

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**PERFIL DE COEXPRESSÃO DE GENES DO MÚSCULO
Longissimus thoracis ASSOCIADOS A
DIFERENTES MÉTODOS DE DESMAMA DE BEZERROS DA RAÇA
NELORE**

Gustavo Henrique Russo

Biólogo

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**PERFIL DE COEXPRESSION DE GENES DO MÚSCULO
Longissimus thoracis ASSOCIADOS A
DIFERENTES MÉTODOS DE DESMAMA DE BEZERROS DA
RAÇA NELORE**

Discente: Gustavo Henrique Russo

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Luis Pereira

Coorientadora: Dr. Juliana Akamine Torrecilhas

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi

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

R969p

Russo, Gustavo Henrique

Perfil de coexpressão de genes do músculo Longissimus thoracis associados a diferentes métodos de desmama de bezerros da raça Nelore / Gustavo Henrique Russo.

-- Jaboticabal, 2023

37 p. : il., tabs., 2 v.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Guilherme Luis Pereira

Coorientadora: Juliana Akamine Torrecilhas

1. Genética animal. 2. Desmame. 3. Nelore (Bovino). 4. Regulação de expressão gênica. 5. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Em virtude da importância da pecuária de corte para a economia nacional, o presente trabalho tem impacto potencial esperado sobre a erradicação da fome e desenvolvimento da agricultura sustentável, criação de postos de trabalhos decentes e crescimento econômico, bem como indiretamente contribui com ações contra a mudança global do clima.

Potential impact of this research

Due to the importance of beef cattle farming for the national economy, this work has an expected potential impact on the eradication of hunger and the development of sustainable agriculture, the creation of decent jobs and economic growth, as well as indirectly contributing to actions against global climate change.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PERFIL DE COEXPRESSION DE GENES DO MÚSCULO *Longissimus thoracis* ASSOCIADOS A DIFERENTES MÉTODOS DE DESMAMA DE BEZERROS DA RAÇA NELORE

AUTOR: GUSTAVO HENRIQUE RUSSO

ORIENTADOR: GUILHERME LUIS PEREIRA

COORIENTADORA: JULIANA AKAMINE TORRECILHAS

COORIENTADOR: ROGERIO ABDALLAH CURI

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

Pós-doutoranda JULIANA AKAMINE TORRECILHAS (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente
JULIANA AKAMINE TORRECILHAS
Data: 21/11/2023 14:11:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente
LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO
Data: 14/11/2023 10:15:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente
MARCELO RICARDO VICARI
Data: 10/11/2023 14:08:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 03 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gustavo Henrique Russo nascido em São Carlos-SP, no dia 17 de fevereiro de 1997, filho de Alessandra Aparecida de Castilho Manhezi e Marcelo Luiz Russo. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em março de 2016, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- FCAV UNESP Jaboticabal, e obteve o título de bacharel em novembro de 2022. No período de novembro de 2016 a novembro de 2017 foi membro do centro acadêmico “Alfred Russel Wallace” do curso de Ciências Biológicas, foi membro da comissão organizadora da XVII e XVIII “Jornada Anual Biológica da UNESP-JABU” no período de novembro de 2017 a novembro de 2019 atuando nos cargos de Vice-Diretor Administrativo e Diretor Jurídico. Realizou iniciação científica na modalidade Bolsa-Pibic-CNPq no período de 01/09/2020 a 31/08/2021, sob a orientação do Professor Dr. Danisio Prado Munari e coorientação da Ma. Larissa Graciano Braga. Em agosto de 2021 ingressou no curso de mestrado do programa Ciência Animal da FCAV-Unesp-Jaboticabal sob a orientação do Professor Dr. Guilherme Luis Pereira e coorientação da Dra. Juliana Akamine Torrecilhas e Professor Dr. Rogério Abdallah Curi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Alessandra e Marcelo, por todo apoio, por toda educação, amor e carinho que recebi ao longo desses 26 anos de vida, sem os quais nada teria sido possível e que pavimentaram o caminho para que eu chegasse até aqui. Agradeço a todos os meus amigos e familiares pela amizade e companheirismo, e a minha namorada Vitória (Angel) por todo carinho, amor que estamos cultivando desde 2021, e por todo apoio que foi fundamental para que eu conseguisse superar todas as dificuldades e também pela edição final nos slides da defesa dessa dissertação que sempre elevam o nível das minhas apresentações.

Agradeço a Unesp Jaboticabal e a todos seus funcionários e corpo docente dos quais tive a oportunidade de conhecer e aprender valiosos conhecimentos teóricos e práticos que formaram o alicerce de minha formação ao longo desses sete anos que vivi nessa universidade.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Luis Pereira pela oportunidade de realizar esse mestrado, por toda a orientação, auxílio e compreensão.

Agradeço também a minha coorientadora Dr. Juliana Akamine Torrecilhas, por toda ajuda, apoio e orientação prestados, sem os quais não teria sido possível a conclusão desse trabalho.

Agradeço também a gestão executiva do Governo Federal do Presidente Luís Inácio Lula da Silva, que reajustaram os valores das bolsas de pós-graduação após 10 anos sem reajuste, no terceiro mês após ter assumido a presidência em março 2023.

Por último agradeço a mim mesmo, por ter superado todas as adversidades que me foram impostas durante o tempo que cursei esse mestrado e principalmente por ter conseguido lidar com todos os problemas que se impuseram principalmente na reta final de conclusão desse trabalho, porém mesmo durante um período de turbulências consegui manter o foco, a calma para lidar com tudo e ainda assim concluir essa dissertação nos prazos necessários.

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

SUMÁRIO	Página
LISTA DE FIGURAS	2
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Desmama Precoce em Bezerros de Corte	4
2.2 O metabolismo energético no período pós-natal.	8
2.3 Transcriptômica, RNA-Seq e Redes de Coexpressão Gênica.	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Animais e Tratamentos.	14
3.2 Coleta do Tecido Muscular.	16
3.3 Extração de RNA total, preparação das bibliotecas e sequenciamento de mRNA.	16
3.4 Controle de qualidade e mapeamento de sequências	17
3.5 Obtenção da matriz de contagem.	17
3.6 Geração de redes de coexpressão de genes	17
3.7 Análise de enriquecimento funcional	19
3.8 Análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA).	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	20
5 CONCLUSÃO	28
6 REFERÊNCIAS	28

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Expressão gênica diferencial ampla e alterações epigenéticas em bovinos da raça Nelore submetidos a diferentes protocolos de desmama e seus efeitos sobre a carcaça e qualidade de carne." **Protocolo CEUA 0190/2020**, a ser conduzido por Guilherme Luis Pereira, responsável/orientador, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	01/02/2021 a 01/09/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	BOVINA / BOS INDICUS /
Raça	Nelore
Nº de animais machos	40
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	300
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 7 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Rebanho Comercial destinado ao abate

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 16/12/2020



JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplificação do delineamento amostral realizado no experimento.	15
Figura 2. Enriquecimento funcional de vias metabólicas KEGG para os módulos M1(A), M2(B) e M3(C).....	22
Figura 3. Redes de interação gênica dos módulos M1(A) M2(B) e M3(C).....	23
Figura 4. Análise GSEA (<i>gene set enrichment analysis</i>).....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Suplementação e dietas baseadas em forragem natural, farelo de soja, milho, aditivos e minerais, oferecidos a bovinos nelore em diferentes fases de desenvolvimento e submetidos ao protocolo de desmama precoce.	15
--	----

