

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
PROGRAMA DE GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DO PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES
CANDIDATOS COM A EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE
ANIMAIS DA RAÇA NELORE**

**Kamila de Oliveira da Rosa
Zootecnista**

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
PROGRAMA DE GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE DO PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES
CANDIDATOS COM A EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE
ANIMAIS DA RAÇA NELORE**

Kamila de Oliveira da Rosa

Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

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 Genética e Melhoramento Animal.

2015

R788a Rosa, Kamila de Oliveira da
Análise do perfil da expressão de genes candidatos com a
eficiência alimentar de animais da raça nelore / Kamila de Oliveira da
Rosa. -- Jaboticabal, 2015
xi, 54 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima
Banca examinadora: Nedenia Bonvino Stafuzza, Simone Cristina
Méo Niciura
Bibliografia

1. *Bos indicus*. 2. Eficiência alimentar. 3. Expressão genica. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE DO PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS COM A EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE ANIMAIS DA RAÇA NELORE

AUTORA: KAMILA DE OLIVEIRA DA ROSA

ORIENTADORA: Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA

Pós-doutoranda / Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. SIMONE CRISTINA MÉO NICIURA

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP

Data da realização: 03 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KAMILA DE OLIVEIRA DA ROSA - nascida em 27 de dezembro de 1990, na cidade de Ponta Grossa – PR, filha de Pedro Gonçalves da Rosa e Idalice de Oliveira. Iniciou em 2008 o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Campus de Castro – PR. Foi bolsista CNPq/PIBIC de Iniciação Científica por três anos consecutivos sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, obtendo o título de Zootecnista em 2012. Em março de 2013 ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal – SP, obtendo o grau de mestre em 03 de fevereiro de 2015, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Luciana Correia de Almeida Regitano.

Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai
acompanhado, com certeza vai mais longe.

Clarice Lispector

Ofereço

Aos meus Pais,

Pedro Gonçalves da Rosa e Idalice de Oliveira pelo amor, dedicação, incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu Namorado,

Rodrigo Martins de Oliveira, pelo apoio, espera, dedicação e esforços sem limites dedicados a mim.

A minha Família,

Pelo apoio e pela compreensão do tempo de convívio muito curto para realização deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo. Por toda a coragem, luz, determinação e força na escolha da direção correta a tomar e por dar-me a oportunidade de conhecer tantas pessoas boas que tem cruzado o meu caminho ultimamente. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas durante a minha vida.

Aos meus pais, por toda felicidade, carinho, compreensão, apoio, incentivo, dedicação encontrada na minha querida família que sempre farão parte de cada vitória.

Ao meu namorado Rodrigo Martins de Oliveira, que sem medir esforços fez muito por mim. Apoiou-me e teve muita paciência, amizade e amor neste período em que estávamos distantes.

A Jussara A. Santos Oliveira, Enio M. Oliveira e Heloisa M. Oliveira, minha segunda família, pela acolhida, carinho e incentivo.

A Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano pela confiança depositada para dirigir o presente trabalho, pelo conhecimento científico e humano.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal e a Embrapa Pecuária Sudeste pela oportunidade de crescimento que me proporcionaram.

A Professora Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima e Amanda Nonato pela disponibilidade, ajuda e amizade.

À Dra. Nedenia Bonvino Staffuzza e ao Dr. Guilherme Costa Venturini pelas correções e sugestões prestadas no exame de qualificação.

A Dra. Simone Cristina Méo Niciura pelas sugestões que contribuíram para aprimorar este trabalho.

Aos todos os professores, que compartilharam comigo seus conhecimentos, tornando possível a minha formação.

Aos amigos que fiz na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, em especial Thaise Melo, Daniele Portela, Juliana Lolli e Débora Vital pela acolhida, ajuda e amizade.

Aos todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia animal da Embrapa Pecuária Sudeste em especial Wilson Malagó, Adriana Somavilla, Wellison Jarles, Gilberto Agostinho, Flávia Donatoni, Polyana Tiziotto, Priscila Oliveira, Guilherme Pereira, Marina Ibelli, Marcela M. Souza, Andressa Lima e Priscila Kahawage pela imensa ajuda e principalmente pela amizade que construímos.

A todos aqueles que estiveram presentes nesta inesquecível fase da minha vida, compartilhando todos os momentos que foram essenciais para minha formação acadêmica e pessoal.

A vocês, meu carinho e gratidão.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	03
1.Situação atual da bovinocultura.....	03
2.Eficiência alimentar (EA): conceitos e importância econômica.....	03
3.Fatores que afetam a eficiência alimentar.....	04
4.Medidas de eficiência alimentar.....	07
5.A raça Nelore.....	11
6.Biologia molecular no estudo da eficiência alimentar de bovinos.....	11
7.RNAseq (Sequenciamento do ácido ribonucleico).....	12
8.PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	13
9.Genes alvos.....	13
9.1.Gene candidato <i>SLC2A5</i>	13
9.2.Gene candidato <i>PPP1R26</i>	14
9.3.Gene candidato <i>RGS2</i>	14
9.4.Gene candidato <i>UCP2</i>	15
9.5.Gene candidato <i>FADS2</i>	15
9.6.Gene candidato <i>FABP1</i>	15
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
1.Os animais experimentais.....	17
1.1.Animais extremos para EA e análise de RNAseq.....	18
1.1.1.Seleção dos animais extremos para eficiência alimentar.....	18
1.1.2.Sequenciamento do RNA (RNAseq).....	19
2.Extração, análise de qualidade e quantificação do RNA.....	19
3.Síntese do DNA complementar (cDNA).....	20
4.Reação da PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	20
5.Genes do experimento.....	23

5.1. Genes referência.....	23
5.2. Genes alvos.....	23
6. Eficiência de amplificação e padronização dos dados.....	26
7. Análise de Associação.....	27
 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 28
1. Qualidade do RNA extraído.....	28
2. Análise da estabilidade dos genes candidatos à referência.....	32
3. Resultados da amplificação e da eficiência dos oligonucleotídeos.....	33
4. Análise de associação.....	39
 CONCLUSÃO.....	 44
 REFERÊNCIAS.....	 45

LISTA DE ABREVIATURAS

CA -	Conversão alimentar
CAR -	Conversão alimentar residual
cDNA -	DNA complementar
CGR -	Consumo de ganho residual
CMSpv -	Consumo de matéria seca em relação ao peso vivo
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EA -	Eficiência alimentar
EB -	Eficiência alimentar bruta
EPC -	Eficiência parcial de crescimento
<i>FABP1</i> -	"Fatty acid binding protein 1, liver"
<i>FADS2</i> -	"Fatty acid desaturase 2"
GMD -	Ganho de peso médio diário
GR -	Ganho residual
<i>HPRT1</i> -	"Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1"
IK -	Índice de Kleiber
IMS -	Ingestão de matéria seca
mRNA -	RNA mensageiro
MS -	Matéria seca
NTC -	"No Template Control"
pb -	Pares de base
PMM -	Peso médio metabólico
<i>PPP1R26</i> -	"Protein phosphatase 1, regulatory subunit 26"
PVMM -	Peso vivo metabólico médio
qPCR -	PCR quantitativo em tempo real
<i>RGS2</i> -	"Regulator of G-protein signaling 2, 24kDa"
RNA -	Ácido ribonucleico
RNAseq -	Sequenciamento do ácido ribonucleico
<i>RPL19</i> -	"Ribosomal protein L19"
<i>RPS9</i> -	"Ribosomal protein S9"
SLC2A5 -	"Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter) member 5"
TRC -	Taxa relativa de crescimento
<i>UCP2</i> -	"Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)"
<i>YWHAZ</i> -	"Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta"

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização das replicatas nas placas de forma aleatória. *As numerações significam: Ex: 1.16 - gene 1, amostra16; C.interno = calibradores internos.	22
Figura 2: Ciclos para amplificação das reações de PCR em tempo real.	22
Figura 3: Amostras (1 a 83) de RNA submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. *M: marcador de peso molecular de 100 pb.	28
Figura 4: Eletroferograma mostrando a relação de intensidade dos RNA ribossomais 28 e 18S.	29
Figura 5: Resultado da integridade do RNA pelo equipamento Agilent Bioanalyzer 2100. * RIN: “ <i>RNA Integrity Number</i> ”	30
Figura 6: Ranking dos candidatos a gene referência no programa RefFinder.	32
Figura 7: Duplo pico de Melting. Gene <i>PPP1R26</i> com presença de dímero de oligonucleotídeos. *NTC– “No Template Control” (ausência de cDNA na reação de qPCR para detectar possíveis contaminantes).	33
Figura 8: Gel de agarose 1%, contendo o produto amplificado por PCR dos genes <i>UCP2</i> (11A), <i>RGS2</i> (11B), <i>FADS2</i> (11C), <i>YWHAZ</i> (11D), <i>SLC2A5</i> (11E) e <i>PPP1R26</i> (11F) para verificar o tamanho e a especificidade do produto amplificado.	35
Figura 9: Verificação da especificidade de amplificação do fragmento de interesse com a observação da curva de melting para os genes em estudo.	36
Figura 10: Mecanismo de dissociação da molécula. T_m (78,44°C) de uma amostra aleatória do gene <i>RGS2</i> .	37
Figura 11: Seleção dos pontos na curva de amplificação, na fase exponencial, pelo programa LinRegPCR.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes e concentrações iniciais e finais da reação de qPCR.	21
Tabela 2: Identificação e características dos pares de oligonucleotídeos usados como candidatos a gene referência.	25
Tabela 3: Características dos pares de oligonucleotídeos dos genes alvos.	25
Tabela 4: Quantificação e razão (260/280) das amostras (1 a 83) de RNA total extraído de fígado de animais Nelore.	31
Tabela 5: Matriz de concentração de oligonucleotídeos.	34
Tabela 6: Cqs máximos (máx) e mínimos (mín) gerados pelo programa LinRegPCR.	37
Tabela 7: Eficiência de amplificação máxima (máx) e mínima (mín) gerada pelo programa LinRegPCR.	38
Tabela 8: Valores de efeito estimado e P valor da análise de associação. *Valores com P valor significativo ($P \leq 0,05$).	40
Tabela 9: Valores de efeito estimado e P valor das associações encontradas.	42

ANÁLISE DO PERFIL DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS COM A EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE ANIMAIS DA RAÇA NELORE

RESUMO - O Brasil se consolidou como um dos principais produtores e exportadores mundiais de carne. Entretanto, diversas culturas (animal/vegetal) têm competido com a bovinocultura por espaço e importância na balança comercial brasileira. Assim, o melhoramento genético animal tem tido, no Brasil, papel fundamental na pecuária de corte de forma a manter crescentes os níveis de produção ocupando o mesmo espaço e a baixo custo. A eficiência alimentar é uma característica produtiva de extrema importância, porém não está sendo considerada nos programas de avaliação genética no país, devido ao fato de a mensuração ser onerosa e tardia. Nesse cenário a genética molecular pode contribuir para a implementação da seleção dessa característica em programas de melhoramento por meio da identificação de genes importantes para eficiência alimentar. O presente estudo objetivou comprovar o padrão de expressão de genes diferencialmente expressos previamente identificados por sequenciamento de RNA (RNA-seq) em animais extremos para eficiência alimentar. Nesse contexto foi adotada a metodologia de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) a fim de estabelecer uma relação quantitativa entre nível de expressão gênica e a eficiência alimentar em uma população experimental de 83 animais da raça Nelore avaliados para diferentes medidas de eficiência alimentar. Um subgrupo composto por 20 animais extremos para o consumo alimentar residual (CAR) foi avaliado quanto ao padrão de expressão global pela tecnologia de RNA-seq para identificação de genes diferencialmente expressos (DE). A partir dos genes DE identificados foram selecionados seis genes candidatos (*PPP1R26*, *FABP1*, *FADS2*, *RGS2*, *SLC2A5* e *UCP2*) com base nos valores de “Fold Change” e sua função metabólica para a característica em estudo. As qPCR foram realizadas para identificar associações entre o nível de expressão dos seis genes alvo com as medidas de eficiência alimentar. Observou-se associação ($P < 0,05$) entre o gene *FABP1* com consumo alimentar residual e ingestão de matéria seca. Além disso, o gene *SLC2A5* foi associado ($P < 0,05$) com as medidas índice de Kleiber e taxa relativa de crescimento. Em ambos os casos um aumento do nível de expressão foi associado com diminuições nos valores das medidas fenotípicas. Assim, *FABP1* e *SLC2A5* podem ser potenciais candidatos para estar envolvido com a eficiência alimentar. Os resultados obtidos aqui são um grande avanço no estudo desta complexa característica além de contribuir para melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos.

Palavras - chave: *Bos indicus*, consumo alimentar, expressão gênica

PROFILE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION OF CANDIDATES WITH FOOD EFFICIENCY ANIMALS BREED NELORE

ABSTRACT - Brazil is one of the leading producer and exporter of meat. However, different livestock and plant production have been competing with cattle for space and importance in Brazilian trade balance. Thus, the animal breeding has played a key role in beef cattle to increase production levels occupying the same space at lower costs. Feed efficiency is a productive trait of extreme importance, but it has not been considered in genetic evaluation programs in our country. This is probably due to the fact that the measurement is costly and late. In this scenario molecular genetics may contribute to the implementation of this trait in breeding programs by identifying candidate genes for feed efficiency. The present study aimed to confirm the differential gene expression levels of candidate genes previously identified by RNA sequencing (RNA-seq) in extreme groups of animals evaluated for feed efficiency. We adopted the real time quantitative PCR methodology (qPCR) to verify a quantitative relationship between the level of gene expression and feed efficiency in an experimental population of 83 Nelore cattle evaluated for different feed efficiency traits. A subgroup composed of 20 animals extreme for Residual Feed Intake (RFI) was evaluated for overall standard of expression by RNA-seq technology to identify genes differentially expressed (DE). From the identified DE genes six candidate genes were selected (*PPP1R26*, *FABP1*, *FADS2*, *RGS2*, *SLC2A5* and *UCP2*) based on fold change values and its metabolic function related to feed efficiency. The qPCR analyses were performed to confirm association between the expression level of the six target genes with measures of feed efficiency. It was observed association between the *FABP1* gene with residual feed intake and dry matter intake ($P < 0.05$). Also, the *SLC2A5* gene was associated with Kleiber index measurements and relative growth rate ($P < 0.05$). In both cases an increase in the expression level was associated with decreases in the values of phenotypic measurements. Thus, *FABP1* and *SLC2A5* may be potential candidates for being involved with feed efficiency. The results obtained here are a breakthrough in the study of this complex trait and can help to a better understanding of the molecular mechanisms of this trait.

Key - words: *Bos indicus*, feed intake, gene expression

INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, sendo o Brasil o segundo país com o maior rebanho efetivo do mundo, em que 80% do gado de corte é da raça Nelore ou de seus cruzamentos, o que equivale a mais de 100 milhões de cabeças (ACNB, 2014).

Mudanças estruturais importantes estão acontecendo na pecuária brasileira, principalmente pela disputa por área com grãos e cana-de-açúcar. Assim, a competição da pecuária com áreas agricultáveis prosseguirá e irá exigir que a bovinocultura de corte seja cada vez mais eficiente no Brasil (POLL et al., 2013). Devido à demanda de eficiência dentro do sistema de criação da bovinocultura, os programas de melhoramento animal devem selecionar características que contribuam significativamente para o alcance desta meta.

A eficiência alimentar é uma das principais características a ser considerada, pois aumentará o potencial genético para que os animais tenham menor consumo de alimento mantendo os mesmos níveis de produção. Desta forma será possível diminuir o custo para o produtor, já que a alimentação representa a maior despesa de todo o sistema de produção (NKRUMAH et al., 2006). Além disso, contribuirá para a solução da competição por áreas, pois segundo Basarab et al. (2003), animais mais eficientes contribuem para a redução de área de pasto.

Ao longo dos anos, muitas medidas diferentes de eficiência alimentar têm sido propostas. Tradicionalmente, a eficiência tem sido definida como uma razão de conversão alimentar (CA) ($\text{kg de consumo} : \text{kg de ganho}$) (KOCH et al., 1963; ARCHER et al., 1999; ARTHUR et al., 2001; MOORE et al., 2008). Entretanto, a CA é um parâmetro altamente correlacionado geneticamente com aumento do tamanho e do peso adulto das vacas, o que é indesejável por comprometer a eficiência reprodutiva, bem como reduzir o ganho de peso no setor de cria (MOORE et al., 2008; LANNA et al., 2003). O consumo alimentar residual (CAR) é a medida de eficiência alimentar mais estudada em bovinos de corte nas últimas duas décadas (MERCADANTE et al., 2013). A correlação genética entre CAR e o tradicional parâmetro conversão alimentar é moderada (ARCHER et al., 2001), sugerindo que essas características são reguladas por genes diferentes.

