	2.509571e-02	Down
ROS1	100336768	1.204	0.812	9.899	1.653770e-03	2.538546e-02	Up
SCN4B	538100	-0.631	7.113	9.875	1.675178e-03	2.561564e-02	Down
		-0.617	2.307	9.874	1.676045e-03	2.561564e-02	Down
		0.521	2.202	9.871	1.678720e-03	2.561831e-02	Up
PMS1	529491	-0.511	3.661	9.869	1.680529e-03	2.561831e-02	Down
CFAP70	529891	0.625	1.928	9.859	1.689996e-03	2.568939e-02	Up
		-0.533	2.789	9.843	1.704698e-03	2.585704e-02	Down
SLC46A1	511097	0.714	1.375	9.823	1.723260e-03	2.611045e-02	Up
STMN2	534991	2.015	-0.834	9.777	1.767186e-03	2.666120e-02	Up
NIPAL3	616724	-0.566	1.764	9.765	1.779080e-03	2.681191e-02	Down
PREX1	527410	-0.629	3.108	9.759	1.784456e-03	2.686417e-02	Down
TNK2	280710	-0.522	5.643	9.756	1.787755e-03	2.688508e-02	Down
		1.101	-0.414	9.739	1.804277e-03	2.702435e-02	Up
LOC104968656	104968656	0.552	2.325	9.728	1.814981e-03	2.714949e-02	Up
MFAP4	286766	0.711	1.720	9.725	1.818263e-03	2.716972e-02	Up
TMEM88	507172	-0.523	3.079	9.721	1.821483e-03	2.718896e-02	Down
GLI2	510255	0.611	1.639	9.715	1.827926e-03	2.725624e-02	Up
HOXC4	613740	0.950	0.313	9.705	1.837486e-03	2.736979e-02	Up

PMVK	513533	0.584	1.706	9.698	1.844914e-03	2.745138e-02	Up
		-1.020	-0.026	9.695	1.847995e-03	2.746648e-02	Down
MAOA	281293	-0.543	3.348	9.689	1.853651e-03	2.746648e-02	Down
LYPD6	100337491	0.942	0.960	9.687	1.855567e-03	2.746648e-02	Up
GLIS2	527935	0.552	3.147	9.687	1.856068e-03	2.746648e-02	Up
		0.724	0.765	9.674	1.869280e-03	2.758070e-02	Up
ZNF367	540823	0.586	1.813	9.647	1.896820e-03	2.790867e-02	Up
TECRL	616643	0.547	3.224	9.641	1.902588e-03	2.795494e-02	Up
		0.655	2.058	9.638	1.905738e-03	2.797202e-02	Up
AKAP7	613606	0.774	1.838	9.631	1.913463e-03	2.802994e-02	Up
WEE1	540322	0.515	3.116	9.631	1.913666e-03	2.802994e-02	Up
AGTR1	281607	-0.535	3.103	9.606	1.939847e-03	2.832374e-02	Down
ZC3H12C	512586	0.597	3.321	9.605	1.940465e-03	2.832374e-02	Up
MLLT11	539519	0.671	3.099	9.600	1.945798e-03	2.832374e-02	Up
PIGZ	104968672	0.648	3.135	9.584	1.962688e-03	2.854007e-02	Up
ALDH1L2	516864	0.718	1.591	9.545	2.005226e-03	2.906855e-02	Up
RCAN2	525636	-0.653	2.521	9.534	2.017082e-03	2.911032e-02	Down
RNF168	613812	-0.532	4.075	9.533	2.017562e-03	2.911032e-02	Down
ARRDC3	541123	-0.733	5.251	9.533	2.018448e-03	2.911032e-02	Down
SLC27A6	537062	-1.507	2.743	9.530	2.021434e-03	2.912355e-02	Down
KLF11	616730	-0.704	6.227	9.523	2.028852e-03	2.917755e-02	Down
ADAMTS4	286806	-1.015	1.463	9.518	2.035161e-03	2.921619e-02	Down
FRZB	281170	0.781	5.051	9.517	2.036167e-03	2.921619e-02	Up
