

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE
ÁGUA EM BOVINOS DE CORTE DA RAÇA NELORE CRIADOS A PASTO**

Victoria Cerbi

Jaboticabal – SP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE
ÁGUA EM BOVINOS DE CORTE DA RAÇA NELORE CRIADOS A PASTO**

Victoria Cerbi

Orientador: Prof. Dr. Danísio Prado Munari
Coorientador: Dr. Rafael Nakamura Watanabe

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para graduação em Zootecnia.

JABOTICABAL – SP

1º Semestre/2022

C411e	Cerbi, Victoria Expressão de genes associados à frequência de consumo de água em bovinos de corte da raça Nelore criados a pasto / Victoria Cerbi. -- Jaboticabal, 2022 31 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Danísio Prado Munari Coorientador: Rafael Nakamura Watanabe 1. Expressão gênica. 2. Adaptação. 3. Pastagem. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



DEPARTAMENTO: Engenharia e Ciências Exatas.

CERTIFICADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ÁGUA EM BOVINOS DE CORTE DA RAÇA NELORE CRIADOS A PASTO.

ACADÊMICO: Victoria Cerbi

CURSO: Zootecnia

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Danísio Prado Munari

PERÍODO: Semestre 09 Ano 2022

Aprovado com conceito: A ☐ B ☐ C ☒

Este trabalho é recomendado para compor a base de dados CAPELO. ☐ Sim ☐ Não

Reprovado: ☐

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)
Presidente	Dr. Rafael Nakamura Watanabe
Membro	MSc. Ana Carolina Almeida Rollo de Paz
Membro	MSc. Larissa Graciano Braga

(Assinaturas)

Jaboticabal 22 / 8 / 2022.

Aprovado "ad referendum" do Conselho do Departamento em: 22 / 8 / 2022.

Prof. Dr. Glauco de Souza Rolim
Substituto eventual da chefia do DECEX

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha irmã que sempre me deram muito apoio, incentivo e são responsáveis por esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que sempre iluminou meu caminho, me dando força, saúde e proteção, e colaborou muito para todo este acontecimento.

Sou grata aos meus pais, Antônio e Vânia, que sempre priorizaram minha educação, incentivando e apoiando todas as vezes que precisei, à minha irmã Sophia que tem uma admiração por mim e me considera um exemplo.

À FCAV, pela oportunidade de realizar o curso, pelos aprendizados e pelo crescimento pessoal.

Aos meus amigos de turma, que sempre me ajudaram muito e foram bons companheiros.

Ao meu namorado Guilherme, pela compreensão, apoio e carinho durante toda essa trajetória.

E principalmente ao meu orientador, Prof. Dr. Danísio Prado Munari e ao meu coorientador, Rafael Nakamura Watanabe pela oportunidade e auxílio na elaboração deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - 2019/26420-2.

INDÍCE

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1 CONSUMO DE ÁGUA EM BOVINOS DE CORTE	10
3.2 ADAPTAÇÃO DO NELORE AO CLIMA TROPICAL	10
3.3 RNA-SEQ	11
3.4 EXPRESSÃO GÊNICA	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E ANIMAIS.....	14
4.2 OBSERVAÇÃO DO COMPORTAMENTO E SELEÇÃO DE ANIMAIS EXTREMO	14
4.3 RNA-SEQ	15
4.4 ANÁLISE COMPUTACIONAL	15
5. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSSÃO.....	19
7. CONCLUSÃO	22
RESUMO.....	23
SUMMARY	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
APÊNDICE 1	30

INTRODUÇÃO

Há alguns motivos pelos quais os animais Nelore são adaptados ao clima do Brasil, os bovinos da raça Nelore se adaptaram ao clima tropical brasileiro por possuírem resistência natural a parasitas devido às características de seus pelos (claros, curtos, densos e medulados), que dificultam a entrada de pequenos insetos na superfície da pele ou que tentam se fixar na mesma. O Nelore é resistente ao calor pois sua superfície corporal é maior em relação ao corpo e por ter maior número de glândulas sudoríparas. Os aspectos do pelo como coloração branca, pele preta ou escura, solta, fina, flexível, macia e oleosa também ajudam a troca de calor com o ambiente. E ainda, o trato digestivo é 10% menor comparado com o de bovinos de raças europeias. Logo, seu metabolismo é mais lento e gera pouca quantidade de calor (ACNB, 2006).

O animal que não consome água suficiente pode apresentar diversos problemas de sanidade, o que prejudica a qualidade da carne e gera perdas econômicas. A água é um insumo produtivo e um recurso natural limitado, isso evidencia a necessidade da preservação e conservação para a garantia de quantidade e qualidade. O tema é de relevância para a produção animal, mas ainda é tratado por técnicos e produtores de forma marginal e pontual. É preciso que o manejo hídrico se torne uma prática do cotidiano, assim como o manejo nutricional, reprodutivo e sanitário (EMBRAPA, 2013).