Devido à dificuldade de mensuração, a detecção de genes candidatos que influenciam a eficiência alimentar pode contribuir significativamente para os programas de melhoramento genético de bovinos de corte. Segundo Nkrumah et al. (2006) uma avaliação das diferenças na expressão nos genes envolvidos e associados em certos tecidos metabolicamente ativos, tais como fígado e trato gastrointestinal, pode ajudar a explicar parte dos mecanismos moleculares que conduzem as variações no gasto de energia. Isto pode ser ainda mais importante nos ruminantes, devido ao tamanho relativamente grande das vísceras, em relação ao corpo todo.

Com a finalidade de contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos que concorrem para a variação na eficiência alimentar, o objetivo do presente estudo foi avaliar, via PCR quantitativa, a relação entre o padrão de expressão de genes candidatos no fígado de animais da raça Nelore e as medidas de eficiência alimentar.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Situação atual da bovinocultura

A bovinocultura é um dos destaques do agronegócio brasileiro ocupando a segunda posição no “ranking” mundial com o maior rebanho efetivo e comercial (SEAB, 2013). De acordo com o balanço da pecuária, realizado pela Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carne (ABIEC) (2014), o Brasil conta com um rebanho total de 210 milhões de cabeças. Do total de bovinos, 80% do gado de corte são Nelore ou seus cruzados, o que equivale a mais de 100 milhões de cabeças (ACNB, 2014). Aproximadamente 20% da carne produzida no Brasil é exportada (ABIEC, 2015) e, desde 2004, o país é líder nas exportações de carne, sendo responsável por um quinto da carne comercializada internacionalmente e com vendas em mais de 180 países (MAPA, 2013 a).

Como a maior parte do rebanho é criada a pasto, estima-se que em 2011 apenas 8,6% dos animais abatidos foram terminados em confinamento (ABIEC, 2014). Essa escolha depende do custo das terras, custos fixos dos confinamentos, custo da alimentação, entre outros (RAUPP; FUGANTI, 2014).

Uma vez que a rentabilidade desse sistema é dependente das “entradas” e “saídas”, e o maior custo na maioria dos empreendimentos pecuários é o fornecimento de alimentos aos animais, existe crescente interesse pelo uso de índices de eficiência alimentar (EA), estes são de grande importância para melhorar economicamente e ambientalmente a indústria de bovinos de corte (HERD et al., 2003; ARTHUR et al., 2004).

2. Eficiência alimentar (EA): conceitos e importância econômica

A eficiência alimentar (EA) é definida pela quantidade de produto animal por quantidade unitária de alimento, é uma das principais características a ser considerada, pois aumentará o potencial genético para que os animais tenham menor consumo de alimento mantendo os mesmos níveis de produção. Desta forma haverá redução dos custos de produção, já que a alimentação representa a maior

despesa de todo o sistema (NKRUMAH et al., 2006). Além disso, a seleção para EA trará grande contribuição para a solução da competição por áreas produtivas, uma vez que animais mais eficientes contribuem para a redução de área de pasto (BASARAB et al., 2003). Ainda segundo Basarab et al. (2003), outros benefícios do aumento da eficiência alimentar estão relacionados à redução de problemas ambientais, tais como emissão de carbono, metano e produção de esterco.

Mudanças estruturais importantes estão acontecendo na pecuária brasileira, principalmente pela disputa de área com grãos e cana-de-açúcar, essa competição da pecuária por áreas agrícolas prosseguirá e exigirá da bovinocultura de corte o aumento da sua eficiência (POLL et al., 2013). Devido à demanda de eficiência no sistema de produção de bovinos, os programas de melhoramento animal devem incorporar a seleção de características que contribuam para esta meta.

3. Fatores que afetam a eficiência alimentar

Num contexto amplo, os fatores ambientais, genéticos, fisiológicos e de manejo comprometem e influenciam na produção de bovinos. Para entender mecanismos relacionados diretamente ao animal é no fator fisiológico que se deve tentar compreender os diferentes processos que causam a variação da EA.

Vários são os processos biológicos associados a essa característica, como: digestão de nutrientes, composição corporal, gastos de energia associados com o metabolismo basal, atividade física, termorregulação, “turnover” proteico, estresse, metabolismo dos tecidos, transporte de íons e comportamento ingestivo (HERD et al., 2004; RICHARDSON; HERD, 2004; CARSTENS; KERLEY, 2009).

Richardson e Herd (2004) determinaram porcentagens para os mecanismos biológicos que causam a variação na conversão alimentar residual (CAR). Esses autores utilizaram animais da raça Angus, divergentes para esta característica, e observaram que os fatores que contribuem para a variação da CAR apresentaram as seguintes proporções: composição corporal (5%); padrões de alimentação (2%); “turnover” proteico, metabolismo do tecido e estresse (37%); incremento de calor e de fermentação (9%); digestibilidade (10%); atividade física (9%) e outros mecanismos (27%).

A característica de eficiência alimentar pode ser expressa por diferentes medidas. A mais comum aqui citada para subsidiar a discussão de fatores fisiológicos importantes, será a conversão alimentar residual (CAR) encontrada pela diferença entre o consumo observado e o consumo estimado, por meio de ajustes para peso médio metabólico (PMM) e taxa de ganho de peso (GMD). Animais que apresentam CAR negativo (baixo CAR) são mais eficientes quando comparados a animais com CAR positivo (alto CAR), pois ingerem menos alimento que o estimado para o mesmo ganho de peso.

Quando comparados animais divergentes para essa característica observam-se muitas diferenças em aspectos fisiológicos de cada grupo. Richardson et al. (2004) estudando as diferenças metabólicas em novilhos Angus divergentes para CAR, constataram que com relação ao tempo de alimentação os animais menos eficientes permaneceram 5% mais tempo se alimentando e de pé. Tal fato é resultado de maior exigência de consumo por parte dos animais com alto CAR. A seleção para esta característica ao longo das gerações mostra-se uma alternativa eficiente.

O consumo está diretamente relacionado à ingestão de matéria seca (MS) e a digestibilidade de nutrientes. A digestibilidade da dieta é negativamente correlacionada com o CAR, indicando que baixo CAR é associado com maior digestibilidade (Richardson et al., 2004). Dessa forma animais de alto CAR têm um baixo aproveitamento dos alimentos, necessitando de maior ingestão de MS para poder atender os níveis de energia necessários para manutenção (Nkrumah *et al.*, 2006). As diferenças na digestibilidade podem influenciar a velocidade de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal e conseqüentemente nas diferenças da ingestão do alimento, pois o maior consumo alimentar é negativamente associado com a digestibilidade (NRC, 1996).

A energia contida na dieta é retida e transformada em produto animal (carne e leite), sendo que esse processo depende da eficiência de utilização da energia contida nos alimentos. Sua deficiência acarreta falta de crescimento, falhas na reprodução e perdas de reservas corporais, reduzindo a produtividade animal (FREITAS et al., 2006). Segundo Lima et al. (2011), em bovinos a deficiência de energia desencadeia acentuada diminuição no peso e no consumo de alimentos.

O metabolismo basal está relacionado à mínima produção de calor necessária para que ocorram os processos vitais de um animal saudável, em jejum e em repouso (FERREL et al., 1988). Segundo Ferrel et al. (1988) a energia gasta pelos órgãos corresponde a cerca de 50 a 65% do metabolismo basal, esse gasto ainda pode ser explicado pelo “turnover” proteico e pelas atividades de transporte de íons, podendo variar de acordo com o nível nutricional, estado fisiológico e a raça.

O conceito de manutenção não é o mesmo que metabolismo basal, pois na manutenção o animal não está em jejum (LAWRENCE; FOWLER, 1997). As exigências de energia para manutenção podem corresponder a 70% das exigências totais de energia nos bovinos destinados à produção de carne (NRC, 1996). Alguns autores afirmam que as diferenças nas exigências de manutenção são componentes chaves e definem as variações na eficiência entre os animais, e que, esta pode variar de 10 a 12% em bovinos de corte (HOTOVY et al., 1991; SWANSON; MILLER, 2008).

A produção de calor do animal alimentado corresponde à energia metabolizável para manutenção, esta considera o incremento calórico da dieta e produz mais calor comparado à energia líquida de manutenção, pois o processo de comer, digerir e metabolizar o alimento requer energia, aumentando a produção de calor (LAWRENCE; FOWLER, 1997). Ainda, segundo Lawrence e Fowler (1997) a energia líquida de manutenção pode sofrer influência de vários fatores para a produção de calor como: idade, peso, raça, espécie, sexo, estágio fisiológico, nutrição e condições ambientais.

Foi verificado que a produção de calor influencia diretamente a eficiência alimentar de bovinos. Nkrumah et al. (2006) mediu a produção de calor de novilhos com fenótipos diferentes para CAR, utilizando a técnica de calorimetria indireta, e observou que os animais de baixo CAR produziram 21% menos calor do que novilhos com alto CAR.

Carcaças de animais divergentes para CAR já foram comparadas verificando-se diferenças na composição corporal. Arhtur et al. (2008) observaram que animais com CAR negativo possuem alteração na composição corporal e na atividade das proteases, cujas mudanças no metabolismo de proteínas e gorduras podem ter efeito sobre a qualidade da carne. Em relação a composição corporal, animais com

maior proporção de tecido muscular são considerados mais eficientes em relação a animais com maior deposição de tecido adiposo na carcaça (BASARAB et al., 2003; NKRUMAH et al., 2004). Em animais da raça Angus foi observado que as diferenças na composição corporal contribuem para 5% da variação genética do CAR e que a deposição de gordura subcutânea na 12^a/13^a costelas foi positivamente correlacionada com o CAR (0,17) (ARTHUR et al., 2001a). Nkrumah et al. (2004) encontraram correlação genética positiva entre CAR e deposição de gordura na carcaça variando de 0,14 a 0,30. Também já foram observadas correlações negativas entre CAR e deposição de músculo variando de -0,21 a -0,14 (BASARAB et al., 2003). Lemes e Gomes (2007), em um estudo com animais Nelore, também relataram que animais de baixo CAR apresentam menor deposição de gordura subcutânea, menores quantidades de gordura renal pélvica e inguinal e maior área de olho de lombo, corroborando com os demais autores que animais mais eficientes para CAR apresentam um ganho maior em proteína e menor em gordura.

A definição de estresse, dada por Bearden e Fuguay (1980), são as mudanças ambientais suficientemente bruscas que afetam a fisiologia, comportamento e a produção animal. Animais de alto CAR são mais susceptíveis ao estresse devido às evidências de associações genéticas para o CAR e o nível de cortisol plasmático (RICHARDSON et al., 2004). Gomes et al. (2008), avaliando animais Nelore extremos para CAR e submetidos à privação de água e alimentos por 24 horas, encontraram menores níveis séricos de cortisol nos animais mais eficientes para CAR. O estresse desencadeia respostas fisiológicas que incluem aumento no consumo e na taxa de energia metabólica juntamente com o aumento de processos catabólicos, tais como aumento da lipólise e da degradação de proteínas (KNOTT et al., 2008), indicando que existe uma relação da eficiência alimentar com as respostas ao estresse de bovinos.

4. Medidas de eficiência alimentar

As diversas medidas de eficiência alimentar consideram fatores como ingestão de alimentos, peso vivo do animal, estado fisiológico, composição do ganho de peso,

condições ambientais, idade, taxas de digestão e absorção, além da eficiência de utilização da energia e proteína metabolizável (NRC, 1996).

Ao longo dos anos, muitas medidas diferentes de eficiência alimentar têm sido propostas, em virtude disso a eficiência de utilização do alimento pode ser expressa de várias formas como: conversão alimentar (CA), eficiência bruta (EB), eficiência de manutenção (EM), consumo alimentar residual (CAR), eficiência parcial de crescimento (EPC), taxa relativa de crescimento (TRC), índice de Kleiber (IK), ganho residual (GR), dentre outras (ARCHER et al., 1999; ARTHUR; HERD, 2005; GOMES et al., 2012).

A maioria dos índices de eficiência alimentar tem a desvantagem de ser medida a partir do consumo individual dos animais, com exceção do índice de Kleiber, tornando os custos mais altos na identificação dos animais superiores para essa característica (ROBINSON, ODDY, 2004).

O índice de Kleiber (IK), descrito por Kleiber em 1936, não necessita da mensuração de consumo individual dos animais, sendo utilizado para identificar indivíduos com alta eficiência de crescimento relativo ao tamanho corporal. O IK é calculado pelo ganho de peso diário por unidade de peso vivo metabólico (Peso Vivo^{0,75}):

$$IK = GPD / PV^{0,75}$$

Para a interpretação do índice, valores altos indicam maior diluição das exigências de manutenção, ou seja, maior é o crescimento corporal obtido sem aumento do custo da energia de manutenção (ARCHER et al., 1999).

Outro índice, sugerido por Fitzhugh e Taylor (1971) mede a eficiência como o ganho de peso referente ao tamanho instantâneo do corpo, denominado taxa relativa de crescimento (TRC), a qual é definida como a razão da diferença do logaritmo do peso final e do logaritmo do peso inicial pelo tempo em confinamento, calculando a porcentagem de mudança no peso corporal por dia:

$$TRC = \frac{\log \text{segundo peso} - \log \text{primeiro peso}}{\text{segunda idade} - \text{primeira idade}} \cdot 100$$

A eficiência parcial de crescimento (EPC) é definida como a razão do ganho médio diário (GMD – ganho de peso adquirido por dia) pela diferença do consumo de matéria seca (CMS – conteúdo em quilos de matéria seca ingerida) observado e do CMS estimado para manutenção. EPC é a quantidade de massa ganha para cada kg de alimento disponível para esta finalidade. Maiores valores de EPC são mais favoráveis (ARTHUR et al., 2001). Para seu cálculo a fórmula usada é:

$$EPC = GMD / (CMS - CMSm)$$

O consumo de matéria seca estimado para manutenção (CMSm) usado para mensuração da EPC é calculado conforme o NRC (1996) pela razão do requerimento de energia líquida do animal para manutenção pela energia líquida de manutenção da dieta.

A taxa de conversão alimentar (CA) é definida pela divisão entre a ingestão de matéria seca diária (IMS) e o ganho médio de peso diário (GMD):

$$CA = IMS / GMD.$$

A eficiência alimentar bruta (EB) é a razão inversa da conversão alimentar, considerando a IMS e o GMD:

$$EA = GMD / IMS \text{ (GUNSETT, 1984).}$$

A eficiência é definida como uma razão de conversão alimentar (CA) (kg de consumo: kg de ganho) (KOCH et al., 1963; ARCHER et al., 1999; MOORE et al.; 2008; ARTHUR et al., 2001). É um parâmetro altamente correlacionado com a taxa de crescimento e ganho de peso à idade adulta (KOOTS et al., 1994 apud MOORE et al., 2008; LANNA et al., 2003). A conversão alimentar, sendo usada como parâmetro na seleção para eficiência alimentar, leva ao aumento do tamanho adulto das vacas, o que é indesejável por comprometer a eficiência reprodutiva, bem como reduzir o ganho de peso no setor de cria (LANNA et al., 2003).

Um índice alternativo para medir a eficiência alimentar e que não levaria ao aumento do tamanho adulto dos animais seria o consumo alimentar residual (CAR) (NASCIMENTO, 2011). Esta medida é geneticamente independente do peso vivo e do nível de produção (ARTHUR et al., 2001) e apresenta potencial de utilização que

permite comparações de eficiência energética líquida e alimentar entre animais de peso à idade adulta inalterado (NASCIMENTO, 2011).

O CAR é a medida de eficiência alimentar mais estudada em bovinos de corte nas últimas duas décadas (MERCADANTE et al., 2013). Em bovinos de corte o conceito de CAR foi usado pela primeira vez por Koch et al. (1963), este permite comparar a eficiência de utilização dos alimentos entre animais contemporâneos com diferentes pesos vivos e níveis de produção. O CAR é calculado como a diferença entre o consumo real e a quantidade de alimento que um animal deveria comer baseado no seu peso vivo médio e na sua velocidade de ganho de peso:

$$\text{CAR} = \text{IMS}_{\text{observada}} - \text{IMS}_{\text{estimada}}[f(\text{GMD}; \text{PV0},75)]$$

Animais eficientes têm CAR negativo, ou seja, o consumo observado é menor do que o predito. Já os animais menos eficientes tem CAR positivo, sendo o consumo observado maior do que o predito (ALMEIDA et al., 2004; NKRUMAH et al., 2006).