ACTG2	281595	-1.164	2.094	9.506	2.047892e-03	2.935381e-02	Down

EDEM2	513253	- 0.522	2.626	9.489	2.067627e- 03	2.955798e- 02	Down
RPP38	511723	- 0.549	1.733	9.488	2.068387e- 03	2.955798e- 02	Down
NTRK2	505824	0.928	0.866	9.472	2.086219e- 03	2.975240e- 02	Up
NEDD4	507781	0.685	5.582	9.466	2.093198e- 03	2.982171e- 02	Up
THOC3	529231	- 0.521	2.526	9.458	2.102592e- 03	2.986487e- 02	Down
CPPED1	537938	- 0.627	0.892	9.451	2.109824e- 03	2.993738e- 02	Down
MTMR9	521746	- 0.503	2.882	9.409	2.158866e- 03	3.051024e- 02	Down
METTL21C	519447	1.119	2.833	9.342	2.239316e- 03	3.142633e- 02	Up
PDXK	514168	- 0.647	4.653	9.324	2.261207e- 03	3.164552e- 02	Down
TMEM132C	512602	1.185	-0.005	9.316	2.272122e- 03	3.176007e- 02	Up
TRIM63	528912	- 0.741	7.464	9.302	2.289253e- 03	3.190448e- 02	Down
LOC536229	536229	0.754	1.177	9.287	2.307997e- 03	3.210215e- 02	Up
GPAM	497202	0.623	5.552	9.281	2.315903e- 03	3.214857e- 02	Up
ROCK2	282041	- 0.628	7.710	9.269	2.330331e- 03	3.231698e- 02	Down
PHTF1	536504	- 0.520	2.288	9.259	2.343069e- 03	3.246166e- 02	down
GLUL	281199	- 0.590	9.651	9.249	2.356857e- 03	3.254046e- 02	down
THBS2	338092	- 0.728	2.783	9.206	2.411919e- 03	3.321841e- 02	down
SPAAR	112441516	- 0.733	1.265	9.183	2.442767e- 03	3.351305e- 02	down
GPR21	519193	1.186	0.012	9.168	2.462247e- 03	3.370133e- 02	up
UCK2	541028	- 0.655	1.344	9.155	2.480817e- 03	3.383719e- 02	down
COLEC10	512030	- 1.676	-0.843	9.152	2.484951e- 03	3.386076e- 02	down
CITED2	521378	- 0.524	4.289	9.144	2.495985e- 03	3.390309e- 02	down
HSPB1	516099	- 0.625	8.809	9.141	2.499568e- 03	3.390309e- 02	down
SLC20A1	514255	0.589	5.695	9.122	2.526210e- 03	3.415844e- 02	up

PYCR1	539606	0.715	1.865	9.119	2.529098e-03	3.416466e-02	up
		0.540	2.611	9.111	2.540403e-03	3.422189e-02	up
HOXA4	538865	-0.630	2.634	9.111	2.540628e-03	3.422189e-02	down
HPGD	512259	-0.676	1.949	9.076	2.589875e-03	3.472043e-02	down
AMPD3	519803	-1.105	3.011	9.075	2.591084e-03	3.472043e-02	down
NRROS	510688	-0.578	2.262	9.040	2.641731e-03	3.514651e-02	down
MYL6B	515421	0.746	8.771	9.027	2.660103e-03	3.535751e-02	up
SLC35E4	523783	-0.839	1.259	9.022	2.667261e-03	3.541921e-02	down
ADCY1	281601	1.177	-0.595	9.020	2.671119e-03	3.542252e-02	up
TLE2	533595	0.527	3.018	9.019	2.672543e-03	3.542252e-02	up
KLK10	526736	-1.158	0.739	9.006	2.691538e-03	3.557380e-02	down
		1.269	0.280	8.999	2.700679e-03	3.563322e-02	up
		0.579	1.828	8.979	2.730652e-03	3.585509e-02	up