Um dos fatores que explicam o sucesso da pecuária no Brasil é justamente a disponibilidade de recursos hídricos e de solos para o cultivo de pastagens, mas a produção de bovinos ainda não é hidricamente sustentável. Porém, por meio de técnicas adequadas, é possível produzir carne e leite de qualidade e conservar os recursos hídricos, garantindo segurança sanitária e ambiental. Além disso, o produtor deve conhecer e aplicar a legislação relacionada aos padrões de qualidade da água para bovinos e ao

descarte de efluentes no solo e em corpos de água naturais (EMBRAPA, 2013). Diante do exposto, é importante conhecer os genes que influenciam o consumo de água em bovinos da raça Nelore. Uma técnica para tal é o RNA-seq.

O RNA-Seq é uma técnica que consegue analisar padrões da expressão gênica por meio do sequenciamento de grande escala do RNA de uma célula. O RNA-Seq é usado para conhecer quais genes são ativados em uma célula ou tecido, seu nível de expressão e em qual momento os mesmos são ativados ou desativados. Portanto, o sequenciamento de RNA é usado para analisar a expressão de um gene em diferentes células ou tecidos, obtendo pistas sobre sua possível função (SAFADY, 2021).

O sequenciamento de alto rendimento tornou-se a principal escolha para medir os níveis de expressão, ou seja, RNA-Seq (MORTAZAVI et al., 2008). O RNA-Seq pode ser realizado sem conhecimento prévio da referência ou sequência de interesse e permite ampla variedade de aplicações, tais como: reconstrução “de novo” do transcriptoma (sem um genoma de referência), avaliação de variantes genômicas e de padrões de metilação (COKUS et al., 2008).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar a expressão de genes relacionados à frequência de consumo de água em bovinos de corte da raça Nelore criados a pasto, a fim de proporcionar maior conhecimento na seleção de animais mais adaptados e sustentáveis.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CONSUMO DE ÁGUA EM BOVINOS DE CORTE

A água atua como solvente, meio de transporte de substâncias, participa de reações de hidrólises, atua como lubrificante e tampão, sendo importante fator na regulação térmica dos indivíduos. Os animais possuem, aproximadamente, 2/3 do seu peso corporal formado por água, transformando-a no nutriente de maior relevância na alimentação dos animais. A água pode ser obtida por três formas, consumo voluntário, água ingerida junto com alimentos e água resultante de reações do organismo (OLIVEIRA et al., 2016).

Os bovinos são menos suscetíveis a escassez de água do que os monogástricos. O pré-estômago oferece armazenamento de líquidos que pode ser utilizado em fases de rápida falta de água. De qualquer modo, o suprimento de água não deve ser ignorado para estes animais. Vários aspectos estão ligados a exigência de água pelos bovinos. Estes aspectos podem ser intrínsecos ao animal, como estágio de maturidade, peso corporal e raça, ou extrínsecos, como a altitude, a umidade relativa do ar, a temperatura ambiente, a velocidade do vento, a temperatura da água, o consumo de matéria seca, a qualidade da água, o consumo de sódio e o tipo de bebedouro. Animais que não possuem o suprimento correto de água reduzem seu consumo alimentar, crescimento e produtividade. Também ocorre aumento dos ciclos reprodutivos reduzindo a lucratividade dos sistemas de produção (OLIVEIRA et al., 2016).

Os taurinos (*Bos taurus*) consomem mais água em relação à bovinos zebuínos (*Bos indicus*), principalmente com o aumento da temperatura do meio ambiente Winchester e Morris (1956).

3.2 ADAPTAÇÃO DO NELORE AO CLIMA TROPICAL

A produtividade do gado de corte à pasto nas regiões tropicais está diretamente associada à capacidade de adaptação às características do ambiente, sendo a tolerância ao calor um dos fatores mais importantes neste aspecto (MAGALHÃES et al., 2000; McMANUS et al., 2009). A produtividade máxima somente pode ser alcançada se, juntamente com outras condições ambientais favoráveis, os animais permanecerem na zona de termoneutralidade, sendo uma faixa de temperatura que proporciona conforto térmico em que há perda mínima de energia para manter a homeotermia (SILVA, 2000).

Esta faixa depende de alguns aspectos, entre os quais a habilidade de adaptação dos animais ao meio. Os zebuínos possuem maior tolerância ao calor em comparação com os taurinos, principalmente, por causa do processo de evolução destas raças, que possibilitou o surgimento de alelos associados à termotolerância (HANSEN, 2004). Com capacidade termorregulatória maior devido à menor taxa metabólica, assim como da habilidade superior de perda de calor para o meio.

De acordo com Ahlberg (2018), a adaptação deve ser considerada uma característica primordial de seleção para o setor de carne bovina. Porém, a seleção deste fator é um procedimento demorado e complexo, sendo um desafio sua mensuração. Caso não acontecer, tem a possibilidade de diminuição da produtividade futuramente.

3.3 RNA-SEQ

O sequenciamento de RNA (RNA-Seq) é uma tecnologia de sequenciamento de alto rendimento que surgiu como uma inovação na composição de dados de expressão gênica. Esta metodologia possui benefícios como: 1) não tem limitação em encontrar somente os transcritos que satisfaçam os genes que se tem como base; 2) possui a capacidade de detectar genes com baixos ou altos níveis de expressão; 3) oferece acurácia elevada para quantificar o nível de expressão; 4) possibilita mais conteúdo para detectar expressão

alelo-específica; 5) proporciona pouco ruído e máximo proveito da técnica (WANG et al., 2010; WANG et al., 2009; OSHLACK et al., 2010). Devido a estas características, a metodologia de RNA-Seq pode ser uma alternativa importante para estudar a expressão gênica.