O ganho residual (GR) tem o mesmo conceito para mensuração do CAR, é obtido pela diferença entre o ganho individual observado daquele predito por equação de regressão composta pelo CMS e o peso vivo metabólico para manutenção (PVMM) (KOCH et al., 1963).

O consumo e ganho residual (CGR) foi proposto por Berry e Crowley (2012). Segundo os autores essa medida tem como objetivo identificar animais de crescimento rápido e que consumam menos alimento que o esperado, sem apresentar diferenças no peso vivo. Este é estimado pela seguinte fórmula:

$$\text{CGR} = -1 \cdot \text{CAR} + \text{GR}$$

Quando o melhoramento genético para animais mais eficientes para a eficiência alimentar é almejado não se aconselha a utilização de um único índice de eficiência, entretanto, esta característica deve ser incluída no melhoramento genético para aumentar a rentabilidade e a sustentabilidade da bovinocultura de corte (ARCHER et al., 1999).

5. A raça Nelore

O Nelore é uma raça de origem indiana, do Estado de Andra, oriunda da antiga província Madras, cujos primeiros animais chegaram ao Brasil no ano de 1868 na cidade de Salvador/BA (BRITO, 2012). Na Índia, por questões culturais e religiosas o bovino não se destina à produção de carne, sendo utilizado mais nos transportes de cargas e na produção de leite (BRITO, 2012).

Logo após as importações da Índia, a raça Nelore se multiplicou de forma espantosa (LIMA, 1989), isso se deve aos seus índices elevados de desempenho produtivo e reprodutivo em climas tropicais (OLIVEIRA et al., 2002), pois apresentou a capacidade de aproveitar alimentos grosseiros para se manter (ACNB, 2014). Além disso, a raça Nelore passou por intenso melhoramento genético, sendo direcionada quase que exclusivamente à produção de carne (ACNB, 2014).

O Nelore apresenta resistência natural a parasitas, é resistente ao calor, pois seu metabolismo é mais baixo e gera menor quantidade de calor comparado aos bovinos de origem europeia, assim como machos e fêmeas apresentam elevada longevidade reprodutiva. Este é o motivo que leva o Brasil a ter um rebanho de quase 200 milhões de bovinos criados a pasto, dos quais 80% do gado de corte são Nelore ou anelorado (ACNB, 2014).

O Nelore é um animal extremamente adaptado às condições brasileiras, tanto ao ambiente quanto ao sistema de produção. A criação destes animais é predominantemente a pasto, com suplementação mineral (ABIEC, 2014).

6. Biologia molecular no estudo da eficiência alimentar de bovinos

A Biologia Molecular é o estudo que coloca em foco a estrutura e função do material genético, investigando as interações entre os diversos sistemas celulares, incluindo a relação entre DNA, RNA e síntese protéica (APA, 2015).

A seleção baseada no genótipo tornou-se importante na criação de bovinos, uma vez que, segundo Walsh (2000), o melhoramento genético de bovinos é baseado na seleção fenotípica. A seleção baseada no fenótipo é limitada e influenciada pela idade do animal e ambiente (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998).

No Brasil, em 1997 mais de 170 touros foram testados para eficiência alimentar, esse número cresceu até o ano 2000 com mais de 500 touros testados por ano (ALMEIDA, 2005; HERD; ARTHUR, 2012). Ainda segundo os mesmos autores, a adoção pelos criadores tem diminuído desde 2004 devido ao alto custo e complexidade de obtenção dos registros de consumo alimentar individual. Para Moore et al. (2008) o uso da biologia molecular é uma alternativa atraente para a medição direta em um grande número de animais.

A detecção de genes candidatos pode contribuir significativamente para os programas de melhoramento genético de bovinos de corte, auxiliando a explicar parte dos mecanismos moleculares que conduzem as variações que influenciam a eficiência alimentar (Nkrumah et al., 2006).

7. RNA-seq (Sequenciamento do ácido ribonucleico)

O RNAseq (sequenciamento de RNA) é utilizado para sequenciar o DNA complementar (cDNA) (CHEPELEV et al., 2009), e permite construir uma biblioteca de transcritos, catalogando os diferentes tipos de transcrição para determinar a estrutura da transcrição de genes, os padrões de “splicing” e outras modificações pós-transcricionais (CHEPELEV et al., 2009).

Nas análises de RNAseq, realizadas por Tiziotto (2014), de animais Nelore com fenótipo divergente para CAR foram encontrados 138 genes classificados como diferencialmente expressos ($<0,05$), dos quais 112 genes são anotados ou conhecidos. Foram identificados 54 genes com menor nível expressão (“down-regulated”) e 84 com maior nível de expressão (“up-regulated”) para o grupo de baixo CAR. Chen et al. (2011) analisaram perfis de expressão gênica de fígado por microarranjos para identificar genes diferencialmente expressos em bovinos da raça Angus divergentes para CAR, e seis genes se repetiram nos estudos desses dois autores, dentre eles o *RGS2* (“regulator of G-protein signaling 2”) e *SLC2A5* (“solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5”).

8. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa é utilizada na determinação da expressão absoluta ou relativa de um gene de interesse. Neste caso, a extração do RNA da amostra é realizada, seguida por conversão do RNA em cDNA pela técnica de transcrição reversa e, finalmente, amplificação do cDNA por PCR (NASCIMENTO et al., 2010).

A técnica de PCR em tempo real, permite a detecção, ciclo a ciclo, com elevada sensibilidade e especificidade da intensidade de fluorescência emitida em decorrência da amplificação da sequência de cDNA-alvo, possibilitando a análise comparativa da expressão de um determinado gene entre as amostras logo no início da fase exponencial de amplificação, em que não há saturação da amplificação. Isso só é possível porque corantes fluoróforos, com capacidade intercalante na molécula de dupla fita, são adicionados as reações de qPCR. Por ser uma técnica de elevada sensibilidade e acurácia, a PCR em tempo real tem sido uma ferramenta aplicada em diversas áreas (NASCIMENTO, 2010), dentre elas, na validação de padrões de expressão gênica observados por outras técnicas, tais como microarranjos e sequenciamento de RNA.

9. Genes alvos

É importante fazer o reconhecimento dos genes envolvidos nas rotas biológicas dos fatores que interferem na variação da eficiência alimentar, pois compreendendo o efeito da expressão dos mesmos, podemos criar alternativas para sua manipulação.

9.1. Gene candidato *SLC2A5*

O gene *SLC2A5* ("solute carrier family 2" (facilitated glucose/fructose transporter) member 5), também chamado de *GLUT5*, está presente no cromossomo 16 de bovinos e conta com 7 éxons em sua estrutura. Sua principal função é a absorção da frutose no intestino. É abundantemente expresso no intestino delgado, também encontrado em níveis elevados na membrana plasmática do espermatozóide, em

células do endotélio cerebral, músculo e gordura, embora a sua função nestes locais ainda seja desconhecida (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002442>).

Já foi observado que a baixa expressão deste gene causa redução na absorção de frutose, redução da ingestão de alimentos com alta quantidade de frutose (BARONE et al., 2009), redução do tecido adiposo branco (DU; HEANEY, 2012) e redução do peso corporal (DIETRICH et al., 2012; WATERS et al., 2013).

9.2. Gene candidato *PPP1R26*

PPP1R26 (“protein phosphatase 1, regulatory subunit 26”) está presente no cromossomo 11 de bovinos e contém 1 éxon. Este gene inibe a atividade da proteína fosfatase 1 (PP1), a qual está envolvida na desfosforilação dos resíduos de serina e treonina nas células (ZHANG et al., 2013) e o aumento da sua atividade já foi relacionada a insuficiência cardíaca em humanos (CARR et al. 2002). Além disso, e pode regular positivamente a proliferação celular e interage com *UTP20* (“UTP20, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)”) (YANG et al., 2005) e *PPP1CA* (“protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme”) (HENDRICKX et al., 2009). *UTP20* está envolvido no processamento de formação do pré-rRNA 18S (WANG et al., 2007) e a *PPP1CA* é essencial para a divisão celular, participa da regulação do metabolismo do glicogênio, contração muscular e síntese de proteína (SCHMUTZ et al., 2011).

9.3. Gene candidato *RGS2*

O gene *RGS2* (“regulator of G-protein signaling 2, 24kDa”) está localizado no cromossomo 16 dos bovinos e tem 5 éxons. A proteína deste gene está envolvida em vários processos biológicos, alguns já conhecidos estão relacionados ao controle da pressão arterial, sistema imune, relaxamento do músculo liso vascular, aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SANTOS et al., 2000; LE; COFFMAN, 2003). O nocaute deste gene em camundongos resultou em diminuição do peso corporal, redução no depósito de gordura e diminuição nos níveis de leptina (OTA et al., 2013)

9.4. Gene candidato *UCP2*

Segundo Tsuboyama-Kasaoka et al. (2001) o gene *UCP2* (“uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)”) está envolvido no controle da termogênese adaptativa (exposição ao frio e à dieta), produção de oxigênio reativo na mitocôndria, síntese de ATP e regulação da oxidação de ácidos graxos. Devido a sua ampla expressão em vários tecidos, o *UCP2* pode ter um papel importante na determinação da taxa de metabolismo basal (LENTES et al., 1999). Nos bovinos está localizado no cromossomo 15 (STONE, 1999) e é composto por 8 exóns (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281562>).

9.5. Gene candidato *FADS2*

Este gene está no cromossomo 29 de bovinos e apresenta 12 éxons em sua estrutura. *FADS2* (“fatty acid desaturase 2”) codifica enzimas para a biossíntese de ácido graxos poliinsaturados de cadeia longa (LCPUFA) (SIMOPOULOS, 1999), o $\Delta 6$ -dessaturase que é codificado pelo *FADS2* pode ser um limitante na velocidade da biossíntese de LCPUFA (MATHERS; BAILEY, 1975). Park e colaboradores (2011) verificaram que a perda de atividades do *FADS2* em células cancerosas desliga a biossíntese normal de LCPUFA, além de ser um supressor de tumor em distúrbios neoplásicos. Estudo com marcadores do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) encontrados neste gene mostrou associação com característica de qualidade de carne de bovinos como rendimento de carcaça e aumento na espessura de gordura subcutânea (MATSUMOTO et al, 2014).

9.6. Gene candidato *FABP1*

Gene localizado no cromossomo 11 e composto por 4 éxons. A proteína de ligação de ácidos graxos no fígado (L-FABP) produzida pelo gene *FABP1* (“fatty acid binding protein 1, liver”) tem alta afinidade e capacidade de se ligar a ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (EK-VON et al., 2001). Também possui a habilidade de aumentar a absorção celular dos AGCL, minimizando os efeitos tóxicos destes

lipídios pouco solúveis, além disso, faz transporte de ácidos graxos para o núcleo para a regulação de receptores nucleares importantes na transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo da glicose (ATSHAVES et al., 2010). Wang et al. (2005) sugerem que a proteína L-FABP tem papel importante no stress oxidativo das células, pois linhagens de células cultivadas que expressavam L-FABP apresentaram menor nível de oxigênio reativo celular.

OBJETIVO

Contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos que concorrem para a variação na eficiência alimentar em bovinos Nelore, observando a relação entre o padrão de expressão de genes candidatos e as medidas de eficiência alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento utilizou dados fenotípicos e amostras biológicas coletadas no projeto denominado “Estratégias genéticas para melhoria da eficiência de produção e da qualidade da carne bovina no Brasil”, coordenado pela Embrapa Pecuária Sudeste.

Os detalhes da obtenção desses dados são apresentados no item 1 dessa seção para facilitar a compreensão, apesar de não terem sido realizados no presente estudo.

1. Os animais experimentais

Um total de 83 novilhos foram gerados por meio de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), no ano de 2009. Estes animais ficaram confinados na Embrapa Pecuária Sudeste (Latitude: 21°57'42"(S), Longitude: 47°50'28" (W), Altitude: 860m), onde foram avaliados para características de desempenho, consumo, eficiência alimentar em confinamento, características de carcaça e deposição de gordura.

A eficiência alimentar foi mensurada utilizando os dados de consumo individual diário de matéria seca, ganho em peso e conversão alimentar dos animais confinados em baias coletivas, providas de cochos individuais com portão eletrônico, ou em baias individuais. O período de adaptação foi de aproximadamente 28 dias e o período experimental foi cerca de 100 dias, sendo esse último dependente do grau de terminação dos animais (Nascimento, 2011).

A dieta fornecida aos animais era composta por silagem de milho contendo, no mínimo, 35% de matéria seca e alto teor de grãos, e concentrado constituído de milho em grão moído, farelo de soja, calcário calcítico, mistura mineral, uréia e monensina sódica (Rumensin®). A dieta foi formulada para ter 13% de proteína bruta e 71% de nutrientes digestíveis totais estimados, numa proporção de 60:40 (volumoso:concentrado). No período de confinamento, a dieta foi fornecida duas vezes ao dia e a quantidade de ração oferecida (mistura total composta de silagem de milho + concentrado) foi ajustada em função das sobras observadas, procurando garantir consumo à vontade. O consumo foi mensurado diariamente e as sobras do

cocho retiradas e pesadas uma vez ao dia, sempre pela manhã. As análises de matéria seca de alimentos e de sobras foram realizadas semanalmente. Os animais foram pesados a cada 14 dias, sem jejum, no início e no fim do período experimental, após 16 horas de jejum de água e de alimento (Nascimento, 2011).

Para mensurar o consumo alimentar residual foram usados os valores obtidos do consumo predito de matéria seca (CMS) utilizando o programa estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2009), onde foi obtida uma regressão conjunta do consumo diário de matéria seca em função do peso vivo metabólico médio (PVMM) e ganho de peso médio diário (GPD) dos animais. A partir da regressão obtida foram estimados os valores preditos de consumo de matéria seca e calculado o consumo alimentar residual (CAR) para cada animal (consumo observado menos o consumo predito). Além do CAR, as medidas de CMS (consumo de matéria seca), CMSpv (consumo de matéria seca em relação ao peso vivo), CA (conversão alimentar), IK (índice de Kleiber), PM (peso médio), EA (eficiência alimentar), PMM (peso médio metabólico), GPDreg (ganho de peso diário medido pela regressão) e TRC (taxa relativa de crescimento) também foram mensuradas (Nascimento, 2011).

Após cerca de 100 dias de confinamento os animais foram abatidos nos meses de Novembro e Dezembro de 2011, no frigorífico da cidade de Bariri, para avaliação de composição e qualidade da carcaça e da carne. Amostras de fígado dos 83 animais foram coletadas em linha de abate para realização do presente estudo. Foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até o processamento.

1.1. Animais extremos para EA e análise de RNAseq

1.1.1. Seleção dos animais extremos para eficiência alimentar

Dos 83 animais avaliados para eficiência alimentar, as amostras de fígado procedentes de animais com desempenhos extremos para eficiência alimentar foram selecionadas com base no valor genético predito calculado por meio de um modelo animal, no qual os dados de pedigree foram incluídos de forma agregada para os

respectivos animais, com avaliação da variância genética para as características incluídas na análise (OLIVEIRA, 2014).

Os animais foram classificados como extremos com base no valor genético para CAR, sendo selecionados 10 animais em cada categoria, totalizando 20 animais (OLIVEIRA, 2014).

1.1.2. Sequenciamento do RNA (RNAseq)

O perfil transcricional desses 20 animais foi obtido mediante o sequenciamento de RNA realizado no laboratório multiusuário FAPESP, localizado no laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP. As sequências obtidas pelo HiScanSq (Illumina, Inc., San Diego, CA) foram analisadas a fim de identificar os transcritos diferencialmente expressos entre os extremos de CAR. Nessas análises foram identificados 138 genes diferencialmente expressos (DE), dentre os quais 84 foram *upregulated* e 54 foram *down-regulated* em animais com baixo CAR (TIZIOTTO, 2014).

Mediante a caracterização e análise funcional dos genes DE identificados nas análises de RNAseq foram escolhidos seis genes que apresentavam-se funcionalmente importantes para a determinação do fenótipo em estudo.

2. Extração, análise de qualidade e quantificação do RNA

O procedimento da extração de RNA foi realizado de forma cuidadosa para preservar a integridade do material extraído, pois a degradação do produto afeta no desempenho da técnica de PCR quantitativa em tempo real.