PERFIL DE COEXPRESSION DE GENES DO MÚSCULO *Longissimus thoracis* ASSOCIADOS A

DIFERENTES MÉTODOS DE DESMAMA DE BEZERROS DA RAÇA NELORE

RESUMO- A desmama precoce é um manejo nutricional de bezerros a muito tempo utilizado na bovinocultura, como estratégia para diminuir o intervalo entre partos principalmente em vacas primíparas e aumentar as taxas de concepção do rebanho, principalmente por ajudar na recuperação do balanço energético das fêmeas, porém, suas aplicações vão além da melhora no desempenho reprodutivo, e tem sido utilizada na pecuária de corte para melhorar a qualidade de características de carcaça de bezerros em conjunto com uma dieta de concentrado pós o desmame. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de coexpressão do transcriptoma completo, utilizando a técnica RNA-Seq, a partir de alíquotas do músculo *Longissimus thoracis*, de dois grupos de bezerros da raça Nelore, desmamados aos 120 dias (desmama precoce) e outro desmamado aos 210 dias (desmama convencional). Foram encontrados 16 módulos de genes coexpressos, os módulos 1, 2 e 3 foram significativamente enriquecidos para vias metabólicas KEGG na análise de enriquecimento funcional. O módulo 2 retornou vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos e via de sinalização PPAR, uma das principais vias envolvidas no metabolismo de lipídeos, na adipogênese, lipogênese bem como na deposição de gordura intramuscular. Foram também destacados dentro do módulo 2 os genes *Hub: PLIN1, CIDEA, RBP4, PPP1R1B e MAL2*, os quais também são relacionados a lipogênese a adipogênese. Os resultados obtidos são um indicativo de que a desmama precoce seguida de dieta de concentrado em bezerros Nelore, pode regular positivamente a expressão de genes e vias metabólicas envolvidas, na hiperplasia e hipertrofia de adipócitos e, contudo, melhorar características de qualidade da carne e qualidade de carcaça.

Palavras-chave: Genética Animal, Desmame, Nelore (Bovino), Regulação de expressão gênica, Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala.

**COEXPRESSION PROFILE OF *Longissimus thoracis* MUSCLE GENES
ASSOCIATED WITH
DIFFERENT METHODS FOR WEANING NELLORE CALVES.**

ABSTRACT- Early weaning is a nutritional management of calves that has been used for a long time in cattle breeding, as a strategy to reduce the interval between calving, mainly in primiparous cows, and to increase herd conception rates mainly for helping in the recovery of the energy balance of the females, however, its applications go beyond to enhance reproductive performance, and has been used in beef cattle to improve the quality of carcass traits of calves in conjunction with a post-weaning concentrate diet. The aim of this work was to evaluate the co-expression profile of the complete transcriptome, using the RNA-Seq technique, from aliquots of the *Longissimus thoracis* muscle, from two groups of Nellore calves, weaned at 120 days (early weaning) and another weaned at 210 days (conventional weaning). Sixteen co-expressed gene modules were found, modules 1, 2 and 3 were significantly enriched for KEGG metabolic pathways in the functional enrichment analysis. Module 2 returned metabolic pathways related to carbohydrate metabolism and PPAR signalling pathway, one of the main pathways involved in lipid metabolism, adipogenesis, lipogenesis as well as intramuscular fat deposition. The Hub genes were also highlighted within module 2: *PLIN1*, *CIDEA*, *RBP4*, *PPP1R1B* and *MAL2*, which are also related to lipogenesis and adipogenesis. The results obtained indicate that early weaning followed by a concentrate diet in Nellore calves can positively regulate the expression of genes and metabolic pathways involved in adipocyte hyperplasia and hypertrophy and, however, improve meat quality traits and carcass quality.

Keywords: Animal genetics, High-throughput nucleotide sequencing, Nellore (Bovine), Regulation of gene expression, Weaning.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo responsável por 27,7% das exportações mundiais em 2022, o país bateu recorde em volume de carne bovina exportada no mesmo ano, chegando a 2,26 milhões de toneladas vendidas para mais de 150 países com um crescimento de 22,6%, isso contribuiu para o balanço positivo da balança comercial brasileira visto que a carne bovina representou 8,16% do total exportado pelo agronegócio em 2022 (ABIEC, 2023). No mesmo ano o abate de bovinos teve um crescimento de 5,28%, totalizando 42,31 milhões de cabeça, além disso foi registrado uma redução na idade de abate dos animais, evidenciada pela redução no percentual de bois terminados com mais de 36 meses no total de machos, passando de 11,3% em 2021 para 9,9%, vale ressaltar também que número de bovinos confinados cresceu, passando de 7,2 milhões para 7,62 milhões no último ano e os animais terminados em confinamento representaram 18 % do total de animais abatidos (ABIEC, 2023).

O gado zebuino (*Bos indicus*) originário da Índia foi originalmente introduzido em nosso país em 1875, hoje a subespécie representa cerca de 80% da genética do rebanho nacional (puros e cruzados) que atinge 210 milhões de cabeças. A ampla disseminação das raças zebuínas no país se explica pela adaptação ao ambiente tropical, tolerando altas temperaturas, pastagens de baixa qualidade e sua resistência a parasitas, portanto são fundamentais para a produção de carne e leite em países tropicais (Santana et al., 2016). Por outro lado, quando comparado ao gado taurino (*Bos taurus*) as raças zebuínas apresentam puberdade mais tardia, menores taxas reprodutivas, crescimento mais lento, desempenho reduzido na terminação em confinamento, menor qualidade de carcaças e carne menos macia (Turner, 1980; Júnior et al. 2022). Alguns estudos também demonstraram que em animais cruzados (taurinos x zebuínos) quanto maior a contribuição genética zebuína menor é a maciez da carne (Johnson et al. 1990; Ferguson et al., 2000).

Nelore é uma raça zebuína que chegou a Brasil também no século XIX e passou a ganhar maior notoriedade a partir da década de 60, sendo atualmente a raça mais utilizada na pecuária de corte nacional, somando aproximadamente 167 milhões de cabeças de animais puros ou cruzados (Bonin et al., 2021). Inicialmente o melhoramento dos rebanhos da raça no país se baseou em padrões raciais, e mais

tarde em características de desempenho e fertilidade e nos últimos anos muitos estudos no país tem focado na avaliação de características complexas como eficiência alimentar (Moraes et al., 2019; Bonamy et al., 2019; Brunet et al., 2021; Gomes et al., 2023; Valente et al., 2023), precocidade sexual (Irano et al., 2016; Mota et al., 2020; De Melo et al., 2020) e também em atributos de qualidade da carne como maciez, deposição de gordura intramuscular, subcutânea e perfis lipídicos (Novais et al., 2022; Londoño-Gil et al., 2022; Berton et al., 2022).