MIDN	523615	0.592	5.034	8.967	2.748942e-03	3.602556e-02	up
CPEB1	514174	1.354	-0.642	8.966	2.749959e-03	3.602556e-02	up
LOC515676	515676	-1.368	3.108	8.965	2.751312e-03	3.602556e-02	down
COL23A1	613347	1.189	-0.742	8.929	2.806974e-03	3.655038e-02	up
PGM3	505648	0.503	2.257	8.925	2.813083e-03	3.659608e-02	up
		-0.786	0.618	8.920	2.820719e-03	3.666154e-02	down
FBP1	513483	2.224	-0.819	8.873	2.894640e-03	3.751837e-02	up
SCML1	786670	0.671	1.857	8.853	2.926603e-03	3.779346e-02	up
THBS3	504323	0.723	1.317	8.849	2.932770e-03	3.783837e-02	up
SYCE2	100141142	0.953	-0.216	8.841	2.946097e-03	3.794077e-02	up
LOC100296900	100296900	0.718	0.442	8.828	2.966467e-03	3.809853e-02	up

		0.623	1.237	8.784	3.039603e-03	3.872926e-02	up
PITX3	512000	-0.910	2.903	8.783	3.040341e-03	3.872926e-02	down
FMNL2	788312	-0.516	3.614	8.777	3.050232e-03	3.880486e-02	down
FGF2	281161	0.538	2.139	8.764	3.072322e-03	3.899549e-02	up
HPS6	511792	-0.700	1.065	8.762	3.076428e-03	3.901243e-02	down
MNS1	532884	0.600	1.989	8.757	3.084159e-03	3.903512e-02	up
RFXAP	540760	-0.624	1.586	8.750	3.096763e-03	3.912930e-02	down
LOC508459	508459	-1.249	0.639	8.741	3.111263e-03	3.924206e-02	down
		-0.515	2.455	8.732	3.126053e-03	3.939331e-02	down
PNLDC1	615807	0.586	3.161	8.715	3.156301e-03	3.968554e-02	up
PDE10A	506061	-0.846	0.990	8.703	3.177169e-03	3.982353e-02	down
FAM221A	505226	1.931	-0.520	8.697	3.186894e-03	3.989711e-02	up
CCDC28B	507607	0.592	1.599	8.684	3.209500e-03	4.001977e-02	up
DLK1	281117	0.855	4.434	8.681	3.215947e-03	4.002446e-02	up
GFRA4	618480	1.004	-0.180	8.678	3.220883e-03	4.005049e-02	up
ZFP64	539018	-0.675	0.535	8.672	3.230490e-03	4.013449e-02	down
		1.191	0.243	8.658	3.255975e-03	4.033343e-02	up
CD247	281056	-0.820	2.440	8.643	3.282954e-03	4.050032e-02	down
ELL2	782605	0.607	4.193	8.638	3.291454e-03	4.052624e-02	up
HSD17B11	527592	-0.525	2.585	8.598	3.364864e-03	4.122178e-02	down
		1.346	-0.230	8.569	3.419904e-03	4.178695e-02	up
FAM222A	617781	-1.171	0.670	8.559	3.437721e-03	4.196823e-02	down
TFPI	508763	-0.661	1.529	8.551	3.452671e-03	4.211190e-02	down
FEM1C	541180	-0.566	5.164	8.550	3.455473e-03	4.211190e-02	down

CASP3	408016	- 0.567	3.106	8.546	3.462411e- 03	4.215995e- 02	down
SLC41A3	524085	0.552	3.022	8.534	3.485753e- 03	4.237086e- 02	up
MINDY4	615509	0.711	1.136	8.529	3.496095e- 03	4.245991e- 02	up
VPS9D1	514538	0.537	2.885	8.506	3.538873e- 03	4.279213e- 02	up
DENND5B	516544	- 0.503	3.249	8.505	3.542085e- 03	4.279213e- 02	down
ASAP3	523797	0.616	2.256	8.504	3.543045e- 03	4.279213e- 02	up