O tecido (fígado) foi submetido à pulverização em nitrogênio líquido e destinado à extração de RNA com Trizol[®] (Invitrogen), seguindo o protocolo adaptado de Chomczynski e Sacchi (1987).

As amostras de RNA total foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, e vinte e quatro amostras aleatórias foram avaliadas no equipamento Agilent Bioanalyzer 2100[®] (Agilent Technologies). Os testes foram feitos para verificar a integridade dos RNAs extraídos.

O perfil transcricional desses animais foi obtido mediante o sequenciamento de RNA.

*TIZIOTTO, P.C. (Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos/SP) Comunicação Pessoal, 2014.

A concentração do RNA total foi quantificada por um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000, e a pureza foi avaliada pela relação de absorbância 260/280 considerando aceitáveis as amostras que apresentaram relações entre 1,8 e 2,2.

Todas as amostras passaram por tratamento com a enzima DNase I (Deoxyribonuclease I – Invitrogen®) para remoção de vestígios do DNA genômico. Após tratadas, as mesmas foram armazenadas em freezer -80 °C para posterior realização da síntese de cDNA (DNA complementar).

3. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA, 1 ug de RNA total, tratado com a enzima DNase I, foi submetido à transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa (SuperScriptIII - Invitrogen®) de acordo com as instruções dos fabricantes. Após a transcrição reversa as amostras foram diluídas a 1:5 (0,2X) para serem usadas nas reações de qPCR (PCR quantitativa em tempo real). As amostras foram armazenadas a -20 °C para análises subsequentes.

4. Reação da PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços (Applied Biosystems, Warrington, UK). Cada reação continha 1µL de cDNA diluído 1:5 (0,2X), 5 µL de SYBR green master mix (Applied Biosystems), oligonucleitídeos (“Forward” (F)/ “Reverse” (R)) e água para completar o volume de 10µL por reação. A Tabela 1 apresenta as concentrações iniciais e finais para cada reagente.

Tabela 1: Reagentes e concentrações iniciais e finais da reação de qPCR.

Reagentes	[inicial]	[final]	Volume - 1 reação
SYBR master mix	2x	1x	5 µL
cDNA	0,2x	0.04x	2 µL
Forward/Reverse:			
<i>UCP2/RGS2/</i>	5µM	0,125µM	0,25µL
<i>YWHAZ/RPL19</i>			
Forward/Reverse:			
<i>SLC2A5</i>	5µM	0,150µM	0,3 µL
Forward/Reverse:			
<i>PPP1R26/FABP1</i>	5µM	0,100µM	0,2µL
<i>FADS2</i>			
Água	-	-	Completar para 10µL

O modelo de ensaio seguido foi segundo Hellemans et al. (2007), o qual sugere uma estratégia de maximização, que separa as réplicas em placas diferentes de modo que as reações passem por uma randomização, para evitar os efeitos de variações sistemáticas que podem ser introduzidas dentro de uma placa. Além disso, o autor sugere o uso de calibradores internos para melhorar a avaliação da variação entre placas. Para ser considerado um calibrador interno o seu padrão de amplificação deve ser conhecido. Neste ensaio o calibrador interno usado foi o gene RPL19.

Desta forma, as reações foram dispostas em duas placas como duplicatas completas, ou seja, todas as amostras foram colocadas em uma placa e repetidas em outra de forma aleatória, com a presença de um calibrador interno (amostra de amplificação já conhecida (gene RPL19)) e NTC ("No Template Control") para cada par de oligonucleotídeo amplificado na placa (Figura 1).

Replicata 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	1.10	1.11	1.12
B	1.13	1.14	1.15	1.16	1.17	1.18	1.19	1.20	1.21	1.22	1.23	1.24
C	1.25	1.26	1.27	1.28	1.29	1.30	1.31	1.32	1.33	1.34	1.35	1.36
D	1.37	1.38	1.39	1.40	1.41	1.42	1.43	1.44	1.45	1.46	1.47	1.48
E	1.49	1.50	1.51	1.52	1.53	1.54	1.55	1.56	1.57	1.58	1.59	1.60
F	1.61	1.62	1.63	1.64	1.65	1.66	1.67	1.68	1.69	1.70	1.71	1.72
G	1.73	1.74	1.75	1.76	1.77	1.78	1.79	1.80	1.81	1.82	1.83	
H	NTC (gene)										C.interno	NTC (C1)

Replicata 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.12	1.11	1.10	1.9	1.8	1.7
B	1.18	1.17	1.16	1.15	1.14	1.13	1.24	1.23	1.22	1.21	1.20	1.19
C	1.30	1.29	1.28	1.27	1.26	1.25	1.36	1.35	1.34	1.33	1.32	1.31
D	1.42	1.41	1.40	1.39	1.38	1.37	1.48	1.47	1.46	1.45	1.44	1.43
E	1.54	1.53	1.52	1.51	1.50	1.49	1.60	1.59	1.58	1.57	1.56	1.55
F	1.66	1.65	1.64	1.63	1.62	1.61	1.72	1.71	1.70	1.69	1.68	1.67
G	1.78	1.77	1.76	1.75	1.74	1.73	C.interno	1.83	1.82	1.81	1.80	1.79
H						NTC (gene)	NTC (C1)					

Figura 1: Organização das replicatas nas placas de forma aleatória. *As numerações significam: Ex: 1.16 - gene 1, amostra16; C.interno = calibradores internos.

O equipamento de tempo real utilizado durante o experimento foi o ABI 7500 Applied Biosystems, o qual teve os seguintes parâmetros de ciclagem: 50 °C durante 2 min e 95 °C durante 10 min para ativação da enzima *taq DNA polimerase*, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1min seguidos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1min mais 95 °C durante 30 s e 60 °C durante 15 s para formar a curva de dissociação (Figura 2).

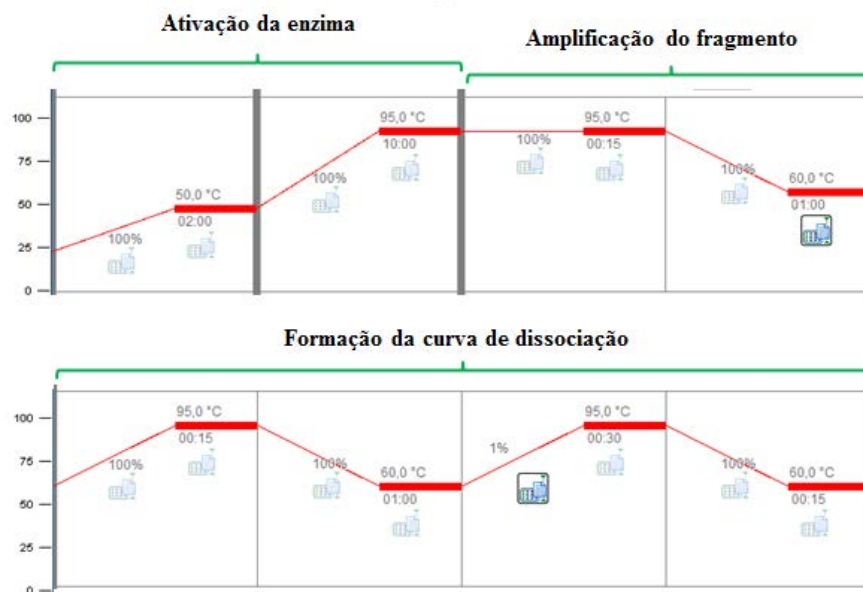


Figura 2: Ciclos para amplificação das reações de PCR em tempo real.

5. Genes do experimento

5.1. Genes referência

Os genes candidatos à referência testados foram: *RPS9* (“Ribosomal protein S9”), *RPL19* (“Ribosomal protein L19”), *HPRT1* (“Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1”) e *YWHAZ* (“Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta”), com os pares de oligonucleotídeos já utilizados por Ibelli (2012).

Os mesmos foram amplificados via qPCR e analisados pelo programa RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>).

Na Tabela 2 estão presentes as identificações dos genes (GenBank), as sequências dos oligonucleotídeos (Sequências (5' - 3')), temperatura de anelamento (TA), tamanho do fragmento amplificado em pares de bases (pb), identificação dos éxons onde está o fragmento de amplificação, e a referência dos pares de oligonucleotídeos utilizados.

5.2. Genes alvos

Os genes alvos foram escolhidos com base nas análises de RNAseq para extremos para CAR. Dos genes escolhidos como alvos para o desenvolvimento desse trabalho *UCP2* (FC: 0,527659), *RGS2* (FC: 0,899205), *FADS2* (FC: 0,904949) e *FABP1* (FC: 0,686609) foram classificados como de maior expressão, enquanto os genes *PPP1R26* (FC: -0,38877) e *SLC2A5* (FC: -3,41192) com de baixa expressão, para o grupo de baixo CAR (mais eficientes), em análise realizada e resultados encontrados por Tiziotto (2014).

Suas funções, vias metabólicas, redes gênicas, dentre outras características foram buscadas em bancos de dados de diferentes organismos, sendo os principais bovino, humano e camundongos (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Ingenuity - <https://targetexplorer.ingenuity.com/>; GeneCards - <http://www.genecards.org/>).

As sequências dos éxons de cada gene alvo foram retiradas da sequência completa de mRNA (RNA mensageiro) descrita no Ensembl

(<http://www.ensembl.org/index.html>). Os pares de oligonucleotídeos foram desenhados com o programa Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). A qualidade dos oligonucleotídeos desenhados foi avaliada com o programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>) seguido de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para verificar sua especificidade a sequência de bovinos. Os oligonucleotídeos para genes-alvo específicos foram obtidas a partir de um fornecedor comercial (Sigma-Aldrich Ireland, Dublin, Irlanda). As características dos pares de oligonucleotídeos dos genes alvos se encontram descritos na Tabela 3.

Tabela 2: Identificação e características dos pares de oligonucleotídeos usados como candidatos a gene referência.

Gene	* Ensembl	Sequências (5' - 3')	TA (C°)	Tamanho (pb)	Éxon	Referência
RPS9	NM_001101152.1	F: GTGAGGTCTGGAGGGTCAAA (20pb)	57,2°C	108pb	E2	Ibelli, 2012
		R: TCTGTTTGAAGGTAATGCCC (20pb)	58,3°C		E3	
RPL19	NM_001040516.1	F: ACCTGGATGAGGAGGATGAG (20pb)	58,5°C	92pb	E2	Ibelli, 2012
		R: GTACAGGCTGTGATACATGTGG (22pb)	58,5°C		E3	
YWHAZ	NM_174814.2	F: GAACTCCCCCTGAGAAAGCCT (20pb)	58,9°C	146pb	E4	Ibelli, 2012
		R: CCGATGTCCACAATGTCAAG (20pb)	57,6°C		E5/E6	
HPRT1	NM_001034035	F: TGCTGAGGATTTGGAGAAGG (20pb)	57,6°C	105pb	E2	-
		R: CAACAGGTGCGCAAAAGAACT (20pb)	57,7°C		E3	

Tabela 3: Características dos pares de oligonucleotídeos dos genes alvos.

Gene	*Ensembl	Sequências (5' - 3')	TA (C°)	Tamanho (pb)	Éxon
SLC2A5	NM_001101042.2	F: CGATCTACTACTACGCAGACCA (22pb)	57,2°C	103pb	E2
		R: GTTATCAGCACATTGACAGCAC (22pb)	58,3°C		E3
PPP1R26	XM_002691719.3	F: CTCCATAGACAGCGATGACAG (21pb)	58,5°C	96pb	E1
		R: CCTCCTGGAATTTCTGATCC (20pb)	58,5°C		
RGS2	NM_001075596.1	F: AAGATTGGAAGAGCCGTTTGAG (22pb)	58,9°C	105pb	E2
		R: GAGAAGGCTTGATGAAGGTTTG (22pb)	57,6°C		E3
FADS2	NM_001083444.1	F: GCTTCATACCCCTCTTTTCT (22pb)	58,0°C	140pb	E12
		R: CACAGAAGGGCAGAGGATTG (20pb)	58,3°C		
UCP2	NM_001033611.2	F: AGACGAGATACATGAACTCTGC (22pb)	57,7°C	119pb	E7
		R: GAGAAAGGAGGGCATGAACC (20pb)	58,2°C		E8
FABP1	NM_175817	F: GGTTCAGCAGGAAGGTGATAAT (22)	57,8°C	101pb	E3
		R: CCTTCGTCATGGTACTGGTAA (21pb)	55,3°C		E4

*Ensembl: número de acesso no banco de dados Ensembl à sequencia de mRNA

6. Eficiência de amplificação e Padronização dos dados

Os dados de fluorescência obtidos no equipamento ABI 7500 Applied Biosystems foram exportados para o programa LinRegPCR (RUIJTER et al., 2009) para obter a eficiência individual, utilizando o mínimo de três pontos da curva de amplificação na fase exponencial, e os valores de Cq para cada amostra. Para determinar a quantidade de RNAm e a eficiência de amplificação o programa utiliza uma análise de regressão linear dos dados de fluorescência da fase exponencial da PCR.

Com a eficiência individual de cada amostra foi realizado o procedimento de correção para a eficiência ideal, definida como 2 (significa que a cada ciclo da qPCR está dobrando a quantidade do produto inicial (BUSTIN et al., 2009)), pela seguinte equação:

$$Cq_{ij} = \log_2 (E_{gene\ ij}^{1/Cq_{gene(ij)}})$$

Sendo:

Cq_{ij} é Cq da amostra ij corrigido para eficiência 2.0,

$E_{gene\ ij}^{1/Cq_{gene(ij)}}$ é a eficiência real calculada pelo LinRegPCR elevado o Cq da amostra para o gene ij.

Para a normalização dos Cq dos genes alvos, foi preciso obter valores BLUP (“Best linear unbiased predictor”) para o efeito animal, sendo estes considerados como fatores de ajustes dos dados. Para isso, os valores de Cq dos genes referência foram considerados em um modelo que inclui efeito fixo do gene referência e aleatório associado ao animal, considerando a variabilidade natural do indivíduo amostrado, adotando a seguinte equação com abordagem de modelos mistos:

$$y_{ijk} = \mu + C_i + G_j + b_1(A_{ijk} - \bar{A}) + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

Onde:

y_{ijk} é o Cq na base 2 observado para grupo de contemporâneo i, no gene referência j no animal k;

μ é a média geral;

c_i é o efeito fixo do ith grupo de contemporâneos (i=1, 2);

g_j é o efeito fixo do j th gene referência (j =gene1, gene 2);

a_k é o efeito aleatório associado ao k th animal ($a_k \sim N(0; \sigma_a^2)$);

e_{ijk} é o efeito aleatório residual ($e_{ijk} \sim N(0; \sigma_e^2)$).

A correção dos graus de liberdade foi feita utilizando-se o método de Satterthwaite (SATTERTHWAITE, 1946). Adicionalmente, foi considerado variâncias específicas para cada um dos genes de referência.

7. Análise de Associação

Para avaliar as implicações dos resultados associados à qPCR em relação aos fenótipos para a característica de eficiência alimentar, tais medidas foram utilizadas como variáveis dependentes. Para a associação da quantificação das expressões dos genes *PPP1R26*, *UCP2*, *SLC2A5*, *RGS2*, *FABP1* e *FADS2* com as medidas: PM, PMM, GPDreg, CMS, CMSpv, CA, EA, IK, TRC e CAR foi utilizado um modelo denominado completo, que considera a expressão de todos os genes concomitantemente. Este modelo foi escolhido por não ter colinearidade entre as variáveis.

O modelo matemático utilizado foi o seguinte:

$$y_{ij} = \mu + C_i + b_1(A_{ij} - \bar{A}) + \sum_{k=1}^6 g_k(G_{ijk} - \bar{G}_k) + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

Onde:

y_{ij} é a resposta fenotípica;

μ , C_i e b_1 são os parâmetros fixos associados respectivamente à média geral, ao fator grupo de contemporâneos (definido por data de abate, $i=1, 2$), ao efeito linear de idade do novilho ao abate;

g_k são parâmetros fixos associados às expressões lineares dos genes alvos ($k=1, 2, \dots, 6$, previamente ajustadas pelos fatores estimados no modelo 1), respectivamente, para os genes: *RGS2*, *SLC2A5*, *UCP2*, *FABP1*, *FADS2*, *PPP1R26*;

ε_{ijklm} é o efeito aleatório do erro experimental, $\varepsilon_{ijklm} \sim N(0; \sigma_e^2)$.