As ferramentas genômicas têm sido atualmente grandes aliadas nas pesquisas de melhoramento genético na bovinocultura em geral, através da seleção genômica por meio da genotipagem e predição de valores genéticos, utilizando painéis de alta densidade de marcadores (Hayes et al., 2009; Boichard et al., 2010; Berry et al., 2014) ou através do sequenciamento de genoma completo visando melhorar a acurácia de imputação de genótipos (Fernandes Júnior et al. 2021), muito comum também são os estudos de associação ampla do genoma (Magalhães et al., 2016; Carvalho et al., 2017) esses buscam detectar variantes em loci genômicos (normalmente SNP) associadas a características complexas como doenças em humanos ou fenótipos de interesse econômico em animais (Visscher et al., 2012). No entanto há carência de trabalhos que forneçam informações sobre como alterações nutricionais, ambientais e sanitárias podem afetar características de interesse por meio da interação fenótipo-ambiente.

Nesse contexto tem se popularizado nas últimas décadas a genômica funcional ou estudo de funções de genes aliadas com a ferramentas de sequenciamento de nucleotídeos de alto rendimento como o *Next Generation Sequencing* ou simplesmente NGS. Dentre as diversas possibilidades de uso dessa tecnologia está o RNA-Seq, essa técnica consiste basicamente em conciliar as tecnologias de sequenciamento de alto rendimento com a análise da expressão gênica a partir do sequenciamento de moléculas clones de DNA complementares (cDNA) às moléculas extraídas de RNA-mensageiro (Hrdlickova et al., 2017). Deste modo a técnica permite a quantificação absoluta de transcrições, portanto uma das suas aplicações é detectar o nível de expressão gênica de uma célula ou tecido sob diferentes condições biológicas ou entre diferentes tipos de células ou tecidos (Zhou et al., 2010; Cullum et al., 2011), além disso a técnica também permite a identificação de alterações pós-transcricionais das moléculas de RNA-mensageiro como por exemplo o *splicing*

alternativo (Feng et al., 2013). O perfil de expressão gênica permite a investigação de funções celulares e fisiologia celular afim de compreender o impacto de alterações ambientais, fatores de estresse ou sinais químicos na expressão gênica tudo isso em escala genômica ampla (Mutz et al., 2013).

Para melhor compreensão de um conjunto de dados de expressão a análise coexpressão ajuda a identificar módulos de genes coexpressos que são formados a partir de estimativas de correlação, desta forma pode se identificar genes que estão envolvidos em processos biológicos semelhantes ou que possivelmente sejam corregulados, bem como deduzir a forma como tais genes estão interagindo (Rau e Maugis-Rabusseau, 2018; Cheng et al., 2020). Consecutivamente à identificação dos módulos, realiza-se a análise de enriquecimento dos conjuntos afim de descobrir para quais vias (*pathways*) ou funções biológicas os grupos de genes estão enriquecidos (Cheng et al., 2020).

Dentre as estratégias de manejo nutricional de bezerros a desmama precoce é mencionada na literatura científica pelo menos desde a década de cinquenta (Percival et al., 1952). Essa forma de manejo já a muito tempo utilizada na bovinocultura apresenta resultados positivos bem relatados em raças taurinas como diminuição no intervalo entre parto principalmente entre fêmeas primíparas e aumentos na taxa de concepção do rebanho (Lusby et al., 1981). Outros estudos já demonstraram também que uma dieta à cocho, rica em grãos, para bezerros desmamados precocemente resulta em maior deposição de gordura, maiores pontuações de marmoreio, maior rendimento e qualidade da carcaça no abate (Myers et al., 1999; Sithyphone et al., 2011; Scheffler et al., 2014; Moriel et al., 2014). Segundo Scheffler et al. (2014) tais diferenças fenotípicas encontradas nesses animais se explica por uma modulação metabólica ou *imprinting* metabólico que acontece nesses animais em consequência da dieta introduzida após a desmama precoce. Genes envolvidos na diferenciação precoce de adipócitos e na lipogênese são apontados por ter um papel importante na explicação de tais fenótipos (Schoonmaker et al., 2003). Entretanto o conhecimento sobre os efeitos da desmama precoce sobre o metabolismo de bezerros é ainda limitado para raças taurinas e inexistente para zebuínos. Contudo quando animais são desmamados precocemente há a possibilidade de aproveitar o momento para o fornecimento de uma dieta de concentrado com maior aporte calórico e nutricional, isso pode gerar adaptações metabólicas que podem influenciar diretamente no

desenvolvimento do tecido muscular e adiposo, bem como alterar forma como os lipídeos se acumulam ao longo da vida do animal. Portanto compreender a interação entre diferentes estratégias de manejos nutricionais de bezerros na fase inicial da vida com possíveis adaptações metabólicas são essências para se compreender a influência de tais métodos sob características de interesse econômico para a pecuária de corte, como a qualidade da carne e rendimento de carcaça, de modo que se possa prospectar genes, processos biológicos ou vias metabólicas de papel chave na regulação de tais características.

Em virtude da falta de informações a respeito dos impactos da desmama precoce a nível molecular e metabólico em zebuínos, o objetivo desse trabalho foi identificar e comparar módulos de genes coexpressos entre bezerros da raça nelore submetidos a dois diferentes protocolos de desama (desmama convencional e desmama precoce) e bem como avaliar por meio da análise de enriquecimento funcional dos módulos, o impacto desses dois tipos de manejo sobre vias metabólicas do tecido muscular esquelético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desmama Precoce em Bezerros de Corte

A desmama precoce de bezerros de corte realizada entre 60-90 dias após o parto é uma prática que tem sido utilizada nos sistemas produtivos da bovinocultura de corte, para aumentar as taxas de natalidade no rebanho, ou seja, aumentar a eficiência reprodutiva das vacas, principalmente primíparas, com relativa facilidade de aplicação, somadas a boa aceitação do produtor e custo compatível (Pascoal et al., 1996 apud Pascoal et al.,2000).

O estudo de Lusby et al. (1981), demonstrou que novilhas com bezerros desmamados precocemente tiveram taxas de concepção de 96,8 % contra 59,4% das novilhas que tiveram seus bezerros desmamados em tempo convencional, durante a estação reprodutiva de 64 dias, também tiveram intervalo médio entre o último parto e a concepção reduzido de 90,5 dias para 73 dias pela desmama precoce, a atividade ovariana foi iniciada aos 85 dias após o parto em 90,3% das novilhas (desmama

precoce) contra 34,3% (desmama convencional) e além disso as novilhas de desmama precoce ganharam peso mais rápido durante o verão.

Outros estudos tem demonstrado os efeitos positivos da desmama precoce no aumento das taxas de concepção no período reprodutivo e diminuição do período de anestro pós-parto, em regiões subtropicais, no sul do Brasil (Pimentel et al., 1979) e Flórida (EUA) (Arthington e Kalmbancher, 2003).

Isso ocorre devido a priorização de uso de energia disponível pelo animal que atende a uma ordem hierárquica de prioridade nessa sequência: 1) Metabolismo Basal; 2) Atividade; 3) Crescimento; 4) Reservas de energia; 5) Gravidez; 6) Lactação; 7) Reserva de energia adicional; 8) Ciclos estrais e início da gravidez; 9) Reserva de excedentes de energia. Contudo é suposto que os nutrientes da dieta só são direcionados para uma nova reprodução após atendidas as demandas energéticas do metabolismo basal, atividade, crescimento (quando primíparas) reservas de energia e lactação (Short e Adams, 1988).