A tecnologia RNA-seq apresenta algumas vantagens, como o alto nível de reprodutibilidade dos dados através de células de fluxo, o que reduz o número de repetições técnicas para os experimentos. Além disso, o RNA-seq permite identificar e quantificar a expressão de isoformas e transcritos desconhecidos (AGARWAL et al., 2010). Em relação à crescente utilização das metodologias de sequenciamento de alto rendimento, o custo dos experimentos de sequenciamento de próxima geração caiu consideravelmente. No entanto, um entendimento claro sobre a análise quantitativa do RNA-Seq ainda não foi alcançado, especialmente quando comparado a metodologias mais antigas (KRATZ; CARNINCI, 2014).

3.4 EXPRESSÃO GÊNICA

No interior das células, o DNA é a molécula que possui a função de guardar o conteúdo genético. Os genes que estão nele atribuem os aspectos de um indivíduo. E são partes do DNA que participam da transcrição, que representa a fabricação de moléculas de RNAs por meio do DNA. As moléculas de RNAs, também recebem o nome de transcritos, podem ter distintos papéis, sendo que um deles é servir de modelo para outro procedimento, chamado tradução. A molécula de RNA que é usada como modelo para a tradução é denominada de RNA mensageiro (mRNA), e a tradução é a fabricação de proteínas por meio do código que está nas moléculas de mRNAs. A expressão de um gene é o desenvolvimento de transcritos baseado em um dado gene. Seu padrão pode ser induzido por algum aspecto, como o ambiente, que modifica a atividade metabólica do

indivíduo, assim tem influência para dificultar ou incentivar a expressão de certos genes associados à dada modificação (ZAHA et al., 2003).

O uso de tecnologias recentes de conhecimento sobre expressão gênica em grande escala, nomeadas *high throughput*, possibilitam o sequenciamento do RNA mensageiro em plataformas que têm aptidão de emitir dados sobre milhares de pares de bases em somente uma corrida, de modo como o RNA-Seq, proporcionando a compreensão dos mecanismos moleculares presentes em características de difícil entendimento, (TIZIOTO et al, 2015), possibilitando a identificação de genes diferencialmente expressos em animais sob condições distintas e divergentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA EXPERIMENTAL E ANIMAIS

O experimento foi realizado no setor de Forragicultura e Pastagens da Universidade Estadual Paulista (Unesp), câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O espaço é separado em 24 piquetes, com plantio de *Urochloa brizantha* (Hochs tex A. Rich) Stapf cv. Marandu (capim marandu) em 2001. A altura média de pastejo foi de 25 cm, utilizando-se o pastejo contínuo com taxa de lotação modificável. O clima regional é subtropical úmido, com estiagem no inverno e chuvas no verão. A temperatura anual média é de 22,3°C, com máxima de 29,1°C e mínima de 16,9°C. A umidade relativa anual média é de 71,2% e o primeiro trimestre é o que tem maior umidade no ano (janeiro, fevereiro e março), com precipitação média de 628,8 mm, sendo igual a 44,2% do total de chuvas no ano.

4.2 OBSERVAÇÃO DO COMPORTAMENTO E SELEÇÃO DE ANIMAIS EXTREMOS

36 animais machos tiveram seus comportamentos observados (ócio em pé, ócio deitado, caminhar, pastejo, ruminação) por um período de quatro dias, de 4 a 7 de março de 2020, com temperatura média máxima de 31,5°C nos quatro dias média mínima de 17,25 °C, 12 horas (06:00 as 18:00h) por dia. Fitas de coloração diversa foram usadas para identificar os animais e os mesmos foram apartados por piquetes. A observação do consumo de água foi registrada pela anotação de todos os momentos em que o animal observado foi até o bebedouro, anotando a hora e o minuto. Para análises seguintes, usou-se a frequência de consumo de água (FCA), medida para cada indivíduo, sendo esta a quantidade total de vezes que o bovino foi até o bebedouro dividido pela somatória dos

outros comportamentos monitorados (ócio em pé, ócio deitado, caminhar, pastejo, ruminação).

Para o sequenciamento de RNA, os dez bovinos extremos foram selecionados para frequência de consumo de água, sendo os cinco bovinos com maior frequência e cinco bovinos com menor frequência de consumo de água. A normalidade dos resíduos e a homogeneidade de variâncias foram averiguadas nos grupos extremos selecionados.

4.3 RNA-SEQ

O sangue foi colhido em amostras da jugular dos 36 indivíduos monitorados, depois da observação do comportamento (8 e 9 de março de 2020). As amostras sanguíneas foram guardadas em tubos de conservação de RNA (PAX gene®) junto com aditivo que consolida o aspecto de transcrição genética relativa *in vivo*. Estes recipientes foram guardados sob resfriamento a -80°C. O RNA total de todas as amostras foi extraído no Laboratório da EMBRAPA Pecuária Sudeste com o "Blood RNA Kit" (PAX gene®), conforme as indicações do fabricante. O RNA total separado foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop®, Wilmington, DE, EUA) e sua qualidade analisada pelo Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). Todas as amostras possuíam valores RIN (Número de Integridade do RNA) maiores que 8,0. O preparo das bibliotecas foi feito utilizando o Kit TruSeq SBS v3-HS (200 ciclos) sequenciado no HiScanSQ (Illumina, San Diego, CA, USA). Os procedimentos foram feitos no Centro de Genômica Funcional (USP, Campus "Luiz de Queiroz", SP).