A correção dos graus de liberdade foi feita utilizando-se o método de Satterthwaite (SATTERTHWAITE, 1946).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Qualidade do RNA extraído

As amostras de RNA submetidas à eletroforese em gel de agarose apresentaram-se integras, conforme representado na Figura 3. Nessa figura observa-se a nitidez do RNA ribossomal 28S e 18S, o qual é indicativo da integridade do RNA (PALMER; PREDIGER, 2014).

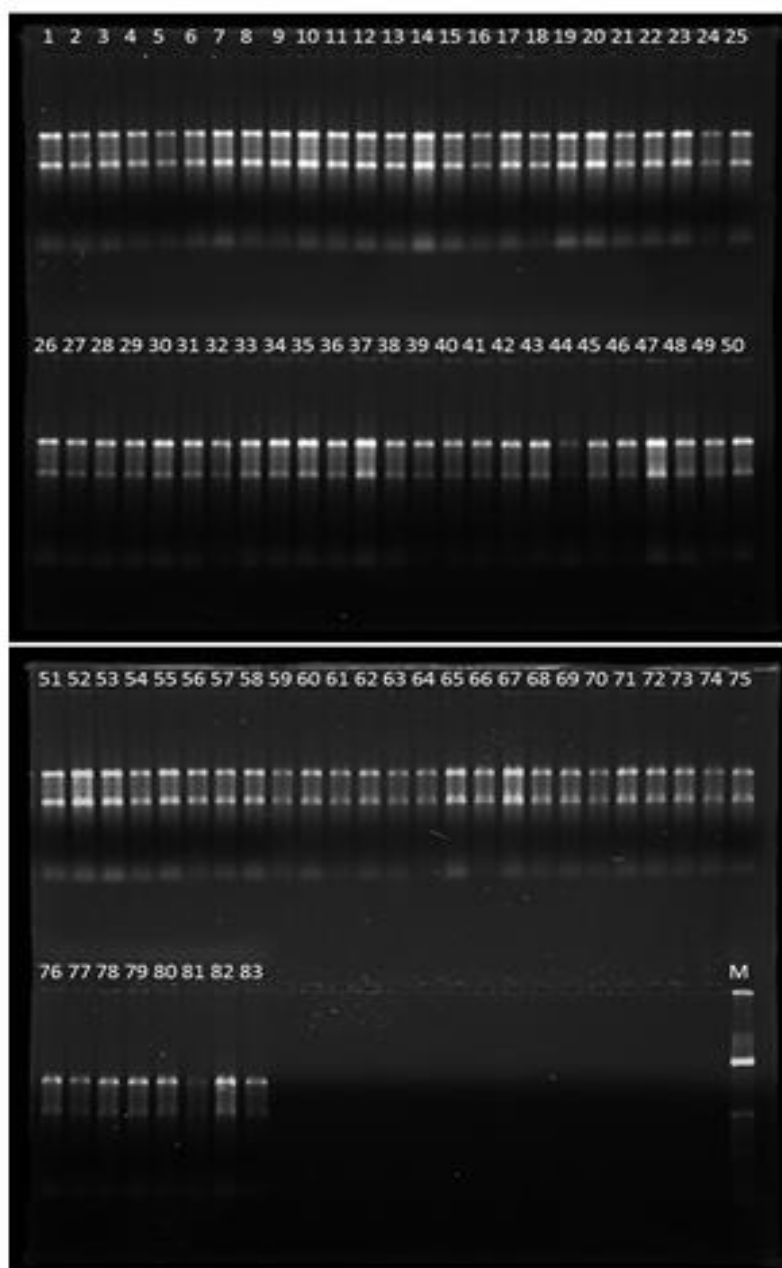


Figura 3: Amostras (1 a 83) de RNA submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. *M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Das amostras em estudo, 24 delas foram escolhidas aleatoriamente e submetidas novamente à eletroforese no equipamento Agilent Bioanalyzer 2100. Os resultados corroboram aqueles observados no gel de agarose. A integridade do RNA é visualizada mediante um eletroferograma no qual dois picos bem definidos de RNA ribossomal 28S e 18S são visualizados. Além disso, é apresentada a relação da intensidade entre os picos a qual deve ser 2:1, respectivamente (Figura 4). O equipamento Agilent Bioanalyzer 2100 utiliza uma combinação de microfluidos, eletroforese capilar e de fluorescência para avaliar tanto a concentração de RNA quanto a integridade (PALMER; PREDIGER, 2014). Dessa forma, o equipamento determina o índice “RNA Integrity Number” (RIN) que varia de 1 a 10, sendo valores acima de cinco favoráveis à realização de ensaios de qPCR. Os valores de RIN encontrados estão apresentados na Figura 5 e demonstram a integridade das amostras analisadas.

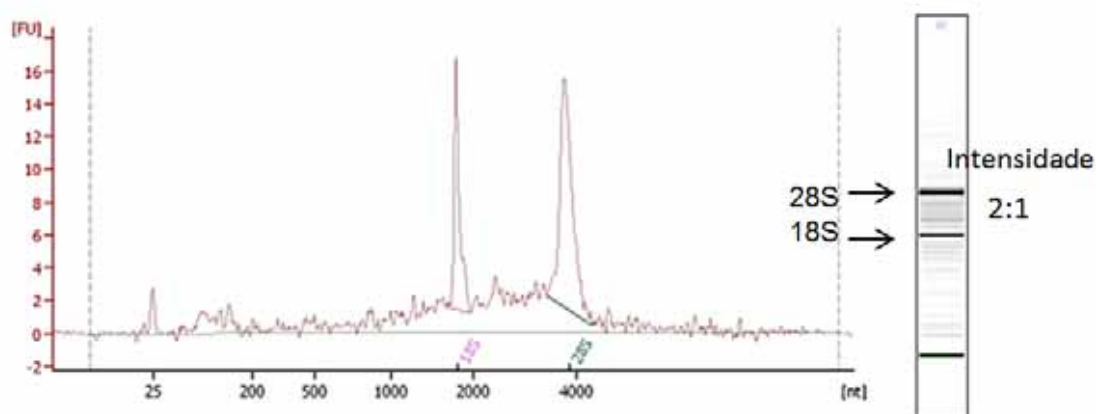


Figura 4: Eletroferograma mostrando a relação de intensidade dos RNA ribossomais 28 e 18S.

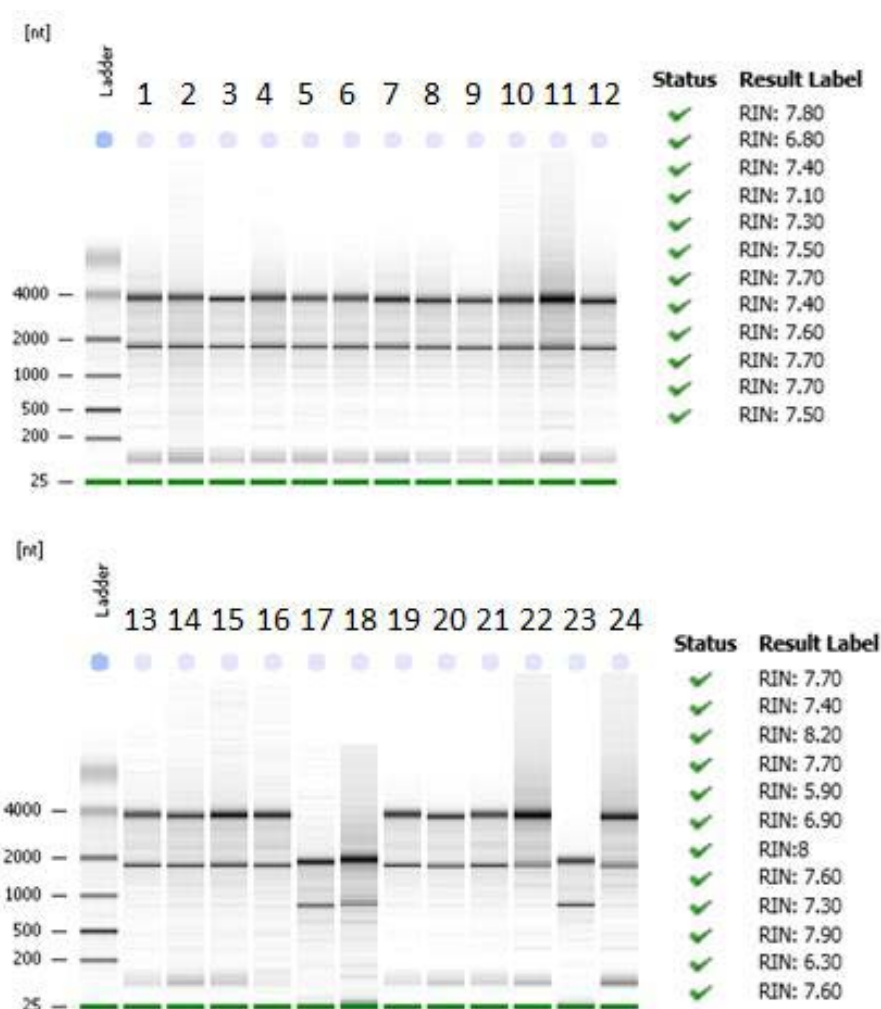


Figura 5: Resultado da integridade do RNA pelo equipamento Agilent Bioanalyzer 2100. * RIN: "RNA Integrity Number"

As quantidades obtidas, assim como os valores de pureza do RNA foram satisfatórias e estão apresentados na Tabela 4. A quantificação em espectrofotômetro é importante para que, por meio de diluições, as diferentes amostras tenham aproximadamente as mesmas quantidades de RNA (BUSTIN et al., 2009). Além disso, a avaliação da relação de absorbâncias 260/280, realizada pelo mesmo equipamento, consiste em verificar a pureza do ácido nucleico, a qual deve apresentar uma razão entre 1,8 a 2,2(WIECZOREK et al., 2012).

Tabela 4: Quantificação e razão (Abs.260/280) das amostras (1 a 83) de RNA total extraído de fígado de animais Nelore.

Quantificação e razão (Abs. 260/280) de RNA total extraído de fígado					
Amostra	ng/ul	260/280	Amostra	ng/ul	260/280
1	722,33	2,15	43	1168,31	1,93
2	808,7	1,99	44	3492,94	1,9
3	857,38	1,98	45	1563,26	1,98
4	874,71	2,09	46	2974,76	1,95
5	900,37	2,01	47	2566,5	1,96
6	985,3	1,76	48	2365,69	1,94
7	697,24	1,77	49	2419,49	1,96
8	410,54	1,87	50	3513,49	1,88
9	2235,27	1,99	51	4275,15	1,56
10	1882,86	1,94	52	2693,18	1,98
11	1812,61	1,98	53	3518,6	1,9
12	1398,4	1,96	54	3446,71	1,89
13	1241,99	1,97	55	3490,49	1,9
14	2207,8	1,95	56	2224,91	2,02
15	1532,62	1,99	57	2972,38	1,98
16	725,89	1,86	58	3704,86	1,84
17	1710,05	1,98	59	2000,8	2,02
18	1830,61	1,92	60	1860,27	2
19	1380,54	1,91	61	2686,26	2
20	2117,83	1,92	62	2175,28	2
21	547,55	1,85	63	2880,83	1,99
22	1961,02	1,92	64	3914,59	1,79
23	432,76	1,83	65	3446,33	1,88
24	573,33	1,78	66	2184,64	2
25	877,62	1,85	67	3216,89	1,96
26	453,68	1,84	68	2481,68	1,88
27	933,39	1,87	69	1996,36	2,04
28	1245,77	1,87	70	3643,63	1,88
29	1874,35	1,9	71	2399,24	1,96
30	1333,27	1,87	72	3385,76	1,9
31	2894,05	1,9	73	2664,56	1,99
32	2187,16	1,91	74	3147,87	1,98
33	2079,51	1,9	75	2815,56	2
34	1323,28	1,89	76	1767,98	1,91
35	1549,81	1,97	77	2656,65	1,98
36	2681,63	1,95	78	3728,33	1,86
37	1766,24	1,89	79	3602,29	1,89
38	2608,61	1,94	80	3471,82	1,9
39	2754,28	1,91	81	4040,42	1,74
40	2791,68	1,91	82	3239,17	1,97
41	3625,09	1,87	83	4366,82	1,53
42	2795,82	1,93			

As relações de absorvância demonstraram boa qualidade das amostras extraídas.

2. Análise da estabilidade dos genes candidatos à referência

Dentre os quatro genes avaliados o mais estável na avaliação do RefFinder foi o *RPL19* seguido do *YWHAZ*, *HPRT1* e *RPL19*. Os escolhidos para gene referência foram *RPL19* e *YWHAZ*, os quais se apresentaram mais estáveis (Figura 6).

O RefFinder é um programa que integra os principais programas computacionais (geNorm, Normfinder, BestKeeper, e do método comparativo Cq (ciclo quantitativo)) que comparam e classificam genes de referência. A partir dos resultados de cada programa ele monta um ranking, mostrando os genes mais e menos instáveis (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>).

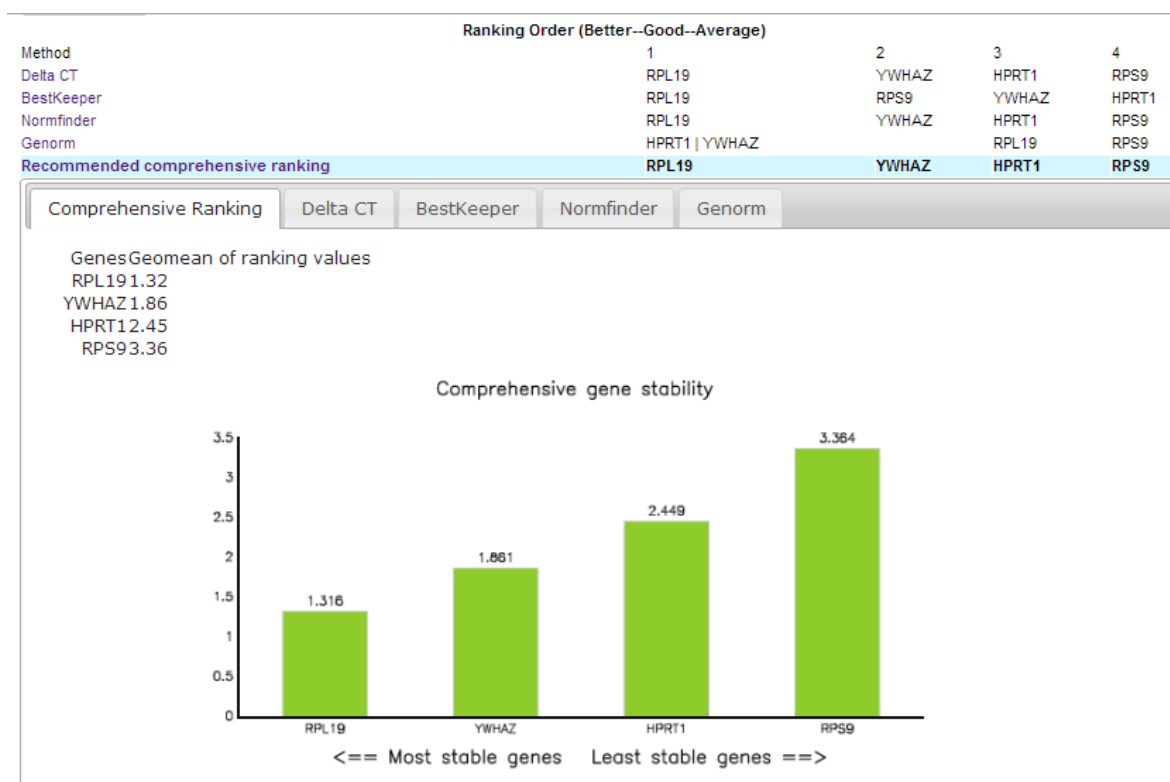


Figura 6: Ranking dos candidatos a gene referência no programa RefFinder.

O teste de estabilidade é importante para confirmar que os genes referência selecionados apresentam baixa variação de expressão no tecido em estudo (PÉREZ et al., 2008). Além disso, os genes referência atuam como controles

internos das reações de PCR em tempo real, tendo a finalidade de remover ou reduzir as diferenças da amostragem que muitas vezes estão relacionadas à quantidade e qualidade do RNA extraído (OLSVIK et al., 2005).