Contudo essa priorização para atender as demandas da produção de leite acaba por gerar o que é conhecido por balanço energético negativo. É sabido que as vacas no início da lactação não conseguem consumir quantidades suficientes para suprir suas necessidades energéticas de produção de leite e metabolismo basal, ao mesmo tempo que passa a mobilizar suas reservas corporais, isso culmina em perda de peso em consequência do balanço energético negativo. De maneira geral isso ocasiona o aumento de período de anestro pós-parto pois os níveis séricos de metabólitos como glicose, IGF-I, leptina entre outros, encontram-se reduzidos, e está correlacionado com a inibição dos pulsos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e das gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) que são os hormônios responsáveis por formação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos (Eustáquio-Filho et al., 2010).

Outro importante fator a ser levado em consideração é o efeito do reflexo da mamada, este por sua vez atua inibindo a liberação de GnRH e consequentemente FSH e LH, evidências apontam o envolvimento de opioides endógenos como a Met-Encefalina, Dinorfina e B-encefalina que agem na supressão da secreção de GnRH, contribuindo para o retardamento do ciclo estral e aumento do intervalo entre partos,

entretanto há indícios também da participação de glicocorticoides e prolactina nesse processo (Ferreira, 1992).

Entretanto os efeitos da desmama precoce não se limitam somente ao desempenho reprodutivo das vacas. Scheffler et al. (2014) em um estudo conduzido com animais da raça Angus, comparando um grupo de bezerros desmamados precocemente (105 dias) e que receberam uma dieta de alto concentrado os quais foram designados como “grupo de *imprinting* metabólico”, com um grupo de bezerros desmamados em tempo normal (253 dias) e posteriormente unidos numa mesma pastagem até o abate, encontrou resultados que foram desde de carcaças mais pesadas para o grupo desmamado precocemente bem como uma pontuação de marmoreio bem superior e conseqüentemente carcaças de qualidade superior. É relatado também que o fornecimento de uma dieta rica em altos níveis de amido a bovinos jovens pode alterar as redes gênicas associadas à diferenciação dos adipócitos e ao metabolismo energético (Grauward et al., 2009).

A programação metabólica é um termo usada para descrever tais alterações no fenótipo de animais decorrente de uma adaptação às modificações nutricionais durante o período gestacional e um curto período pós-natal, resultados com modelos animais indicam que a má programação nesse período tem sido a causa de distúrbios metabólicos e obesidade na fase adulta, podendo até mesmo essas alterações serem passadas para gerações seguintes (Patel e Srinivasan, 2011). A transmissão geracional dessas alterações metabólicas é explicada pelos mecanismos da epigenética, o termo foi inicialmente definido como “as interações causais entre os genes e seus produtos que dão origem ao fenótipo” (Waddington, 1942). Porém atualmente é definida como padrões hereditários de expressão gênica através da mitose (e eventualmente por meiose) que são mantidos de forma estável, porém sem que ocorra alterações na sequência de nucleotídeos do DNA (mutação), mais especificamente isso acontece devido a um conjunto de modificações, que vão desde alteração de histonas por acetilação, metilação, fosforilação, ribosilação de ADP e ubiquitinação levando à remodelação da cromatina, bem como metilação do DNA. Essas marcas epigenéticas acrescentam informações adicionais únicas ao código genético, isso acaba por alterar os perfis transcricionais de uma célula e compreende os elementos essenciais da memória celular hereditária (Hanley et al., 2010). Logo um programa de nutrição direcionada para um determinado propósito, como por exemplo

crescimento do tecido muscular, deposição de gordura intramuscular e desenvolvimento do trato reprodutivo, traria hipoteticamente resultados mais efetivos se aplicado nestes períodos críticos de desenvolvimento como nos pós-natal, melhorando a qualidade da carcaça de machos e antecipando a puberdade em novilhas.

Via de regra, raças taurinas e cruzadas (taurino x zebuino) têm recebido maior enfoque dos estudos realizados neste tema, nas últimas décadas alguns estudos foram realizados utilizando animais que possuem alguma genética zebuina como em raças sintéticas e cruzamentos (Vaz e Restle 2002; Almeida et al., 2003; Potter et al., 2003; Lobato et al., 2007; Vaz et al., 2011; Moriel et al., 2014; Tizioto et al., 2014; Tizioto et al., 2016; Diniz et al., 2018). Entretanto trabalhos sobre desmama precoce em zebuínos permanecem escassos na literatura internacional, somado a isso, resultados positivos ligados à desmama precoce observados em taurinos não são reproduzíveis em bovinos com alguma influência genética zebuina, o que, aparentemente, não permite a simples transposição informações entre taurinos e zebuínos a respeito dos impactos da desmama precoce sobre o crescimento e características de carcaça. Possivelmente tal fato pode ser explicado pelas diferenças metodológicas aplicadas em cada pesquisa (Lobato et al., 2007; Moriel et al., 2014) e a possíveis diferenças entre genes chaves e vias metabólicas relacionadas ao crescimento e deposição de gordura em zebuínos (Tizioto et al., 2014; Tizioto et al., 2016; Diniz et al., 2018).

No Brasil, pesquisas relacionando a desmama precoce a características de carcaça foram conduzidas em sua maioria nas décadas passadas, as quais grande parte foram realizados sob clima Cfa (subtropical úmido) utilizando animais cruzados (taurinos x zebuínos) (Vaz e Restle 2002; Almeida et al., 2003; Potter et al., 2003; Lobato et al., 2007, Vaz et al., 2011), com exceção de um estudo mais recente em que avaliaram a raça nelore e animais cruzados (angus x nelore) no pantanal (Oliveira et al., 2019). Entretanto, todos estes estudos têm em comum o fato da desmama precoce ser conduzida à pasto e com suplementação e, posteriormente, na recria, serem alocados à pasto sem suplementação (ou suplementação insuficiente). Deste modo, não há trabalhos que indiquem diferenças significativas em relação a características de carcaça dado o tipo de desmama, embora alguns trabalhos tenham destacado até a recria diferenças favoráveis no desempenho para animais desmamados

precocemente tantos cruzados como nelores puros (Lobato et al., 2007; Oliveira et al., 2019). Nesse sentido, Lobato et al. (2007) destacam em seu trabalho, que as metodologias aplicadas para o estudo deste tema são variadas e em muitas vezes a suplementação não seria adequada para causar mudanças significativas no desempenho, visto que a utilização de pastagens (algumas vezes nativas) no período da cria, seria incoerente com um possível desempenho superior de bezerros desmamados precocemente, isso, devido ao nível ainda inicial do desenvolvimento do rúmen.

No geral, se for considerado os resultados da literatura internacional (Myers et al., 1999; Schoonmaker et al., 2002; Schoonmaker et al., 2004; Meyer et al., 2005; Waterman et al., 2012; Scheffler et al., 2014), fica evidente que as pesquisas conduzidas no Brasil não utilizaram no período da desmama precoce, suplementação de concentrado que fosse capaz de alterar a expressão de genes ligados ao crescimento e a deposição de gordura, e conseqüente, causar possíveis melhorias no crescimento e na carcaça. É importante notar, que o foco principal de pesquisas conduzidas no território nacional, ao contrário das conduzidas no exterior, era de testar a hipótese de que animais desmamados precocemente não apresentariam desempenho e características de carcaça inferiores aos de animais desmamados convencionalmente. De maneira mais específica, portanto, não são encontrados artigos científicos que contemplem a desmama precoce em raças zebuínas puras, como a raça Nelore, em condições de climas mais quentes, suplementados com dietas de alto concentrado que, como hoje é conhecido, pode trazer efeitos significativos sobre o crescimento e a carcaça. Tal fato, torna a desmama precoce e a suplementação nessa fase na raça Nelore carente de informações fisiológicas básicas, sobretudo, considerando que resultados obtidos em taurinos não são reproduzíveis em zebuínos, o que sugere que possa haver diferenças metabólicas consideráveis ainda não acessadas entre subespécies originadas de ambientes tão distintos, como é o caso de zebuínos e taurinos.