4.4 ANÁLISE COMPUTACIONAL

A qualidade das sequências foi determinada por meio do software FastQC (ANDREWS, 2010). A contagem de qualidade “phred”- score”_ das leituras foi analisada pelo software Trimmomatic (BOLGER et al., 2014). Foram rejeitadas leituras de

nucleotídeos com escore de qualidade menor que três e comprimentos de leitura menores que 30 pb. As sequências foram alinhadas com o genoma de referência bovino ARS-UCD 1.2, com o algoritmo HiSat2 (KIM et al., 2015). A contagem das leituras foi feita por meio do pacote Feature Counts (LIAO et al., 2014) do software R. A normalização das leituras e análises de expressão diferencial (DE) dos genes foi feito por meio do pacote DESeq2 (LOVE et al., 2014) do software R. A direção da expressão foi ajustada acima ou abaixo baseado em estimações nos grupos extremos alta (HFCA) e baixa frequência (LFCA). Todos os padrões de expressão diferencial foram determinados em HFCA vs LFCA. Genes significativos (p -valor ajustado $< 0,1$) foram considerados como genes com expressão diferencial. As análises funcionais e de enriquecimento foram feitas por meio da plataforma DAVID Bioinformatic Resources 6.8 (HUANG et al., 2008).

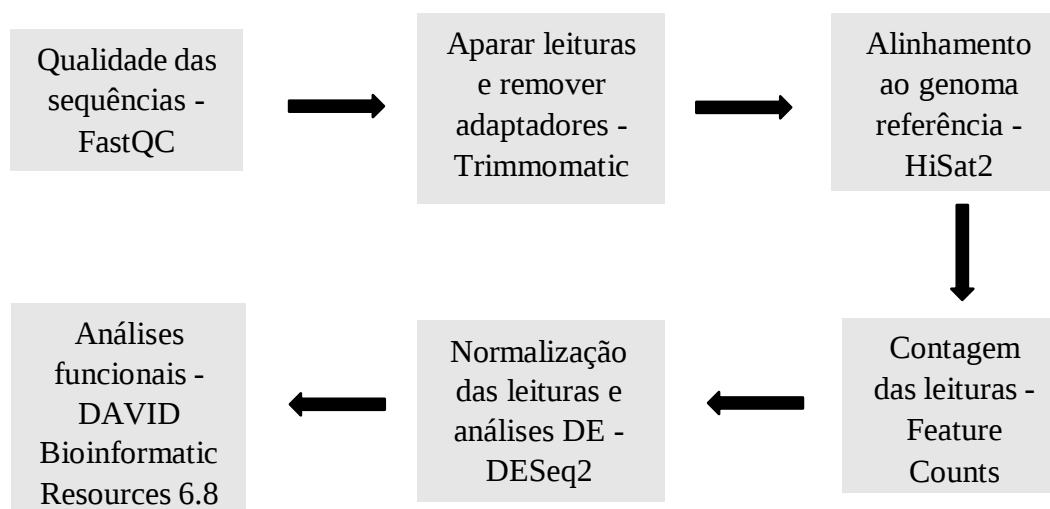


Figura 1. Fluxograma das etapas realizadas na análise computacional.

5. RESULTADOS

A análise de variância mostrou que houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos extremos escolhidos. O total de 27 genes diferencialmente expressos foram evidenciados para o grupo de animais estudados (Apêndice 1).

Na análise de expressão diferencial, as análises funcionais e de enriquecimento gênico evidenciaram o total de dez genes diferentes ligados a processos biológicos, componentes celulares e vias KEGG, para o grupo de animais estudados (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição de notação funcional dos genes, ontologia gênica (GO) e principais vias KEGG para a análise de diferencial de expressão de animais Nelore.

Genes supra regulados							
Número de acesso	Termo	N	P-valor	Bonferroni	Benjamini	FDR	Genes
<i>Processo Biológico</i>							
0010608	Posttranscriptional regulation of gene expression	2	3.2E-3	7.9E-2	8.3E-2	8.3E-2	LOC52033; GCNT2
0010718	Positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	2	8.1E-3	1.9E-1	1.1E-1	1.1E-1	LOC52033; GCNT2
0007179	Transforming growth Factor beta receptor signaling pathway	2	1.5E-2	3.2E-1	1.1E-1	1.1E-1	LOC52033; GCNT2
0051897	Positive regulation of protein kinase B signaling	2	1.7E-2	3.6E-1	1.1E-1	1.1E-1	LOC52033; GCNT2
0006486	Protein glycosylation	2	2.2E-2	4.4E-1	1.1E-1	1.1E-1	LOC52033; GCNT2
0070374	Positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	2	3.7E-2	6.3E-1	1.6E-1	1.6E-1	LOC52033; GCNT2
<i>Componente Celular</i>							
0016021	Integral component of membrane	7	6.5E-3	8.7E-2	9.1E-2	9.1E-2	ATP6V0A4; CD96; LOC520336; GCNT2; KLRD1; NCR1; TMEM242
<i>Função Molecular</i>							
0008109	N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase activity	2	1.1E-3	9.1E-3	9.2E-3	9.2E-3	LOC52033; GCNT2
<i>Vias KEGG</i>							
	Natural killer cell mediated cytotoxicity	2	4.6E-2	4.0E-1	5.0E-1	5.0E-1	KLRD1; NCR1
Genes infra regulados							
<i>Processo Biológico</i>							
0006955	Immune response	2	4.6E-2	9.0E-1	1.0E0	1.0E0	VPREB1; THBS1