3. Resultados da amplificação e da eficiência dos oligonucleotídeos

Para os genes *PPP1R26*, *FABP1* e *FADS2* após a amplificação foi identificado duplo pico de “Melting” (Figura 7A), indicando a presença de dímeros. Os mesmos passaram por uma matriz de concentração de oligonucleotídeos (Tabela 5), gerando nove combinações de diferentes concentrações para reduzir a quantidade de “Forward” (F) e “Reverse” (R) na reação, de modo que eliminasse o duplo pico de “Melting” e mantivesse um pico com alta fluorescência. A concentração de oligonucleotídeos F e R que mais se adequou para os três genes foi 100nM/100nM, respectivamente.

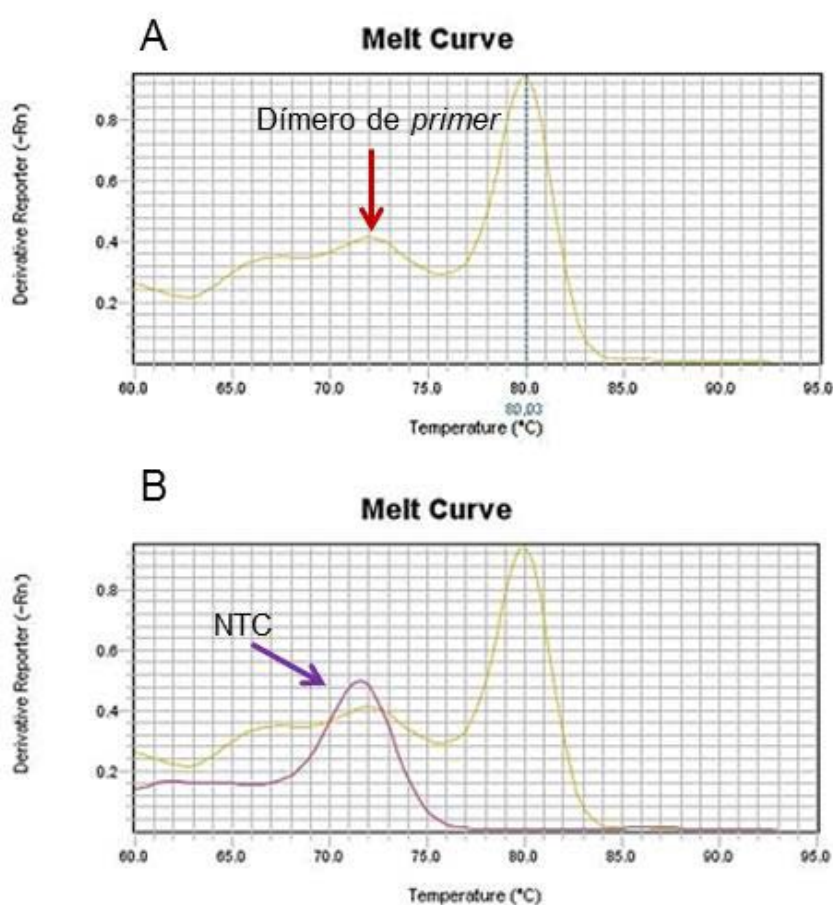


Figura 7: Duplo pico de “Melting”. Gene *PPP1R26* com presença de dímero de oligonucleotídeos. *NTC– “No Template Control” (ausência de cDNA na reação de qPCR para detectar possíveis contaminantes).

Tabela 5: Matriz de concentração de oligonucleotídeos.

F/R	50nM	75 nM	100 nM
50 nM	50/50	75/50	100/50
75 nM	50/75	75/75	100/75
100 nM	50/100	75/100	100/100

Todas as amostras em estudo apresentaram o tamanho de pares de base (pb) específico para cada par de primer (Figura 8) e, a análise da curva de Melting também demonstrou especificidade da amplificação (Figura 9), apresentando um pico na curva de dissociação. O aparecimento de um único pico na curva de “Melting” sugere a existência de um único produto (NASCIMENTO et al., 2011).

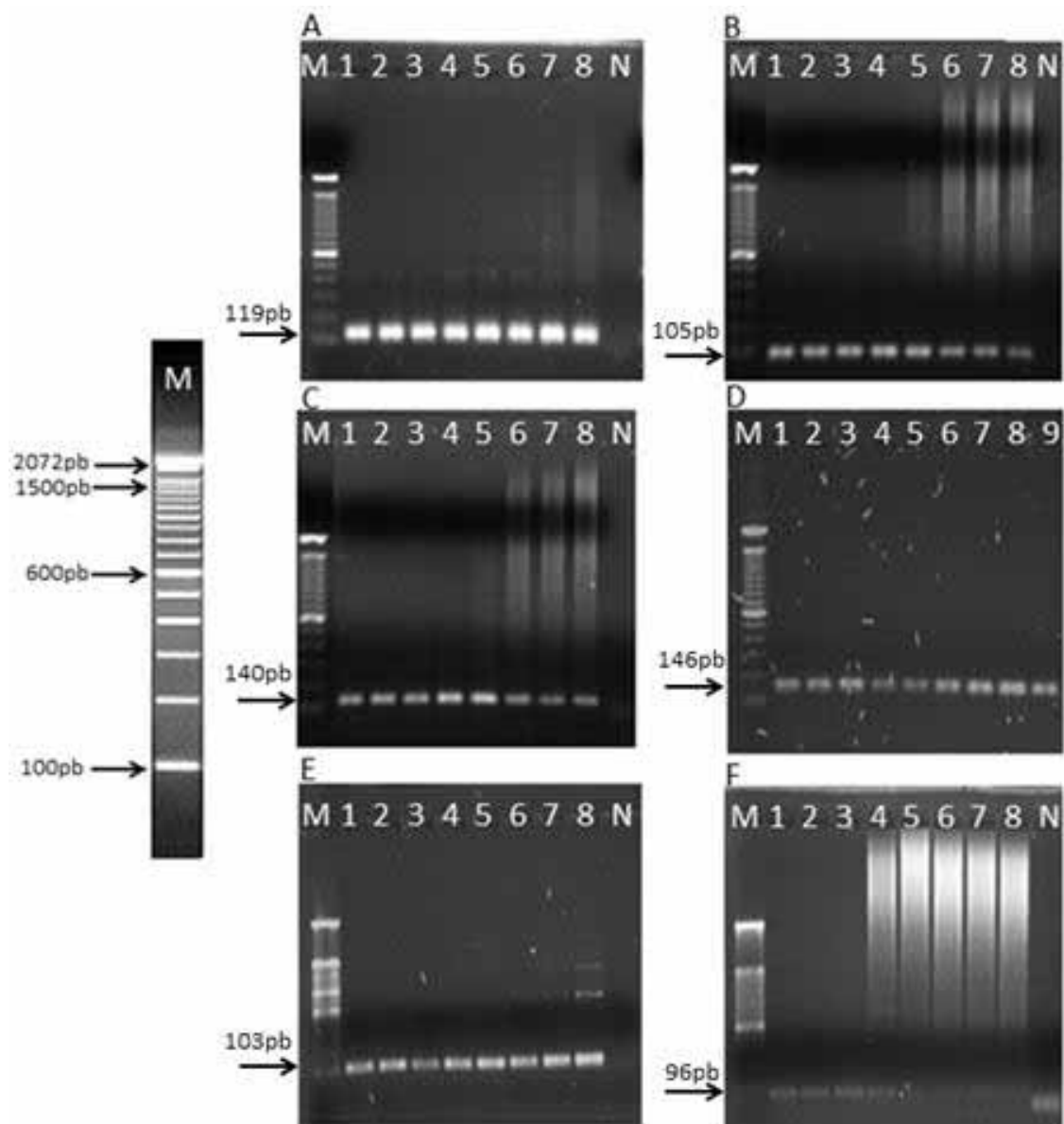


Figura 8: Gel de agarose 1%, contendo o produto amplificado por PCR dos genes *UCP2* (8A), *RGS2* (8B), *FADS2* (8C), *YWHAZ* (8D), *SLC2A5* (8E) e *PPP1R26* (8F) para verificar o tamanho e a especificidade do produto amplificado. Nas figuras 8A, B, C e F estão presente o produto amplificado de 8 amostras, mais o controle negativo (N) para *UCP2*, *RGS2*, *FADS2* e *PPP1R26*, para o gene *PPP1R26* (8F) o N apresenta um produto de amplificação de oligonucleotídeos (dímero). Em 8D, 9 produtos de amplificação do gene *YWHAZ*, com tamanho de 146pb. Em 8E, produtos de PCR em gradiente para o gene *SLC2A5*, mais controle negativo, sendo as seguintes temperaturas para cada produto: 60°C (1), 59,4°C (2), 58,4°C (3), 56,9°C (4), 55,1°C (5), 53,5°C (6), 52,5°C (7) e 52°C (8). *M: marcador molecular de 100 pb (DNA Ladder – Life Technologies).

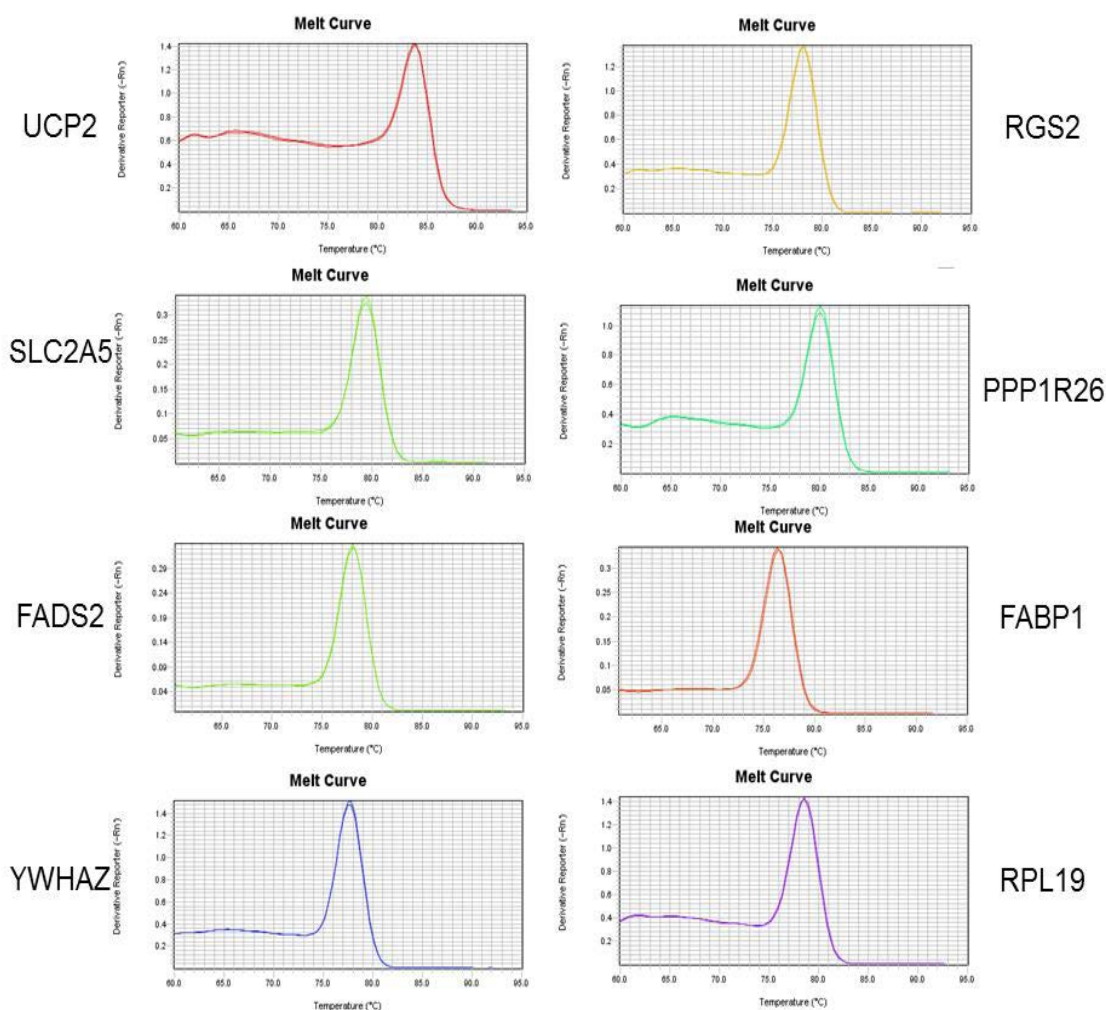


Figura 9: Verificação da especificidade de amplificação do fragmento de interesse com a observação da curva de melting para os genes em estudo.

A verificação de conteúdo contaminante e presença de dímeros de oligonucleotídeos na curva de “Melting” só é possível devido à dissociação da molécula (Figura 10). Produtos maiores necessitam de maior energia, ou seja, maior temperatura para se dissociar, no entanto fragmentos menores requerem menos energia (NASCIMENTO et al., 2011). Por isso, temperaturas de “Melting” (TM) são menores para fragmentos pequenos como os dímeros (Figura 7B).

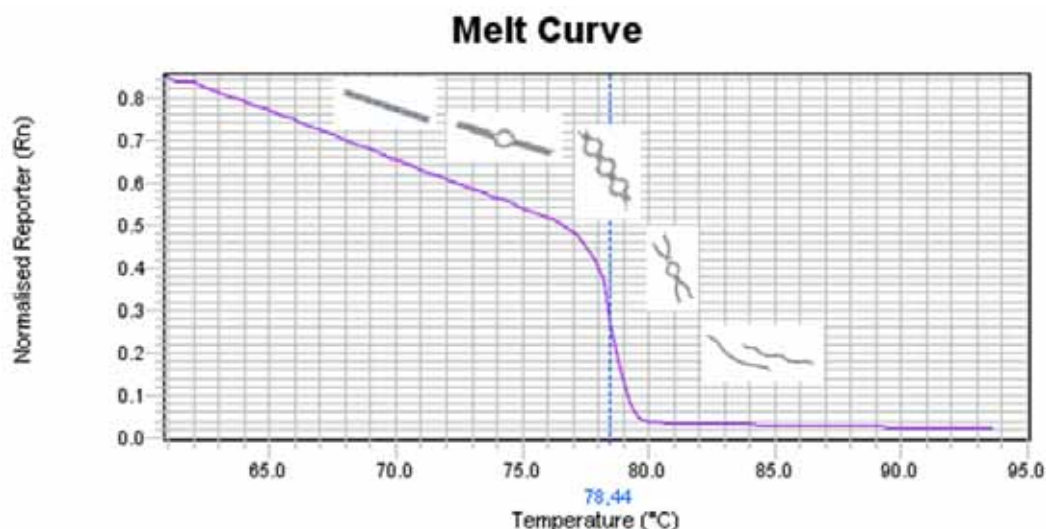


Figura 10: Mecanismo de dissociação da molécula. TM (78,44°C) de uma amostra aleatória do gene *RGS2*.

Dentre as amostras analisadas os Cqs gerados pelo programa (LinRegPCR) variaram de: 22,347 – 24,995 (*RGS2*); 0 – 35,701 (*SLC2A5*); 21,115 – 24,277 (*UCP2*); 17,016 – 20,399 (*FABP1*); 22,520 – 30,955 (*FADS2*); 27,402 - 35,105 (*PPP1R26*) para os genes alvos, e de: 17,692 – 21,154 (*RPL19*) e 21,943 - 24,698 (*YWHAZ*) para os genes referência (Tabela 6). Entre os genes estudados, o *FABP1* apresentou a maior expressão (menores valores de Cqs) e o *PPP1R26* a menor expressão (maiores valores de Cq). O *SLC2A5* apresentou a maior variação entre os Cqs em virtude de apresentar amostras com expressões altas enquanto outras não apresentaram nenhuma expressão.

Tabela 6: Cqs máximos (máx) e mínimos (mín) gerados pelo programa LinRegPCR.

Gene	Cq (máx – mín)
<i>RGS2</i>	22,347 – 24,995
<i>SLC2A5</i>	0 – 35,701
<i>UCP2</i>	21,115 – 24,277
<i>FABP1</i>	17,016 – 20,399
<i>FADS2</i>	22,520 – 30,955
<i>PPP1R26</i>	27,402 - 35,105
<i>RPL19</i>	17,692 – 21,154
<i>YWHAZ</i>	21,943 - 24,698

Na análise de eficiência dos oligonucleotídeos pelo programa LinRegPCR as eficiências individuais de cada amostra foram calculadas usando no mínimo três pontos da curva de amplificação na fase exponencial (RUIJTER et al., 2009) (Figura 11). A eficiência relatada pelo programa, para as amostras dos genes alvos, variou de: 1,755 - 1,966 (*RGS2*); 1,0 - 1,962 (*SLC2A5*); 1,470 - 1,96 (*UCP2*); 1,812 - 1,963 (*FABP1*); 1,754 - 2,011 (*FADS2*); 1,691 - 2,115 (*PPP1R26*) e para os genes referência, de: 1,748 - 1,971 (*RPL19*) e 1,728 - 2,042 (*YWHAZ*) (Tabela 7). Para todos os genes a eficiência foi corrigida para 2, assumindo a mesma eficiência para todas as reações.