2.2 O metabolismo energético no período pós-natal.

Bezerros que apresentam baixo peso ao nascer, ou seja, que apresentam diferenças significativas de crescimento fetal possivelmente decorrente de uma severa restrição nutricional materna desde o início da gestação, apresentam crescimento

mais lento durante toda a vida pós-natal e após desmame, ou seja a capacidade de bezerros com baixo peso ao nascer de exibir crescimento compensatório é limitada quando comparada com seus semelhantes de crescimento normal durante a gestação ou de mães bem nutridas e que passaram pelo mesmo regime de aleitamento (Greenwood e Café, 2007), entretanto os efeitos da dieta materna e desenvolvimento fetal não serão o foco desse tópico de revisão.

O período pós-natal é crítico para os bezerros, o colostro ingerido nos primeiros dias de vida é de suma importância para sobrevivência de neonatos, dentre seus principais efeitos estão no desenvolvimento do trato gastrointestinal e desenvolvimento do sistema imunológico através da imunidade passiva por imunoglobulinas (Blum, 2006), bem como a melhoria no estado energético dos neonatos alimentados com colostro refletem em uma maturação mais acelerada do eixo somatotrópico, que acaba por elevar a produção de IGF-1 no recém-nascido (Hammon et al., 2012). Durante o período de lactação os fatores principais que afetam o crescimento e a composição do bezerro são o desempenho materno na produção de leite, isso está diretamente relacionado à qualidade do pasto e/ ou a suplementação antes e depois do parto (Greenwood e Café, 2007).

Na fase fetal a produção endógena de glicose é baixa, porém o aumento de glicocorticoides na fase final da gestação afetam a maturação das vias metabólicas de síntese de glicogênio antes do parto e estimulam a via da gliconeogênese após o nascimento, visto que a principal fonte de energia no período pós-natal é proveniente da lactose e gordura, a atividade gliconeogênica promove uma disponibilidade adequada de glicose para o crescimento de neonatos (Hammon et al., 2012), uma vez que apenas a ingestão de lactose é insuficiente para atender a demanda de glicose no recém-nascido (Girard et al., 1992), além disso o leite contém uma quantidade considerável de ácidos-graxos de cadeia média, que são de suma importância para o fornecimento de energia em ruminantes pois são preferencialmente oxidados e fornecem ATP para a gliconeogênese (Girard et al., 1992; Oden e Treen, 2003) embora o motivo pelo qual os níveis de ATP são limitantes para a gliconeogênese em neonatos, permaneça incompreendido .

Conforme os bezerros vão crescendo se tornam cada vez mais dependentes de dietas sólidas o que desencadeia a produção de ácidos graxos voláteis que estimulam o desenvolvimento do rúmen (Warner e Flatt, 1965), até o desmame

quando passam a ser ruminantes completamente. Logo o propionato passa a ser o substrato prioritário na gliconeogênese em ruminantes (Donkin e Hammon, 2005).

2.3 Transcriptômica, RNA-Seq e Redes de Coexpressão Gênica.

Compreende-se como transcriptoma o conjunto completo de transcritos de RNA de uma célula e sua quantidade, para um estágio específico do desenvolvimento de um ser vivo ou sob determinada condição fisiológica. A transcriptômica é a ciência ômica que se ocupa de compreender o transcriptomas e o desenvolvimento de novas tecnologias para tal, seus principais objetivos têm sido: (i) catalogar todas as espécies de transcritos, incluindo mRNA, RNAs não codificantes e pequenos RNAs; (ii) determinar a estrutura transcricional dos genes, especificamente reconhecer seus sítios iniciais 5' e finais 3', padrões de *splicing* e outras modificações pós-transcricionais; (iii) quantificar as mudanças nos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento e sob diferentes condições (Wang et al., 2009).

As técnicas contemporâneas dominantes são os *microarrays* e o RNA-Seq, que foram desenvolvidas nas décadas de 1990 e anos 2000 (Nelson, 2001; Wang et al., 2009). A técnica de *microarrays* possui algumas limitações, principalmente, por haver apenas a hibridização de genes para que a placa fora projetada, sendo necessário o conhecimento de todo o genoma em que está sendo estudado, além de possuir dificuldades quanto a identificação de genes extremamente expressos ou pouco expressos, devido a saturação e alto *background*, respectivamente (Royce, Rozowsky e Gerstein, 2007; Zhao et al., 2014).

Por outro lado, a técnica de RNA-Seq, consiste no sequenciamento de transcritos de genes de interesse (*Targeted RNA-sequencing*) (Curion et al. 2020) ou até mesmo no sequenciamento do transcriptoma completo (*Whole-transcriptome shotgun sequencing*), esse tipo de abordagem se baseia no sequenciamento de cDNAs (DNAs complementares) de transcritos, obtidos pela reação da enzima transcriptase reversa e consecutivamente polimerização da dupla fita de DNA pela DNA-polimerase, e posteriormente sequenciamento das bibliotecas de cDNA em plataformas de alto rendimento (*high-throughput sequencing technologies*) e por fim a abundância mensurada a partir do número de contagens de cada transcrito (Lowe et

al., 2017). As sequências podem então ser alinhadas com genomas/transcritos referência ou até mesmo montadas *de novo*, em casos de espécies animais que ainda não possuem genoma conhecido completamente.

Dentre vantagens do RNA-Seq sobre as técnicas baseadas em hibridização (*microarrays*), se destacam: a não limitação a detectar transcritos que correspondem a sequências genômicas conhecidas, isso o torna muito útil para organismos não modelos que ainda não possuem genomas conhecidos (Wang et al., 2009). Além disso as leituras curtas oriundas de tecnologias de sequenciamento alto rendimento, permitem o entendimento e localização de transições existente entre éxons, é capaz também de detectar variações na sequência, tal como polimorfismos de base única (SNP) (Cloonan et al., 2008). Adicionalmente, o RNA-Seq apresenta baixo *background* e elevado limite de detecção, contrastando as limitações encontradas em técnicas baseadas em hibridização, permitindo a detecção de novos transcritos, *splicing* alternativos com maior sensibilidade e maior poder de quantificação, além de apresentarem menor custo que micro arranjos e análises por sequenciamento de Sanger em larga escala (Mortazavi et al., 2008; Royce, Rozowsky e Gerstein, 2007; Zhao et al., 2014).

Diante da grande quantidade de dados produzidos pelas tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, extrair significado biológicos dessas informações produzidas tem sido um desafio, uma das principais análises é a identificação de genes diferencialmente expressos (*up-* ou *down-regulated*) entre dados de amostra de condições diferentes. Entretanto é um desafio interpretar tais resultados quando se trata de genes com funções desconhecidas. A análise de coexpressão surge como uma alternativa para auxiliar nesse desafio. Esta abordagem utiliza os níveis expressão global de genes para agrupá-los em vários módulos baseado na correlação de expressão, geralmente *Pearson* ou *Spearman*, entre pares de genes, isso auxilia na compreensão de como os genes interagem uns com os outros e predizer suas possíveis funções, uma vez que genes com funções biológicas similares têm uma tendência apresentar forte correlação entre seus níveis de expressão. Pôr fim a construção de módulos é uma ferramenta robusta para investigar a função de genes (Cheng et al., 2020).