6. DISCUSSÃO

Os genes *LOC520336* (N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase, isoform C) e *GCNT2* (glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2), genes de enzimas de ramificação I (I grupo sanguíneo), foram relatados na literatura em estudos de associação genômica relacionados a características de conformação de pés e pernas em gado holandês da China (ABDALLA et al., 2021). E *LOC520336*, associado a regiões de DNA contendo SNPs atribuídos a este gene, ligado com a síntese de oligossacarídeos de leite de vacas holandesas (POULSEN et al., 2019).

O gene *GCNT2* envolvido com o metabolismo glicol, foi relatado como um gene altamente expresso em um estudo com deposição de gordura em galinhas Xinghua (D' ANDRE et al., 2013) e na biossíntese de muco abomasal em bezerros holandeses infectados por nematoides (RINALDI et al., 2011). Neste estudo, o gene *GCNT2* foi supra regulado no grupo estudado, sugerindo que mesmo em ambientes de alta temperatura, os animais Nelore que apresentaram menor frequência de consumo de água apresentaram maior necessidade de metabolizar glicose. Em animais sob estresse térmico, o consumo de água pode ser maior (Blackshaw; Blackshaw, 1994) e há elevada demanda de glicose (HAMZAOUI et al., 2020).

O gene *ATP6V0A4* (ATPase H⁺ transporting V0 subunit a4) codifica um componente do vacuolar ATPase (V-ATPase), essa é uma enzima multisubunidade que media a acidificação de compartimentos intracelulares de células eucarióticas e que está envolvida no transporte normal de ácido vetorial na urina pelos rins (STOVER et al., 2002). As mutações associadas a esse gene estão relacionadas à acidose tubular renal e preservação da audição (NAGARA et al., 2014). Este gene foi observado

diferencialmente expresso em suínos da raça Large White, ao considerar o fenótipo de espessura de gordura traseira (WANG et al., 2019). O gene *ATP6V0A4* foi regulado em animais que tinham menor frequência de consumo de água, provavelmente devido a acidose renal tubular sendo controlado pelo equilíbrio ácido-base que a água fornece na corrente sanguínea (KARET, 2011).

O gene *CD96* (Cluster of Differentiation 96) foi observado diferencialmente expresso no grupo de animais estudados. Este gene foi mencionado na literatura como um gene com alta expressão em cabras (BHUIYAN et al., 2017) e bovinos (ARAUJO et al., 2009) sujeitos ao contágio por nematoides. Além disso, foi descrito em trabalhos de análise genômica e sinais de seleção em bovinos iraquianos (KASARDA et al., 2021) e eslovacos (ALSHAWI et al., 2019) como um gene relacionado ao sistema imunológico (KASARDA et al., 2021). A raça Nelore possui alta resistência a parasitas (BRICARELLO et al., 2007). De modo que são bovinos criados à pasto, a chance de transmissão de parasitas é elevada (STROMBERG; AVERBECK, 1999), podendo ter influenciado na alta expressão desse gene. O mesmo pode ter ocorrido ao analisar a expressão do gene *KLRD1* (killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1), também ligado à resposta imunológica, demonstrada em “natural killer cells” (BONGEN et al., 2018).

Estudo com camelos caracterizando sua composição genética, arranjo e variabilidade das regiões genéticas associadas aos genes, em destaque o *NCR1* (natural cytotoxicity triggering receptor 1) (FUTAS et al., 2019). Esses indivíduos são reconhecidos por sobreviverem em locais desafiadores de elevadas temperaturas e escassez de água e comida (THE BACTRIAN CAMELS GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM, 2012). Como espécies filogeneticamente com maior

relação (FUTAS et al., 2019), a regulação desse gene achado no grupo de animais estudados, também pode ser esclarecida pois são indivíduos adaptados a longos períodos de escassez de água.

Nos bovinos, o *THBS1* (thrombospondin 1) é descrito na literatura como um gene com indução durante luteólise natural ou com indução pela prostaglandina F2 alfa (PGF2a); composto anti-angiogênico natural, pro apoptótico e regulado em células endoteliais luteais (FARBEROV; MEIDEN, 2016; BASAVARAJA et al., 2017; FARBEROV; MEIDEN, 2018). Este gene foi diferencialmente expresso e regulado em bovinos infectados com tuberculose (KLEPP et al., 2019) e foi altamente expresso em bovinos coreanos castrados e relacionado à deposição de gordura intramuscular depois da castração (JU PARK et al., 2018). Pesquisas de nutrição apontaram que o consumo de água está inversamente relacionado à deposição de gordura corpórea em humanos (MILLA-TOBARRA et al., 2016; DANIELS; POPKIN, 2010). No atual estudo, o gene *THBS1* é regulado em animais do grupo LFCA, possivelmente pois quando pouca água é ingerida, possui pouca necessidade de expressão desse gene associado à deposição de gordura.