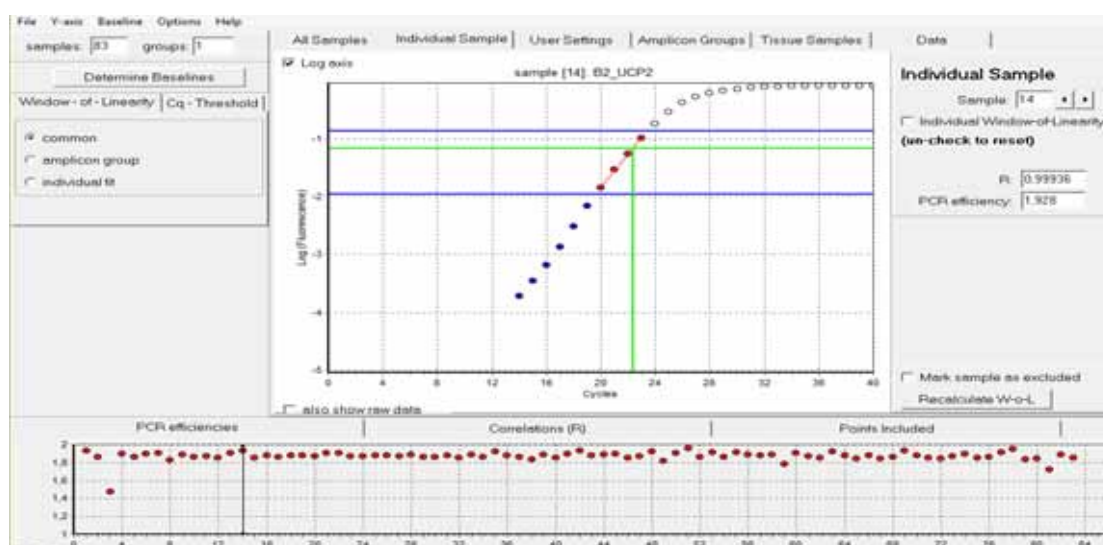


Figura 11: Seleção dos pontos na curva de amplificação, na fase exponencial, pelo programa LinRegPCR.

Tabela 7: Eficiência de amplificação máxima (máx) e mínima (mín) gerada pelo programa LinRegPCR.

Gene	Eficiência (máx – mín)
<i>RGS2</i>	1,755 - 1,966
<i>SLC2A5</i>	1,0 - 1,962
<i>UCP2</i>	1,470 - 1,96
<i>FABP1</i>	1,812 - 1,963
<i>FADS2</i>	1,754 - 2,011
<i>PPP1R26</i>	1,691 - 2,115
<i>RPL19</i>	1,748 - 1,971
<i>YWHAZ</i>	1,728 - 2,042

A curva formada durante a amplificação da reação de qPCR é exponencial em sua fase inicial, o processo desta curva é determinado pela eficiência de amplificação (E) (RIEU; POWERS, 2009). A eficiência de amplificação pode ser definida como o aumento do número de cópias do produto por ciclo (RUIJTER et al., 2009). A eficiência pode variar consideravelmente entre os pares de oligonucleotídeos e entre placas, por isso é mais preciso estimar a E para cada par oligonucleotídeos por meio da análise de uma curva de diluição ou por meio da análise das curvas de amplificação de todas as reações (RAMAKERS et al., 2003; RUIJTER et al., 2009).

Os resultados mais precisos foram obtidos assumindo a mesma E para todas as reações (COOK et al., 2004), pois as diferentes amostras geram diferentes cinéticas de fluorescência, diferindo no grau de inclinação da curva de amplificação o que causa um impacto sobre a precisão do resultado da expressão calculada (Bustin, 2004). Ainda, segundo Bustin (2004) uma correção para a eficiência, usando modelos matemáticos adequados é altamente recomendável para tornar os resultados mais confiáveis.

4. Análise de associação

Foram encontradas associações dos genes alvos com as características de eficiência alimentar. Os níveis de expressão do gene *FABP1* foram associados com as medidas de CAR ($P \leq 0,0347$) e CMS ($P \leq 0,0221$). Outras associações observadas foram do gene *SLC2A5* e as medidas de IK ($P \leq 0,0282$) e TRC ($P \leq 0,0327$). Não houve associação dos genes *FADS2*, *RGS2*, *PPP1R26* e *UCP2* com as medidas em estudo (Tabela 8).

Tabela 8: Valores de efeito estimado e P valor da análise de associação. *Valores com P valor significativo ($P \leq 0,05$).

Características	Gene	Efeito estimado	$\pm$ EP	P valor
CAR	<i>RGS2</i>	0,09699	0,09514	0,3117
	<i>SLC2A5</i>	0,001473	0,006028	0,8078
	<i>UCP2</i>	-0,01232	0,06309	0,8458
	<i>FABP1</i>	-0,2471	0,1146	*0,0347
	<i>FADS2</i>	0,02909	0,04856	0,5512
	<i>PPP1R26</i>	0,02051	0,05328	0,7015
PM	<i>RGS2</i>	-16,438	47,441	0,7300
	<i>SLC2A5</i>	0,08352	0,3048	0,7849
	<i>UCP2</i>	23,049	32,159	0,4759
	<i>FABP1</i>	-35,760	57,730	0,5376
	<i>FADS2</i>	-0,9858	24,655	0,6905
	<i>PPP1R26</i>	45,295	26,733	0,0945
PMM	<i>RGS2</i>	-0,2704	0,8265	0,7445
	<i>SLC2A5</i>	0,01462	0,05310	0,7839
	<i>UCP2</i>	0,3981	0,5602	0,4796
	<i>FABP1</i>	-0,6275	10,057	0,5346
	<i>FADS2</i>	-0,1799	0,4295	0,6765
	<i>PPP1R26</i>	0,7902	0,4657	0,0941
GPDreg	<i>RGS2</i>	-0,02203	0,03856	0,5695
	<i>SLC2A5</i>	-0,00446	0,002478	0,0761
	<i>UCP2</i>	0,04469	0,02614	0,0917
	<i>FABP1</i>	0,004610	0,04693	0,9220
	<i>FADS2</i>	0,005056	0,02004	0,8016
	<i>PPP1R26</i>	0,002327	0,02173	0,9150
CMS	<i>RGS2</i>	0,1132	0,1406	0,4233
	<i>SLC2A5</i>	-0,00132	0,009031	0,8846
	<i>UCP2</i>	0,07979	0,09528	0,4051
	<i>FABP1</i>	-0,4001	0,1710	*0,0221
	<i>FADS2</i>	0,01109	0,07305	0,8797
	<i>PPP1R26</i>	0,09995	0,07921	0,2110

Tabela 8: Continuação.

Características	Gene	Efeito estimado	± EP	P valor
CMSpv	<i>RGS2</i>	0,03700	0,03581	0,3049
	<i>SLC2A5</i>	-0,00095	0,002300	0,6795
	<i>UCP2</i>	0,005550	0,02427	0,8198
	<i>FABP1</i>	-0,08531	0,04357	0,0541
	<i>FADS2</i>	0,01275	0,01861	0,4955
	<i>PPP1R26</i>	-0,00578	0,02018	0,7752
CA	<i>RGS2</i>	0,1133	0,1226	0,3585
	<i>SLC2A5</i>	0,01346	0,007874	0,0917
	<i>UCP2</i>	-0,1034	0,08308	0,2173
	<i>FABP1</i>	-0,1855	0,1491	0,2177
	<i>FADS2</i>	-0,01195	0,06370	0,8517
	<i>PPP1R26</i>	0,05686	0,06907	0,4130
EA	<i>RGS2</i>	-0,00432	0,004219	0,3090
	<i>SLC2A5</i>	-0,00040	0,000271	0,1490
	<i>UCP2</i>	0,003182	0,002860	0,2695
	<i>FABP1</i>	0,007766	0,005134	0,1347
	<i>FADS2</i>	0,000502	0,002193	0,8195
	<i>PPP1R26</i>	-0,00172	0,002377	0,4709
IK	<i>RGS2</i>	-0,00016	0,000400	0,6951
	<i>SLC2A5</i>	-0,00006	0,000026	*0,0282
	<i>UCP2</i>	0,000459	0,000271	0,0952
	<i>FABP1</i>	0,000114	0,000487	0,8163
	<i>FADS2</i>	0,000130	0,000208	0,5329
	<i>PPP1R26</i>	-0,00018	0,000226	0,4252
TRC	<i>RGS2</i>	-0,00115	0,004109	0,7801
	<i>SLC2A5</i>	-0,00057	0,000264	*0,0327
	<i>UCP2</i>	0,003041	0,002785	0,2786
	<i>FABP1</i>	0,001992	0,005000	0,6914
	<i>FADS2</i>	0,001141	0,002135	0,5949
	<i>PPP1R26</i>	-0,00153	0,002315	0,5115

Segundo a análise de associação a cada unidade de expressão aumentada do gene *FABP1* há um decréscimo no valor de CAR ($-0,2471 \pm 0,1146$) e CMS ($-0,4001 \pm 0,1710$), o mesmo ocorreu com o gene *SLC2A5* para as medidas do IK ($-0,00006 \pm 0,000026$) e da TRC ($-0,00057 \pm 0,000264$) (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de efeito estimado e P valor das associações encontradas.

Características	Gene	Efeito estimado	± EP	P valor
CAR	<i>FABP1</i>	-0,2471	0,1146	*0,0347
CMS	<i>FABP1</i>	-0,4001	0,1710	*0,0221
IK	<i>SLC2A5</i>	-0,00006	0,000026	*0,0282
TRC	<i>SLC2A5</i>	-0,00057	0,000264	*0,0327

Com o aumento da expressão de *FABP1* há uma diminuição de CAR e CMS. Outros trabalhos corroboram com esse resultado, demonstrando que CAR tem uma correlação positiva com a ingestão de matéria seca, a qual varia de 0,44 a 0,72 (ARTHUR et al., 2001a; HOQUE et al., 2006; NKRUMAH et al. 2007; CASTRO BULLE et al., 2007; KELLY et al., 2010).

A relação entre níveis de expressão do gene *FABP1* e balanço energético já foi descrita em gado de leite. McCarthy *et al* (2010) submeteram dois grupos de vacas holandesas a um leve Balanço Energético Negativo (BEN) e outro a um severo (BEN) e observaram o efeito sobre a expressão gênica em vacas leiteiras de alta produção. Os resultados obtidos no estudo citado tanto nas análises por microarranjo quanto por PCR quantitativo em tempo real, demonstraram, entre outros genes, que o *FABP1* teve sua expressão diminuída em vacas com BEN severo.

Na fase de BEN o principal desafio enfrentado pelas vacas é o aumento expressivo na demanda de nutrientes para produção de leite associado ao baixo consumo de matéria seca (CMS) (DRACKLEY et al., 2001). Devido a esse motivo, McCarthy et al. (2010) acreditam que a diminuição da expressão encontrada para o gene *FABP1* ocorreu para que os AGCL (ácidos graxos de cadeia longa) fossem redirecionados para serem armazenados no tecido adiposo e induzir ao ganho de peso, uma vez que esse gene está envolvido na biossíntese e remoção de AGCL (ATSHAVES et al., 2004; LISOWSKI et al., 2014). Do ponto de vista fisiológico o ganho de peso resulta em um balanço energético positivo, no qual a energia em excesso é armazenada em forma de gordura no tecido adiposo (GUILLOU et al. 2008).

O nocaute deste gene em camundongos submetidos a jejum de 48 horas mostrou que os níveis de oxidação de ácidos graxos eram muito menores do

que nos animais controle (Newberry et al., 2003). Os ácidos graxos produzidos na mobilização de reservas de gordura são convertidos no fígado em acetoacetato e depois em BHB (beta-hidroxibutirato), o qual pode ser utilizado como fonte de energia (González, 2000). Os ácidos graxos livres (AGL) são as moléculas mais significativas para estimar o status energético em gado de corte, respondendo a mudanças no consumo de alimento, ou seja, quanto mais ácidos graxos livres no plasma menor é o consumo (Russel, 1983).

A partir dos nossos resultados, podemos inferir que a expressão aumentada do gene *FABP1* ocasiona maior ocorrência de oxidação nos ácidos graxos, tornando-os livre no plasma sanguíneo, limitando a ingestão de matéria seca, desta forma, o *FABP1* pode potencialmente ser um limitante para o CMS nos bovinos em estudo.

Para o Índice de Kleiber valores altos são mais favoráveis para a eficiência alimentar, indicando que maior é o crescimento corporal obtido sem aumento do custo da energia de manutenção (ARCHER et al., 1999). Da mesma forma é para taxa relativa de crescimento que mede a eficiência como o ganho de peso referente ao tamanho instantâneo do corpo. O gene *SLC2A5* mostrou que o aumento da sua expressão reduziu os valores de TRC e IK. Essas medidas (Taxa Relativa de Crescimento e Índice de Kleiber) apresentaram forte correlação com ganho de peso (Arthur et al. 2001), desta forma o gene *SLC2A5* contribui de forma negativa para a eficiência alimentar.

Todos os genes selecionados como alvos são diferencialmente expressos em estudos de RNAseq de animais extremos para CAR, na população alvo desse estudo (Tizioto, 2014) e apresentam funções ou relações biológicas compatíveis a fatores que podem influenciar a eficiência alimentar (proliferação celular, regulação do metabolismo do glicogênio, contração muscular, síntese de proteína, peso corporal, controle da termogênese, síntese de ATP, regulação da oxidação de ácidos graxos, codificação de enzimas para a biossíntese de ácido graxos), no entanto, os genes *PPP1R26*; *RGS2*; *UCP2* e *FADS2* não apresentaram associação com nenhum fenótipo de eficiência alimentar na população estudada.

CONCLUSÃO

Entre os genes candidatos a referência, o YWHAZ e RPL19, tiveram a menor variação de expressão para estudo do tecido do fígado de animais Nelore.

Os resultados de análise de associação da expressão dos genes (SLC2A5, UCP2, FADS2, FABP1, RGS2 e PPP1R26) com as medidas de eficiência alimentar permitiram concluir que o aumento da expressão do gene FABP1 diminui os valores de CAR e CMS, contribuindo para melhor eficiência alimentar. No entanto, o aumento de expressão do gene SLC2A5 foi também associado à diminuição das medidas de IK e TRC contribuindo de forma negativa para a eficiência alimentar nos animais em estudo.

Desta forma, os resultados encontrados contribuem para a compreensão do mecanismo biológico envolvido na variação da eficiência alimentar, além disso, os genes FABP1 e SLC2A5 são potenciais candidatos a serem usados nos programas de melhoramento da eficiência alimentar em bovinos.

REFERÊNCIAS

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes) Disponível em: <http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1232#.VMTYqP7F-VQ> Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

ABIEC (Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes) Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp. Acesso em: 15 de Novembro de 2014.

AMERICAN PSYCHOLOGICAL ASSOCIATION (APA) Biologia molecular. (Nd The American Heritage® Science Dictionary. Disponível em: <http://dictionary.reference.com/browse/molecular> Acesso em: 10 de janeiro de 2015

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL (ACNB) Disponível em: <http://www.nelore.org.br>. Acesso em: 14 de novembro de 2014.

ALMEIDA, R.; **Consumo e eficiência alimentar de bovinos em crescimento**. 2005. 182 F. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2005.

ALMEIDA, R.; LANNA, D.P.D.; LEME, P.R. Consumo alimentar residual: Um novo parâmetro para avaliar a eficiência alimentar em bovinos de corte. In: **Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Campo Grande, 41, 2004, Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.

ARCHER, J.A.; RICHARDSON, E.C.; HERD, R.M.; ARTHUR, P. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: a review. **Australian Journal of Agricultural Science** , Collingwood, v. 50, p. 147-161, 1999.

ARTHUR, P.F.; ARCHER, J.A.; HERD, R.M. Feed intake and efficiency in beef cattle: overview of recent Australian research and challenges for the future. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 44, p. 361-369, 2004.

ARTHUR, P.F.; ARCHER, J.A.; HERD, R.M.; MELVILLE, G.J. Response to selection for net feed intake in beef cattle. In: ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, **Queenstown**. Proceedings, v. 14, p. 135-138, 2001a.

ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; JOHNSTON, D. J.; HERD, R. M.; RICHARDSON, E. C.; PARNELL, P. F. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2805-2811, 2001.

ARTHUR, P.F.; HERD, R.M. Efficiency of feed utilization by livestock: implications and benefits of genetic improvement. **Canadian Journal of Animal Science** , Ottawa , v. 85, p. 281–290, 2005.

ARTHUR, P.F.; HERD, R.M. Genetic Improvement of Feed Efficiency. In: HILL, R.A. (Ed.) Feed Efficiency in the Beef Industry. **Oxford: Wiley-Blackwell**, p.93-103, 2012.

ARTHUR, J.P.F.; HERD, R.M. Residual feed intake in beef cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 269-279, 2008.

ATSHAVES, B. P.; STOREY, S.; HUANG, H.; Schroeder F. Fatty acid expression hepatica binding protein enhances the metabolism of branched-chain fatty acid. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 259, p. 115-129, 2004

ATSHAVES,B.P.; MARTIN,G.G.; HOSTETLER,H.A.; MCINTOSH, A.L.; KIER, A.B.; SCHROEDER, F. Liver Fatty Acid Binding Protein and Obesity **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 1015–1032, 2010.

BARONE, S.; FUSSELL, S.L.; SINGH, A.K.; LUCAS, F.; XU,J.; KIM, C.; WU, X.; YU, Y.; AMLAL, H.; SEIDLER, U.; ZUO, J.; SOLEIMANI, M. Slc2a5 (Glut5) Is Essential for the Absorption of Fructose in the Intestine and Generation of Fructose-induced Hypertension. **Journal of Biological Chemistry**. v. 284, p. 5056–5066, 2009.

BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; AALHUS, J.L.; OKINE, E.K.; SNELLING, W.M.; LYLE, K.L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 189-204, 2003.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J. Applied animal reproduction. Reston: **Reston Publishing**, p. 337, 1980.

BERRY, D.P.; CROWLEY, J.J. Residual intake and gain; a new measure of efficiency in growing cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 90, p. 109-115, 2012

BRITO, A. História da Raça: Nelore – **Rural Centro** Disponível em: <http://ruralcentro.uol.com.br/noticias/historia-da-raca-nelore-56385#y=0> Data de publicação: 03/05/2012.

BUSTIN, A.S. AZ of Quantitative PCR. **Line International University (IUL)**, La Jolla, CA, EUA, 2004.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 4, 2009.

CARR, A.N.; SCHMIDT, A. G. G.; SUZUKI, Y.; MONTE, F.; SATO, Y.; LANNER, C.; BREEDEN, K.; JING, S. L.; ALLEN, P. B.; GREENGARD, P.; YATANI, A.; HOIT, B. D.; GRUPP, I. L.; HAJJAR, R. J.; DEPAOLI-ROACH, A.

A.; KRANIAS, E. G. Type 1 Phosphatase, a Negative Regulator of Cardiac Function. **Molecular and Cellular Biology**. v. 22, p. 4124–4135, 2002.

CEZAR, I. M.; QUEIROZ, H. P.; THIAGO, L. R. L. S.; CASSALES, F. L. G.; COSTA, F. P. Sistemas de Produção de Gado de Corte no Brasil: Uma Descrição com Ênfase no Regime Alimentar e no Abate, **Embrapa Gado de Corte** (Campo Grande, MS), 2005.

CHEN, Y.; GONDRO, C.; QUINN, K.; HERD, R. M.; PARNELL, P. F.; VANSELOW, B. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. **Animal Genetics**, v. 42, p. 475-490, 2011.

CHEPELEV, I. G.; WEI, Q.; TANG, K. Detection of single nucleotide variations in expressed exons of the human genome using RNA-Seq. **Nucleic Acids Research**, v. 37, 2009.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; DELAVAUD, C.; BOCTUIER, F. Plasma leptin in underfed or overfed adult Holstein and Charolais cows, and its relationship with adipose tissue cellularity. **International Journal of Obesity**, v. 22, p. 171, 1998.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**. V.162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CARSTENS, G. E.; KERLEY, M. S. Biological basis for variation in energetic efficiency of beef cattle. **Proceedings of the Beef Improvement Federation 41st Annual Research Symposium**. 2009, Sacramento, California, USA, 2009.

CASTRO BULLE, F. C. P. Growth, carcass quality and protein and energy metabolism in beef cattle with different growth potentials and residual feed intakes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.85, p.928-936, 2007.

COOK, P.; FU, C.; HICKEY, M.; HAN, S.; MILLER, K. SAS programs for real-time RT-PCR having multiple independent samples. **Bioinformatics**, v. 37, p. 990–995, 2004.

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, 2005.

DIETRICH, B.; NEUENSCHWANDER, S.; BUCHER, B. ; WENK, C. Fusarium mycotoxin-contaminated wheat containing deoxynivalenol alters the gene expression in the liver and the jejunum of broilers. **Animal**, v. 6, p. 278-91, 2012.

DRACKLEY, J. K.; OVERTON, T. R.; NEIL DOUGLAS, G. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.100- 110, 2001.

DU, L.; HEANEY, A. P. Regulation of Adipose Differentiation by Fructose and GluT5. **Molecular Endocrinology**, v. 26, p. 1773–1782, 2012.

FERREL, C. L. Energy Metabolism. In: CHURCH, D. C. ed. The ruminant animal. Digestive physiology and nutrition. **Englewood Cliffs**: Waveland Press Inc., p. 283-303, 1988.

GEARY, T. W. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1-8, 2003.

GOMES, R. C.; BALLOU, M. A.; SIQUEIRA, R. F. Blood cell profiles and plasma concentrations of glucose and cortisol of Nellore steers and bulls selected for low and high residual feed intake before and following a mild stressor In: 2008 **Adsa-asas jint meeting**, 2008, Indianapolis. Anais... Indianapolis, FASS, 2008.

GOMES, R. C.; SAINZ, R. D.; SILVA, S. L. Feedlot performance, feed efficiency reranking, carcass traits, body composition, energy requirements, meat quality and calpain system activity in Nellore steers with low and high residual feed intake. **Livestock Science**, v.150, p.265-273, 2012.

GUILLOU, H.; MARTIN, P.G.; PINEAU, T. Transcriptional regulation of hepatic fatty acid metabolism. **Subcellular Biochemistry**, v. 49, p. 3-47, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J. O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L. A. O. (Eds.) **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

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

HERD, R. M.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F. Reducing the cost of beef production through genetic improvement in residual feed intake: opportunity and challenges to application. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, p. 9-17, 2003.

HERD, R. M.; ODDY, V. W.; RICHARDSON, E. C. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle.1. Review of potential mechanisms. Australian **Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.423-430, 2004.

HOQUE, M. A.; ARTHUR, P. F.; HIRAMOTO, K.; OIKAWA, T. Genetic relationship between different measures of feed efficiency and its components

traits in Japanese Black (Wagyu) bulls. **Livestock Science**, v.99, p. 111-118, 2006.

HOTOVY, S. K.; JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E.; CARSTENS, G. E.; BOURDON, R. M.; SIEDEL, G. E. Variation among twin beef cattle in maintenance energy requirements. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 940-946, 1991.

HOUSEKNECHT, K. L.; BAILE, C. A.; MATTERI, R. L.; SPURLOCK, M. E. The biology of leptin: A review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1405–1420, 1998.

IBELLI, A. M. G. **Avaliação da resposta de bovinos nelore e cruzados, senepol x nelore e angus x nelore, infestados com carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*** Tese (Doutor em ciências), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012

JI, S. Q.; WILLIS, G. M.; SCOTT, R. R.; SPURLOCK, M. E. Partial cloning of the bovine leptin gene and its expression in adipose depots and in cattle before and after finishing. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 167, 1997.

KELLY, A. K.; MCGEE, M.; CREWS JR, D. H.; FAHEY, A. G.; WYLIE, A. R.; KENNY, D. A. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. **Journal Animal Science**, Champaign, v.88, p.109-123, 2010.

KLEIBER, M. Problems involved in breeding for efficiency of food utilization. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 1936, p. 247-258, 1936.

KNOTT, S. A.; LEURY, B. J.; DUNSHEA, F. R.; Cummins, L. J. Rams with poor feed efficiency are highly responsive to an exogenous adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 261-268, 2008.

KOCH, R. M.; SWIGER, L. A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K. E. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 22, p. 486–494, 1963.

LAWRENCE, T. L. J.; FOWLER, V. R. Growth of farm animals. **CAB International** 1997, 321p.

FREITAS, J. A.; QUEIROZ, A. C.; DUTRA, A. R.; DUTRA, A. R.; VIEIRA, R. A. M.; LANA, R. P.; LEONEL, F. P.; HENRIQUE, D. S.; LIMA, A. V.; SOUZA, J. C. Composição do ganho e exigências de energia e proteína para ganho de peso em bovinos Nelore puros e mestiços, em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.886-893, 2006.

INSTITUTO DE BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) - **Histórico**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 02 de julho de 2014.

INSTITUTO DE BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Mundial**. v. 39, Rio de Janeiro, 63p. 2011.

LANNA, D. P. D.; CALEGARE, L. R.; BERNDT, A. Conversão alimentar - Eficiência econômica de vacas de corte puras e cruzadas. In: **Simpósio de pecuária de corte**, 2003. Lavras: Universidade Federal de Lavras, p. 87-110. 2003.

LEME, P. R.; GOMES, R. C. Características de carcaça de novilhos Nelore com diferente consumo alimentar residual. In: XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). Cuzco, Perú. **Anais da XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal** (ALPA), 2007.

LIMA, F. P. Nelore: a força de uma raça. São Paulo: **Associação de criadores de Nelore do Brasil**, p.129, 1989.

LIMA, A. S.; SUCUPIRA, M. C. A.; ORTOLANI, E. L. Bovinos submetidos a dietas deficientes em energia por longo período: desempenho animal e sua relação com os teores de T3 e IGF-1. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 48, p. 19-26, 2011.

LISOWSKI, P.; KOŚCIUCZUK, E. M.; GOŚCIK, J.; PIERZCHAŁA, M.; ROWIŃSKA, B.; ZWIERZCHOWSKI, L. Hepatic transcriptome profiling identifies differences in expression of genes associated with changes in metabolism and postnatal growth between Hereford and Holstein-Friesian bulls. **Animal Genetics**, v. 45, p. 288-92, 2014.

MATSUMOTO, H. T.; NOGI, I.; TABUCHI, K.; OYAMA, H.; MANNEN, S.; SASAZAKI, S. 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.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO(a). Bovinos e Bubalinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 20 de abr. 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO(b). Exportação. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>. Acesso em: 20 de abril de 2013.

MCCARTHY, S. D.; WATERS, S. M.; KENNY, D. A.; DISKIN, M. G.; FITZPATRICK, R.; PATTON, J.; WATHES, D. C.; MORRIS, D. G. Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: **A global approach Physiol Genomics**, v. 42A, p. 188–199, 2010.

MERCADANTE, M. E. Z.; GRION, A. L. G Perspectivas de inclusão da eficiência alimentar em programas de melhoramento genético de bovinos de

corte X **Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal** Uberaba/ MG, Agosto de 2013.

MINTON, J. E.; BINDEL, D. J. J.; DROUILLARD, S.; TITGEMEYER, E. C.; GRIEGER, D. M.; HILL, C. M. Serum leptin is associated with carcass traits in finishing cattle. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 231, 1998.

MONTALDO, H. H.; MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 83-89, 1998.

MOORE, S. S; MUJIBI, F. D.; SHERMAN, E. L. Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. E41-E47, 2008.

NASCIMENTO, M. L. **Eficiência alimentar e suas associações com o lucro, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos Nelore** – Tese (Doutor em ciências) Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 67, Especial Oncologia, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrients requeriments of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: 1996

NEWBERRY, E. P.; XIE, Y.; KENNEDY, S.; HAN, X. L.; BUHMAN, K. K.; LUO, J. Y. The reduction of hepatic triglyceride and changed Accumulation of fatty acid absorption in mice with deletions of fatty liver protein gene of acid binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 664-51,672, 2003.

NKRUMAH, J. D.; BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; OKINE, E. K.; AMMOURA, A.; GUERCIO, S.; HANSEN, C.; LI, C.; BENKEL, B.; MURDOCH, B.; MOORE, S. S. Different measures of energetic efficiency and their phenotypic relationships with growth, feed intake, and ultrasound and carcass merit in hybrid cattle. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 2451-2459, 2004.

NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; WANG, Z.; MOORE, S. S. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.84, p. 145-153, 2006.

OLIVEIRA, P. S. N. **Identificação de regiões genômicas e genes candidatos posicionais e funcionais para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore**. Tese (Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. U.; BORGES, A. M. S. M. Nelore: base genética e evolução seletiva no Brasil . Planaltina: **Embrapa Cerrados**, p.54, 2002.

OLSVIK, P. A.; LIE, K. K.; JORDAL, A. E. O.; NILSEN, R. O., e HORDVIK, I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. **BMC Molecular Biology**, v. 6, p. 21, 2005.

OTA, A.; SAWAI, M.; SAKURAI, H. Stress-induced transcription of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) by heat shock transcription factor HSF1. **Biochimie**, v. 95, p. 1432-1436, 2013.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**, v.12, p. 87-98, 2011.

PALMER, M.; PREDIGER, E. Assessing RNA Quality. Life Technologies. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html> Acesso em: 24 de agosto de 2014.

PÉREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Molecular Biology**, London, v. 9, p. 79-84, 2008.

POLL, H.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E.; CARVALHO, C.; REETZ, E.R.; SILVEIRA,D.N. Pronto para ir além. **Anuário Brasileiro da pecuária 2013** Editora: Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul/RS, 2013.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.; LEKANNE-DEPREZ, R.; MOORMAN, A. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62–69, 2003.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTERWER, C.; NAKAGAWARA, K. (Ed). Rapid cycle real-time PCR: methods and applications. **Heidelberg**: Springer Press, p. 21-43. 2001.

RAUPP, F. M.; FUGANTI, E. N. Gerenciamento de custos na pecuária de corte: Um comparativo entre a engorda de bovinos em pastagem e em confinamento **SIMPOI**, 2014.

REVERTER, A.; BYRNE, K. A.; TAN, S. H.; HARPER, G. S.; LEHNERT, S. A. 506. Joint analysis of 507 multiple cDNA microarray studies via multivariate mixed models applied to genetic improvement of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3430-3439, 2004.

RIEU, I.; POWERS S. J. Real-Time Quantitative RT-PCR: Design, Calculations, and Statistics. **Plant Cell**. v. 21, p. 1031-1033, 2009.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency:

linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 45, 2009.

RUSSEL, A. J. F. The use of blood metabolites in the determination of energy status in beef cows. **Animal Production**, v. 37, p. 3335-343, 1983.

SANTIAGO, A. A. A raça nelore. In: Gado Nelore: 100 anos de seleção. São Paulo: Ed. dos Criadores, 594p, 1987.

SWANSON, K.; MILER, S. Factors regulating feed efficiency and nutrient utilization in beef cattle. In: France, J.; Kebreab, E. Mathematical Modelling Animal Nutrition. **CAB International**. Cambridge, p. 419-441, 2008.

RICHARDSON, E. C.; HERD, R. M. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle: 2. Synthesis of results following divergent selection. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.431-440, 2004.

RICHARDSON, E. C. R.; HERD, M.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.443- 454, 2004.

ROBINSON, D. L.; ODDY, V. H. Genetic parameters for feed efficiency, fatness, muscle area and feeding behaviour of feed lot finished beef cattle. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 90, p. 255-270, 2004.

SAS Institute Inc. SAS procedures guide. 8. ed. Cary, 2000.

SEAB – (Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento) Análise da Conjuntura Agropecuária Ano 2012/13 Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/corte_2012_13.pdf Acesso em : 14 de dezembro de 2013.

SATTERTHWAITE, F. E. Na Approximate distribution of estimates of variance components. **Biometrics Bulletin**, v. 2, p. 110-114, 1946.

TSUBOYAMA-KASAOA, N.; EZAKI, O. Mitochondrial uncoupling proteins 3 (UCP3) in skeletal muscle. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 570-574, 2001.

WALSH, B. Minireview: Quantitative genetics in the age of genomics. **Theoretical Population Biology**, v. 59, p. 175-184, 2000.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63, 2009.

WIECZOREK, D.; DELAURIERE, L.; SCHAGAT, T. Methods of RNA Quality assessment. Promega Corporation, 2012.

YANG, W. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, p. 2, 2013.