A partir dos módulos é possível plotar redes de coexpressão gênica, essas redes são gráficos não direcionados, onde os nós correspondem aos genes e as

arestas representam as relações significativas de coexpressão entre eles (Ruan et al., 2010). É amplamente utilizada também a abordagem de identificação de genes *hubs*, ou seja, aqueles genes que são altamente conectados dentro das redes, isso ajuda a identificar quais genes explicam melhor o comportamento do módulo, pois são geralmente mais relevantes para a funcionalidade das redes do que outros nós (Van Dam et al., 2018). Após identificar os módulos pesquisadores geralmente realizam análises funcionais e integrativas, como a *Over-representation analysis* (ORA), usada para prever se um conjunto de genes coexpressos é enriquecido por genes pertencentes a vias (*pathways*) ou funções conhecidas (Russo et al., 2018).

Diversos pacotes/ *softwares* estão disponíveis para pesquisadores realizarem análises de co-expressão, dentre eles um dos mais utilizados para tal finalidade é o WGCNA (*Weighted gene co-expression network analysis*), (Langfelder e Horvath, 2008) um pacote do Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) para o ambiente R (<https://www.r-project.org/>), o método utilizado por esse pacote descrito por Zhang e Horvath (2005) permite a construção de redes ponderadas de genes, as quais propiciam resultados biologicamente mais significativos que redes não-ponderadas a partir de módulos de genes altamente correlacionados e se baseia na premissa de que redes biológicas tendem a seguir o modelo *scale-free* (livre de escala). Isso significa dizer que se espera que a maioria dos genes de uma rede são esparsamente conectados enquanto uma minoria é altamente conectada, ou conhecida como pontos *hubs*, descritos acima.

Russo et al. (2008) desenvolveram um novo pacote para análises de co-expressão, o CEMiTool (*Co-Expression Modules Identification Tool*) um pacote do Bioconductor para R também, que permite que usuários identifiquem e analisem módulos de coexpressão totalmente automatizada, essa ferramenta também se baseia no método de redes ponderadas de genes com o WGCNA, porém diferente de seu antecessor o CEMiTool oferece um novo método de filtragem de genes não-supervisionado, seleção automática de parâmetros para identificação de módulos, além de um ambiente totalmente integrado para enriquecimento, análise funcionais, e enriquecimento de conjuntos de genes (GESEA) dos módulos encontrados (Russo et al., 2018). Além disso, pensando em colaborar com pesquisadores que não possuem conhecimento aprofundado em linguagens de programação Cardozo et al. (2019) lançaram o webCEMiTool, uma versão on-line da ferramenta que realiza as mesmas

análises que a sua versão para o R, mas de maneira totalmente automatizada e gerando relatórios html amigáveis e interativos. Cheng et al. (2020), comparou três pacotes de análise de coexpressão (WGCNA, CEMiTool e coseq), usando dados de publicados de RNA-Seq provenientes de estudos com pacientes com cardiomiopatia isquêmica e doença pulmonar obstrutiva crônica, concluíram ser mais vantajoso o CEMiTool comparado aos outros dois, por exigir menor recurso computacional e tempo despendido para análise (10 min) além de não requerer experiência em bioinformática do usuário.

Diversos trabalhos vêm sendo publicados na área da bovinocultura de corte utilizando a abordagem das redes de co-expressão. Estudos nas raças Hanwoo (Lim et al., 2013) e Nelore (Gonçalves et al., 2018; Silva-Vignato et al., 2019), que consideraram a deposição de gordura na carcaça, o marmoreio e características voltadas à qualidade de carne, identificaram módulos gênicos significativos que continham genes, por vezes, não identificados como diferencialmente expressos. Na raça Nelore, Diniz et al. (2019), a partir de dados de RNA-Seq oriundos do músculo *Longissimus thoracis*, encontraram módulos gênicos inseridos em vias relacionadas à sinalização AMPK, PPAR e glucagon/insulina. Dentre os módulos gênicos, foram pontuados genes como *EVOLV5* e *6*, *FASN*, *FABP4*, *ACACA* e *LIPE*, mas também genes, até então, não citados em análises de GDE como *PLIN1* (*perilipin 1*), *PDE3B* (*phosphodiesterase 3B*), *COL4A1* e *2* (*collagen type IV alpha 1 chain* e *alpha 2 chain*).

Silva-Vignato et al. (2019) ao avaliarem o perfil de coexpressão gênica para as características área de olho de lombo e cobertura de gordura subcutânea em bovinos Nelore, sinalizaram os genes *EIF2AK2* (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2*) e *HADHA* e *HADHB* (*hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha* e *beta*), além de genes já bem conhecidos como *ACSL1*, *ACAT1* e a família de genes *SLC*.

Análises de coexpressão também mostraram genes codificadores de miRNA em associação a mRNA para a formação de grupos gênicos relativos a vias metabólicas importantes na determinação do fenótipo (Gonçalves et al., 2018; De Oliveira et al., 2019). Os miRNA identificados em módulos relacionados a sinalização de AMPK, MAPK e insulina apresentaram padrão de coexpressão e regularam a expressão de uma série de genes-alvo como *SCD*, *CDS2* (*CDP-diacylglycerol synthase 2*), *FAR2* (*fatty acyl-CoA reductase 2*) e *PRKAG2* (*protein kinase AMP-*

activated non-catalytic subunit gamma 2) (Oliveira et al., 2019).

A análise de coexpressão surge como potencial ferramenta para compreensão dos mecanismos moleculares que regem características complexas, de difícil mensuração e de caráter quantitativo, como deposição de gordura intramuscular e o perfil de ácidos graxos na carne de bovinos, logo, constitui-se em mais um meio para o melhor entendimento da fisiologia por trás de características de importância econômica, apontando genes, mecanismos regulatórios e moduladores que ainda não foram descritos e conseqüentemente ser capaz de inferir, de maneira mais precisa, marcadores genéticos a serem utilizados em programas de melhoramento animal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Tratamentos

O experimento foi conduzido no estado do Mato Grosso, no município de Cáceres em uma das fazendas atendidas pela empresa Silveira Consultoria e Gestão Pecuária. Foram inicialmente, pré-selecionados 20 bezerros machos Nelore puro, registrados em associação de criadores para o primeiro tratamento que foram submetidos a desmama precoce (DP) e realizada aos 120 dias após o nascimento, no período de chuvas em fevereiro de 2021. E mais 20 bezerros também machos Nelore puro, para o tratamento de desmama convencional (DC) aos 210 dias após o nascimento.

Até os 120 dias o grupo DP foi mantido à pasto de braquiária junto às vacas, após a desmama esses foram realocados em piquete de tifton 85 e passaram a ser suplementados em cocho até os 210 dias (Tabela 1). Em contrapartida os bezerros do grupo DC foram mantidos com suas mães até os 210 dias que é o momento convencional de desmame (Figura 1).