7. CONCLUSÃO

Os genes citados neste estudo estão relacionados ao metabolismo da glicose, fisiologia renal, sistema imunológico, capacidade de adaptação, deposição de gordura e eficiência no aproveitamento da água consumida. Os genes encontrados neste trabalho podem auxiliar a selecionar indivíduos que possuem maior adaptação ao ambiente com desafios de altas temperaturas e também que degradam menos o ambiente.

RESUMO

EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ÁGUA EM BOVINOS DE CORTE DA RAÇA NELORE CRIADOS A PASTO

O acompanhamento do comportamento animal em sistemas de produção é um relevante método para obter dados sobre sanidade, produtividade e reprodução. Sabe-se que cada vez mais é preciso preservar os recursos naturais, como a água. O objetivo deste trabalho foi verificar a expressão de genes associados à frequência de consumo de água em bovinos de corte da raça Nelore criados a pasto, a fim de se proporcionar maior conhecimento na seleção de animais mais adaptados ao ambiente desafiador e também animais que degradam menos o ambiente. O experimento foi realizado no setor de Forragicultura e Pastagens da Unesp, câmpus de Jaboticabal, São Paulo. Foram utilizados 36 animais da raça Nelore, os quais tiveram seus comportamentos observados e para sequenciar o RNA, os dez bovinos extremos foram selecionados para frequência de consumo de água, sendo os cinco bovinos com maior frequência e cinco bovinos com menor frequência de consumo de água. As análises computacionais foram realizadas para se conhecer os genes que influenciam o consumo de água nos bovinos da raça Nelore. As análises funcionais e de enriquecimento evidenciaram para a análise de diferencial de expressão gênica, o total de dez genes diferentes ligados a processos biológicos, componentes celulares e vias de KEGG. Os genes encontrados neste estudo estão relacionados ao metabolismo da glicose, fisiologia renal, sistema imunológico, capacidade de adaptação, deposição de gordura e eficiência no aproveitamento da água consumida. Os genes encontrados neste trabalho podem auxiliar a selecionar indivíduos que possuem maior adaptação ao ambiente com desafios de altas temperaturas e também que degradam menos o ambiente.

Palavras-chave: expressão gênica, adaptação, pastagem.

SUMMARY

GENES EXPRESSION ASSOCIATED WITH WATER CONSUMPTION

FREQUENCY IN NELLORE BEEF CATTLE RAISED IN PASTURE

Monitoring animal behavior in production systems is a relevant method to obtain data on health, productivity and reproduction. It is known that it is increasingly necessary to preserve natural resources, in this case water. The objective of this work was to verify the expression of genes associated with water consumption frequency in Nellore beef cattle raised in pasture, in order to provide greater knowledge in the selection of animals more adapted to the challenging environment and also animals that degrade the environment less. The experiment was carried out in the Forage and Pastures sector of Unesp, Jaboticabal campus, São Paulo. Thirty-six Nellore animals were used, which had their behavior observed and to sequence the RNA, the ten extreme cattle were selected for water consumption frequency, with the five cattle with the highest frequency and five cattle with the lowest water consumption frequency. Computational analyzes were carried out to discover the genes that influence water consumption in Nellore cattle. The functional and enrichment analyzes showed, for the analysis of differential gene expression, a total of ten different genes linked to biological processes, cellular components and Kegg pathways. The genes found in this study are related to glucose metabolism, kidney physiology, immune system, adaptability, fat deposition and efficiency in the use of water consumed. The genes found in this work can help to select individuals that have greater adaptation to the environment with challenges of high temperatures and also that degrade the environment less.

Keywords: gene expression, adaptation, pasture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, I. M.; LU, X.; NAZAR, M.; ARBAB, A. A. I.; XU, T.; YOUSIF, M. H.; MAO, Y.; YANG, Z. Genome-Wide Association Study Identifies Candidate Genes Associated with Feet and Leg Conformation Traits in Chinese Holstein Cattle. **Animals**, v.11, 2021. DOI: doi.org/10.3390/ani11082259.

ACNB. Associação dos Criadores de Nelore do Brasil. **Associação dos Criadores de Nelore do Brasil**, 2022. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/>>. Acesso em: jul. 2022.

AGARWAL, A.; KOPPSTEIN, D.; ROZOWSKY, J.; SBONER, A.; HABEGGER, L.; HILLIER, L. W.; et al. Comparação e calibração de dados de transcriptoma de RNA-Seq e tiling arrays. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

AHLBERG C. M. **Characterization of Water Intake in Beef Cattle: Test Length Guidelines, Water Intake Prediction, and Genetic Parameters**. 2018. PhD thesis, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA, 2018.

ALSHAWI, A.; ESSA, A.; AL-BAYATTI, S.; HANOTTE, O. Genome analysis reveals genetic admixture and signature of selection for productivity and environmental traits in Iraqi cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 609, 2019. DOI: doi.org/10.3389/fgene.2019.00609.