NOS3	287024	0.603	4.768	8.484	3.582389e- 03	4.298867e- 02	up
DNAJB5	540083	- 0.575	6.741	8.474	3.602865e- 03	4.309529e- 02	down
RIMKLB	538579	0.667	1.506	8.472	3.606582e- 03	4.309529e- 02	up
ZFHX4	539762	- 0.525	4.150	8.442	3.667247e- 03	4.362163e- 02	down
PPFIBP2	104974256	0.587	4.875	8.441	3.668341e- 03	4.362163e- 02	up
SH3RF2	540718	0.810	3.020	8.436	3.677763e- 03	4.362163e- 02	up
SINHCAF	538649	- 0.553	1.499	8.405	3.742495e- 03	4.408314e- 02	down
IGFBP5	404185	0.756	6.510	8.400	3.752941e- 03	4.416923e- 02	up
LCN1	511158	- 2.365	0.381	8.362	3.830467e- 03	4.485662e- 02	down
HES4	507480	0.765	1.150	8.360	3.835573e- 03	4.487859e- 02	up
		1.012	-0.545	8.359	3.838720e- 03	4.487859e- 02	up
SPON2	513844	0.569	2.079	8.352	3.851675e- 03	4.492625e- 02	up
		- 0.807	1.102	8.345	3.867951e- 03	4.492625e- 02	down
EFEMP1	511566	0.545	2.802	8.340	3.877905e- 03	4.492625e- 02	up
		- 0.652	2.172	8.314	3.935051e- 03	4.539715e- 02	down
KIF26B	101902369	- 1.102	0.594	8.311	3.941128e- 03	4.539715e- 02	down
COL4A2	508632	- 0.502	8.190	8.308	3.946748e- 03	4.542471e- 02	down
		0.679	1.661	8.300	3.964521e- 03	4.559200e- 02	up

TMEM140	515475	- 0.521	4.557	8.297	3.971284e- 03	4.563248e- 02	down
LOC107131530	107131530	0.747	0.837	8.288	3.990616e- 03	4.577988e- 02	up
TMEM220	504970	0.588	1.078	8.284	3.998953e- 03	4.580087e- 02	up
CARNMT1	538441	- 0.556	3.908	8.278	4.012376e- 03	4.591724e- 02	down
TRIM59	540154	1.006	-0.624	8.247	4.082779e- 03	4.668496e- 02	up
ZNF713	100126443	0.698	0.490	8.230	4.120108e- 03	4.699728e- 02	up
		0.968	-0.070	8.212	4.162538e- 03	4.735328e- 02	up
RAB29	539000	- 0.541	2.133	8.188	4.216553e- 03	4.788150e- 02	down
AQP1	282653	0.742	6.265	8.187	4.219023e- 03	4.788150e- 02	up
FAM107B	535023	- 0.670	1.891	8.186	4.221437e- 03	4.788150e- 02	down
		- 0.554	1.859	8.147	4.312185e- 03	4.871453e- 02	down
MIR2350	100313332	0.661	1.332	8.144	4.321534e- 03	4.874192e- 02	up
ZBTB42	789062	- 0.948	-0.253	8.129	4.355112e- 03	4.900285e- 02	down
C8H9orf85	614778	- 0.632	0.985	8.126	4.362647e- 03	4.901533e- 02	down
DOCK5	505572	0.531	1.750	8.123	4.370051e- 03	4.901533e- 02	up
CD38	327677	- 0.695	1.693	8.115	4.389197e- 03	4.918976e- 02	down
SDF2L1	517962	- 0.982	-0.001	8.098	4.430515e- 03	4.952627e- 02	down
KCNN1	408008	- 1.235	-0.323	8.097	4.433298e- 03	4.952627e- 02	down
SERINC5	504658	- 0.588	2.966	8.089	4.453910e- 03	4.971708e- 02	down
PAQR8	531018	- 0.590	1.986	8.069	4.503630e- 03	4.999456e- 02	down