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

Fases da criação	Desmama Precoce	Desmama Convencional
Nascimento até os 120 dias	Mantidos à pasto braquiária com a vaca	
120 dias até 210 dias	Somente suplementação: Ração com 20% de PB ¹ 75% de NDT ² 20g de MS*/kg de PV**	Aleitamento convencional e mantidos em pasto de braquiária

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

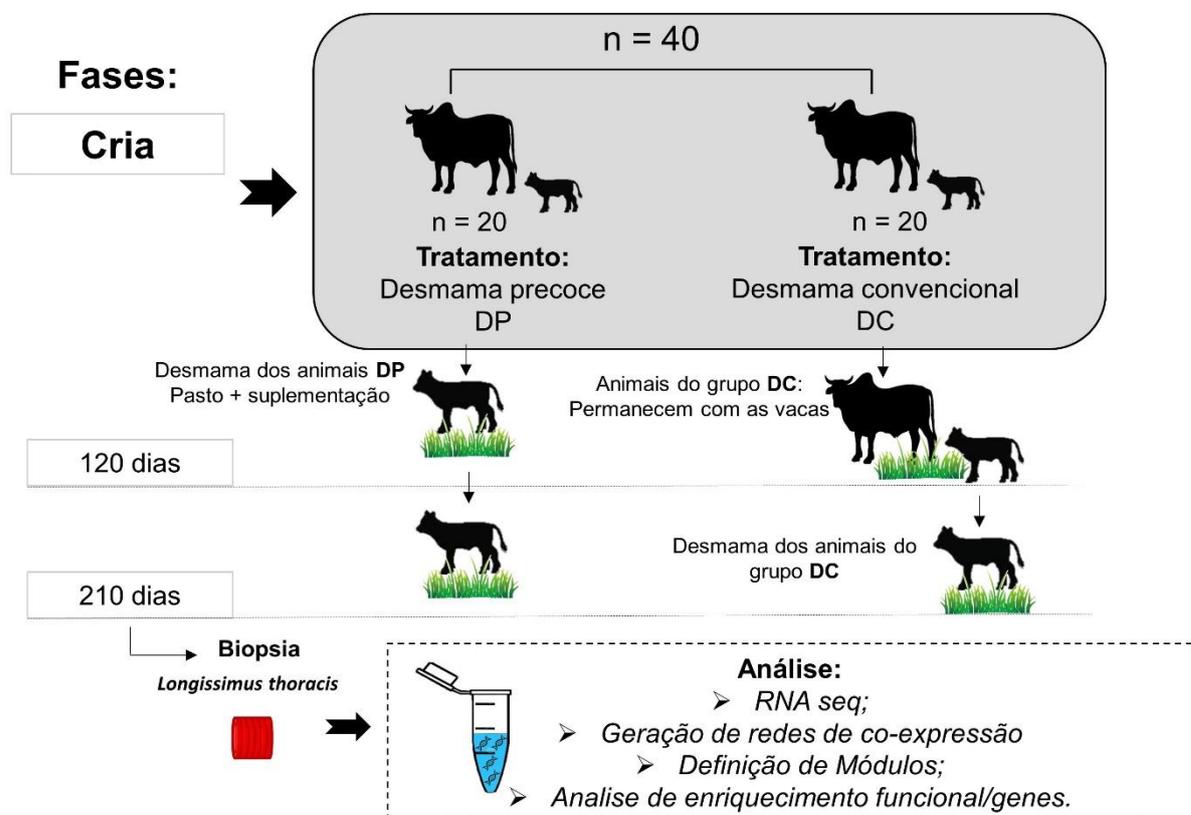


Figura 1. Exemplificação do delineamento amostral realizado no experimento.

3.2 Coleta do Tecido Muscular.

Alíquotas do músculo *Longissimus thoracis* (LT) foram coletadas dos mesmos bezerros aos 210 dias, para ambos os tratamentos. Portanto fora realizada tricotomização e a administração de anestésico local (cloridrato de lidocaína HCl, 20 mg/mL, 6 mL volume total) via subcutânea. Após higienizado o local, uma incisão de 1 centímetro foi realizada com auxílio de bisturi, e obtido 1 grama de tecido de *Longissimus thoracis* com a agulha esterilizada de biópsia do tipo *Bergstrom* (Life Technologies, EUA). Após, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido por um minuto e dispostas em microtubos *ependorf*®. Posteriormente foram armazenadas em ultra freezer com temperatura de -80°C. A fim de evitar contaminações nos animais, a incisão foi lavada, fechada e aplicado spray antibiótico no local.

3.3 Extração de RNA total, preparação das bibliotecas e sequenciamento de mRNA.

Foram selecionadas aleatoriamente oito amostras de cada tratamento (DP e DC) no momento II quando os bezerros completavam 210 dias de idade, com o intuito de mensurar a diferença na expressão gênica entre os tratamentos associada a desmama precoce, foi extraído o RNA total de 16 sub amostras de alíquotas, oito de cada um dos tratamentos.

As amostras de RNA total obtidas a partir do músculo bovino foram submetidas eletroforese em gel de agarose a partir do equipamento *Byoanalyzer*® para avaliação. Também foi aplicado PCR quantitativa, através do *KAPA Library Quantification kit* (KAPA Biosystems, EUA), com a finalidade de avaliar a quantidade (ng/μL) e qualidade (260/280 e 260/230) do RNA.

Para investigar os perfis de expressão gênica foram construídas 16 bibliotecas genômicas de cDNA a partir das amostras de RNA previamente extraídas dos oito indivíduos aos 210 dias. As bibliotecas genômicas foram construídas segundo a orientação do fabricante, por enriquecimento de poli-A, utilizando o *kit TruSeq Stranded mRNA*™ da *Illumina*® (*Illumina*,EUA). A 'clusterização' e o sequenciamento foi realizado por meio da plataforma *NextSeq 550*™ da *Illumina*® com rendimento esperado de 200 milhões de *reads pair-end* utilizando kit de sequenciamento segundo

instruções do fabricante (Illumina, EUA). O sequenciamento foi realizado por meio de serviço de terceiros no Centro de Genômica da ESALQ/USP, Piracicaba/SP.

3.4 Controle de qualidade e mapeamento de sequências

As *reads* obtidas passaram por controle de qualidade inicial utilizando o software FastQC v.0.11.9 (Andrews, 2010), e analisadas individualmente. Sequencialmente foi utilizado o software FastP v.0.20.0 (Chen et al., 2018). Para que fosse realizada a remoção de segmentos de insertos e adaptadores (*trimm*). Também foram excluídas sequências com baixa qualidade de leitura de nucleotídeos (*Phred score* > 20), e com comprimentos menores que 25 bases na sequência. Tudo isso, ignorando leituras e escores de qualidade de segmentos poli-G, característicos de *reads* nulas obtido pelo novo processo de detecção de fluorescência em dois canais das plataformas de sequenciamento Illumina NextSeq. Após controle de qualidade, as *reads* foram mapeadas ao genoma referência bovino ARS-UCD1.2 (Rosen et al., 2018), o qual foi previamente indexado utilizando o programa STAR v.2.7.3a (Dobin et al., 2013). Foi realizado um mapeamento para cada amostra de forma independente, permitindo até dois *mismatches* por *read*. As sequências mapeadas (*.bam) foram analisadas individualmente quanto a quantidade e porcentagens de leituras *pair-end* alinhadas, não alinhadas e segmentos genômico mapeados (éxon, íntron e intergênico) utilizando o programa QualiMap v.2.2.1 (Garcia-Alcalde et al., 2012).