ANDREWS, S. Babraham bioinformatics-FastQC a quality control tool for high throughput sequence, 2010. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: jul. 2022.

ARAUJO, R. N. et al. Use of a candidate gene array to delineate gene expression patterns in cattle selected for resistance or susceptibility to intestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 106-115, 2009.

BASAVARAJA, R. et al. Interferon-tau promotes luteal endothelial cell survival and inhibits specific luteolytic genes in bovine corpus luteum. **Reproduction**, v. 154, n. 5, p. 559-568, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-17-0290>

BHUIYAN, A. A. et al. Exploring the genetic resistance to gastrointestinal nematodes infection in goat using RNA-sequencing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 751, 2017. DOI: doi.org/10.3390/ijms18040751.

BLACKSHAW, J. K.; BLACKSHAW, A. W. Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behaviour: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 34, p. 285- 295, 1994.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2114-2120, 2014.

BONGEN, E.; VALLANIA, F.; UTZ, P.J., KHATRI, P. KLRD1-expressing natural killer cells predict influenza susceptibility. **Genome medicine**, v. 10, p. 45, 2018. DOI: doi.org/10.1186/s13073-018-0554-1.

BRICARELLO, P. A. et al. Field study on nematode resistance in Nelore-breed cattle. **Veterinary parasitology**, v. 148, p. 272-278, 2007.

COKUS, S. J. et al. Shotgun busulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. **Nature**, v. 452, p. 215-219, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06745>

D'ANDRE, H. C.; PAUL, W.; SHEN, X.; JIA, X.; ZHANG, R.; SUN, L.; ZHANG, X. Identification and characterization of genes that control fat deposition in chickens. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, p. 43, 2013. DOI: doi.org/10.1186/2049-1891-4-43.

DANIELS, M. C.; POPKIN, B. M. Impact of water intake on energy intake and weight status: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 9, p. 505-521, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00311.x>

EMBRAPA. Prosa Rural – Importância da água na criação de bovinos de corte e de leite. **Embrapa**, 2013. Acesso em: jul. 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2294736/prosa-rural---importancia-da-agua-na-criacao-de-bovinos-de-corte-e-de-leite>>.

FARBEROV, S.; MEIDAN, R. Thrombospondin-1 affects bovine luteal function via transforming growth factor-beta1-dependent and independent actions. **Biology of Reproduction**, v. 94, p. 25, 2016. DOI: doi.org/10.1095/biolreprod.115.135822.

FARBEROV, S.; MEIDAN, R. Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 oppositely regulate miR-221 that targets thrombospondin-1 in bovine luteal endothelial cells. **Biology of Reproduction**, v. 98, p. 366-375, 2018.

FUTAS, J. et al. Natural killer cell receptor genes in camels: Another mammalian model. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 620, 2019. DOI: doi.org/10.3389/fgene.2019.00620.

HAMZAOUI, S.; CAJA, G.; SUCH, X.; ALBANELL, E.; SALAMA, A. A. K. Milk production and energetic metabolism of heat-stressed dairy goats supplemented with propylene glycol. **Animals**, v. 10, p. 2449, 2020. DOI: doi.org/10.3390/ani10122449.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 1-13, 2008.

- KARET, F. E. Disorders of water and acid-base homeostasis. **Nephron Physiology**, v. 118, p. 28-34, 2011.
- KASARDA, R. et al. The evaluation of genomic diversity and selection signals in the autochthonous Slovak Spotted cattle. **Czech Journal of Animal Science**, v. 66, p. 251-261, 2021.
- KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature methods**, v. 12, p. 357-360, 2015.
- KLEPP, L. I.; EIRIN, M. E.; GARBACCIO, S.; SORIA, M.; BIGI, F.; BRANCO, F. C. Identification of bovine tuberculosis biomarkers to detect tuberculin skin test and IFN γ release assay false negative cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 122, p. 7-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.016>
- KRATZ, A.; CARNINCI, P. O diabo nos detalhes de RNA-seq. **Nature biotechnology**, v. 32 n. 9, p. 882–884, 2014.
- LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v. 30, p. 923-930, 2014.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, p. 550, 2014. DOI: doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8.
- MAGALHÃES, J. A.; TAKIGAWA, R. M.; TOWNSEND, C. R.; COSTA, N. DE L.; PEREIRA, R.G. A. Tolerância de bovídeos à temperatura e umidade do trópico úmido. **Revista Científico de Produção Animal**, v. 2, p. 62-167, 2000.
- MCMANUS, C.; PRESCOTT, E.; PALUDO, G. R.; BIANCHINI, E.; LOUVANDINI, H.; MARIANTE, A. S. Heat tolerance in naturalized Brazilian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 120, p. 256-264, 2009.
- MILLA-TOBARRA et al. The association between water intake, body composition and cardiometabolic factors among children - The Cuenca study. **Nutrición Hospitalaria**, v. 33, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.20960/nh.312>
- MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, p. 621-628, 2008. DOI: doi.org/10.1038/nmeth.1226
- NAGARA, M. et al. A novel splice-site mutation in ATP6V0A4 gene in two brothers with distal renal tubular acidosis from a consanguineous Tunisian family. **Journal of Genetics**, v. 93, p. 859-863, 2014.
- OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-Seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, v. 11, p. 220, 2010.

OLIVEIRA et al. Considerações sobre o consumo de água por bovinos. **Nutri Time**, v. 13, n. 1, p. 4524-4528, 2016. Acesso em: jul. 2022. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/39818>>.

PARK, JU-H.; CHUNG, J. W.; CHOI, H. S. Vitamin D status in South Korean population. **Medicine**, v. 97, n. 26, 2018. DOI: 10.1097/MD.00000000000011032

POULSEN, N. A.; ROBINSON, R. C.; BARILE, D.; LARSEN, L. B.; BUITENHUIS, B. A genome-wide association study reveals specific transferases as candidate loci for bovine milk oligosaccharides synthesis. **BMC Genomics**, v. 20, p. 404, 2019. DOI: doi.org/10.1186/s12864-019-5786-y.

RINALDI, M.; DREESEN, L.; HOORENS, P. R.; LI, R.W.; CLAEREBOU, E.; GODDEERIS, B.; VERCRUYSE, J.; BROEK, W. V. D.; GELDHOF, P. Infection with the gastrointestinal nematode *Ostertagia ostertagi* in cattle affects mucus biosynthesis in the abomasum. **Veterinary Research**, v. 42, p. 61, 2011. DOI: doi.org/10.1186/1297-9716-42-61.

SAFADY, N. G. RNA-seq: ferramenta para estudos de expressão gênica. **Varsomics**, 2021. Acesso em: jul. 2022. Disponível em: <<https://blog.varsomics.com/o-que-e-rna-seq/>>.

SILVA, R. G. **Introdução à Bioclimatologia Animal**. São Paulo, Nobel, 2000. 286 p.

STOVER, E.H. et al. Novel ATP6V1B1 and ATP6V0A4 mutations in autosomal recessive distal renal tubular acidosis with new evidence for hearing loss. **Journal of Medical Genetics**, v. 39, p. 796-803, 2002.

STROMBERG, B. E.; AVERBECK, G. A. The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 33-39, 1999.

THE BACTRIAN CAMELS GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. Genome sequences of wild and domestic Bactrian camels. **Nat Commun**, v. 3, p. 1202, 2012. DOI: doi: 10.1038/ncomms2192.

TIZIOTO, P. C. et al. Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. **BMC Genomics**, v. 16, p. 216, 2015.

WANG, B. et al. Association of twelve candidate gene polymorphisms with the intramuscular fat content and average backfat thickness of Chinese Suhuai pigs. **Animals**, v. 9, p. 858, 2019. DOI: doi.org/10.3390/ani9110858.

WANG, L.; LI P.; BRUTNEL, T. P. Exploring plant transcriptomes using ultra highthroughput sequencing. **Briefings in Functional Genomics**, v. 9, p. 118–128, 2010.

WANG, Z., GERSTEIN, M., SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WINCHESTER, C. F.; MORRIS, M. J. Water intake rates of cattle. **Journal Animal of Science**, v. 15, p. 722-740, 1956. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1956.153722x>

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

APÊNDICE 1 - Genes diferencialmente expressos.

Análise de expressão diferencial			
NWCF			
Genes supra regulados			
Ensembl gene id	Gene Symbol	log2FoldChange	P-valor ajustado
ENSBTAG00000014441	CD96	0.728610479	0.00084
ENSBTAG00000044419	-	3.61887337	0.06344
ENSBTAG00000051030	CYP2J2	5.159699616	0.000186
ENSBTAG00000052514	LOC100336869	2.162794413	7.70E-10
ENSBTAG00000052658	NKG2A	1.521539519	0.000352
ENSBTAG00000046389	KLRD1	1.368787237	7.97E-06
ENSBTAG00000004263	ATP6V0A4	0.952547715	0.017114
ENSBTAG00000006497	-	1.727581868	0.06344
ENSBTAG00000007201	TMEM242	0.648459821	0.001592
ENSBTAG00000004641	PLEKHA6	1.477179667	0.001553
ENSBTAG00000000297	ZNF330	0.594963804	0.004862
ENSBTAG00000013055	LOC786126	0.717344068	0.06344
ENSBTAG00000021438	ZNF821	0.767318435	0.06344
ENSBTAG00000045529	NCR1	1.143185456	0.00084
ENSBTAG00000053383	-	1.441907999	0.022235
ENSBTAG00000039326	LOC520336	0.893555714	0.06344
ENSBTAG00000039513	GCNT2	1.266752909	0.005486
ENSBTAG00000054008	LOC521568	3.285776327	0.06344
Genes infra regulados			
ENSBTAG00000049044	-	-3.168149872	0.068373
ENSBTAG00000014750	EPB41L4A	-2.134740718	0.095572
ENSBTAG00000002006	THBS1	-1.459268623	0.000653
ENSBTAG00000037832	ASPHD2	-0.799635556	0.00877
ENSBTAG00000017305	-	-0.814591071	0.0046
ENSBTAG00000055240	-	-0.957017775	0.000557
ENSBTAG00000050871	LOC100139881	-2.173800184	0.030507
ENSBTAG00000052414	-	-2.341079713	6.07E-16
ENSBTAG00000054086	-	-0.849490309	0.095572