3.5 Obtenção da matriz de contagem.

Após, as sequências geradas (leituras *pair-end* alinhadas) foram contadas com relação a abundância destas mapeada por gene para gerar uma matriz de contagem (genes x amostras) utilizando o software *featureCount* (Liao et al., 2013). Por fim, para controle de qualidade geral, baseadas em arquivos de saída gerados em cada etapa realizadas após o sequenciamento, um relatório foi gerado utilizando o pacote *MultiQC* v1.12 (Ewels et al., 2016).

3.6 Geração de redes de coexpressão de genes.

Para a geração das redes de coexpressão e obtenção dos módulos de expressão gênica foi utilizado nesse trabalho a ferramenta webCEMiTool (Cardozo et al., 2019), portanto foi utilizado como arquivo de entrada a matriz de contagem que consiste em uma tabela de expressão gênica separada por tabulações, que contém genes em suas linhas e amostras em suas colunas com seus respectivos valores de contagem de transcritos para cada gene normalizados, em formato “. tsv”.

- **Filtragem dos genes de entrada.**

O primeiro passo da análise o webCEMiTool realiza a filtragem dos genes de entrada, para isso ele assume uma distribuição *gamma* inversa dos genes e seleciona os genes com base em um p-valor, por padrão o *software* utiliza o valor $p=0,1$, foi aplicado também um filtro de transformação estabilizadora de variância apropriada VST (*Variance Stabilizing Transformation*), além disso o pacote remove por padrão 25% dos genes com a menor média de expressão ao longo das amostras (Russo et al, 2018b).

- **Determinação da matriz de adjacência**

Nesse passo o webCEMiTool determina os valores de correlação entre cada par de gene presente no arquivo de expressão, o método escolhido nesse trabalho foi a correlação *Pearson*, em seguida analisa se a rede formada segue a lei de rede de topologia livre de escala, redes livre de escala por definição, são aquelas em que a probabilidade de um nó estar conectado com k outros nós ($P(k)$) decai segundo uma distribuição lei de potência $P(k) \sim k^{-\gamma}$, logo o coeficiente de determinação da reta R^2 definido por $-r^2 \cdot \frac{|a|}{a}$, onde r é o coeficiente de correlação, e α é a inclinação da linha de regressão na curva entre $\log_{10}(p(k))$ ($p(k)$) e $\log_{10}(k)$. Logo uma linha reta nesse gráfico (isto é, valores de R^2 próximos de 1) indica topologia livre de escala (Zhang e Horvath, 2005), em nossa análise o valor de R^2 encontrado foi $R^2=0,874$.

Em seguida para determinar a matriz de adjacência para isso utiliza-se a função de adjacência $a_{ij} = S_{ij}^\beta$, o parâmetro β é um número inteiro positivo que transforma o valor da correlação entre os genes i e j em uma matriz de adjacência (Zhang e Horvath, 2005), a definição do parâmetro β é definido automaticamente por algoritmo

próprio do CEMiTool, ele seleciona o como β (1 a 20) o menor valor cujo R^2 seja acima de 0,85, observando a curva $\beta \times R^2$, a matriz de adjacência define a força de conexão entre cada par de nós, determinando toda as conexões e conectando os elemento do grafo (Russo et al., 2018b), o valor β encontrado para nosso dados foi $\beta = 5$.

- **Definição dos módulos**

Após calculada a matriz de adjacência, o CEMiTool realiza a determinação dos módulos da rede, o programa transforma a matriz de adjacência em uma Matriz de Sobreposição topológica TOM (*Topological Overlap Matrix*), essa por sua vez é dado por $\Omega = [\omega_{ij}]$, um valor $\omega_{ij} = 1$ significa que i e j estão conectados aos mesmos nós, e um valor = 0 indica que i e j não possuem conexões comuns entre sim, isso serve para calcular a dissimilaridade definidas como $1 - \omega_{ij}$ (Rasvaz et al., 2002).

A separação dos genes em módulos é feita a partir da clusterização hierárquica, com base em média em conjuntos com a dissimilaridade baseada e TOM, por meio da função *hclust* com a medida $1 - \omega_{ij}$ como critério de distância, os galhos que resultam desse dendrograma são os módulos, os quais são o conjunto de genes altamente coexpressos (Zhang e Horvath, 2005) e separados pela função *cutreeDynamic.*, essa etapa é toda baseada no pacote WGCNA (Langfelder et al., 2008).

3.7 Análise de enriquecimento funcional

Por meio do webCEMiTool foi realizada a análise de sobre representação ORA (*over representation analysis*) a partir dos genes encontrados em cada módulo. Para isso, foi fornecido um arquivo contendo anotação de vias metabólicas KEEG, essa etapa foi realizada utilizando a ferramenta *Enrichr* (Chen et al., 2013) conjugada ao webCEMiTool, com base no teste hipergeométrico corrigido para FDR (*false discovery rate*) (método Benjamini-Hochberg) e considerados significativos a partir de $p\text{-adj.} \leq 0,05$.

3.8 Análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA).

A análise baseada em GSEA (*gene set enrichment analyses*) para representar atividade do módulo dentro de cada grupo experimental também foi realizada utilizando webCEMiTool. A partir da própria ferramenta online, é gerada uma lista ranqueada de genes (L) com base em uma normalização do tipo *z-score* da expressão dos genes dentro de cada grupo experimental. Em seguida ele determina os genes dos módulos como uma lista de genes (S), e compara essa lista com a lista ranqueada de cada grupo experimental, se a maioria dos genes de S forem encontradas no topo ou no final da lista o conjunto é considerado enriquecido. No entanto, caso a distribuição ao longo da lista seja homogênea, o conjunto não é considerado enriquecido. A intensidade da cor e tamanho da circunferência dos círculos refletem o valor de enriquecimento normalizado NES (*normalized enrichment score*), em que valores positivos indicam que os genes da lista S foram encontrados no topo da lista L (*up-regulated*), e o valores negativos indicam que os genes da lista S foram encontrados no final da lista L (*down-regulated*), o valor zero indica que não houve enriquecimento (Subramanian et al.,2005; Russo et al., 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Após o protocolo de filtragem de genes aplicado pelo webCEMiTool, restaram 1883 genes (8,8% do input) dos quais foram inferidos 16 módulos, organizados de forma decrescente quanto a número de genes por módulos (Material suplementar S1). Estes foram anotados de forma que módulo 1 (M1) contém o maior número de genes e o módulo 16 (M16) o menor número. Contudo, destes apenas os três primeiros módulos (M1, M2 e M3) tiveram vias KEGG significativamente enriquecidas em ORA. O módulo 1 e 3 apresentaram genes ligados a vias (KEGG *pathways*) envolvidas em mecanismos de defesa do sistema imunológico e inflamação, como: *Natural Killer Cell Mediated Cytotoxicity*, *Cell Adhesion Molecules Cams*, *Chemokine Signaling Pathway*, *T Cell Receptor Signaling Pathway*, *Cytokine-Cytokine Receptor Interaction*, *Primary Immunodeficiency* e *Hematopoietic Cell lineage* (Figura 2).

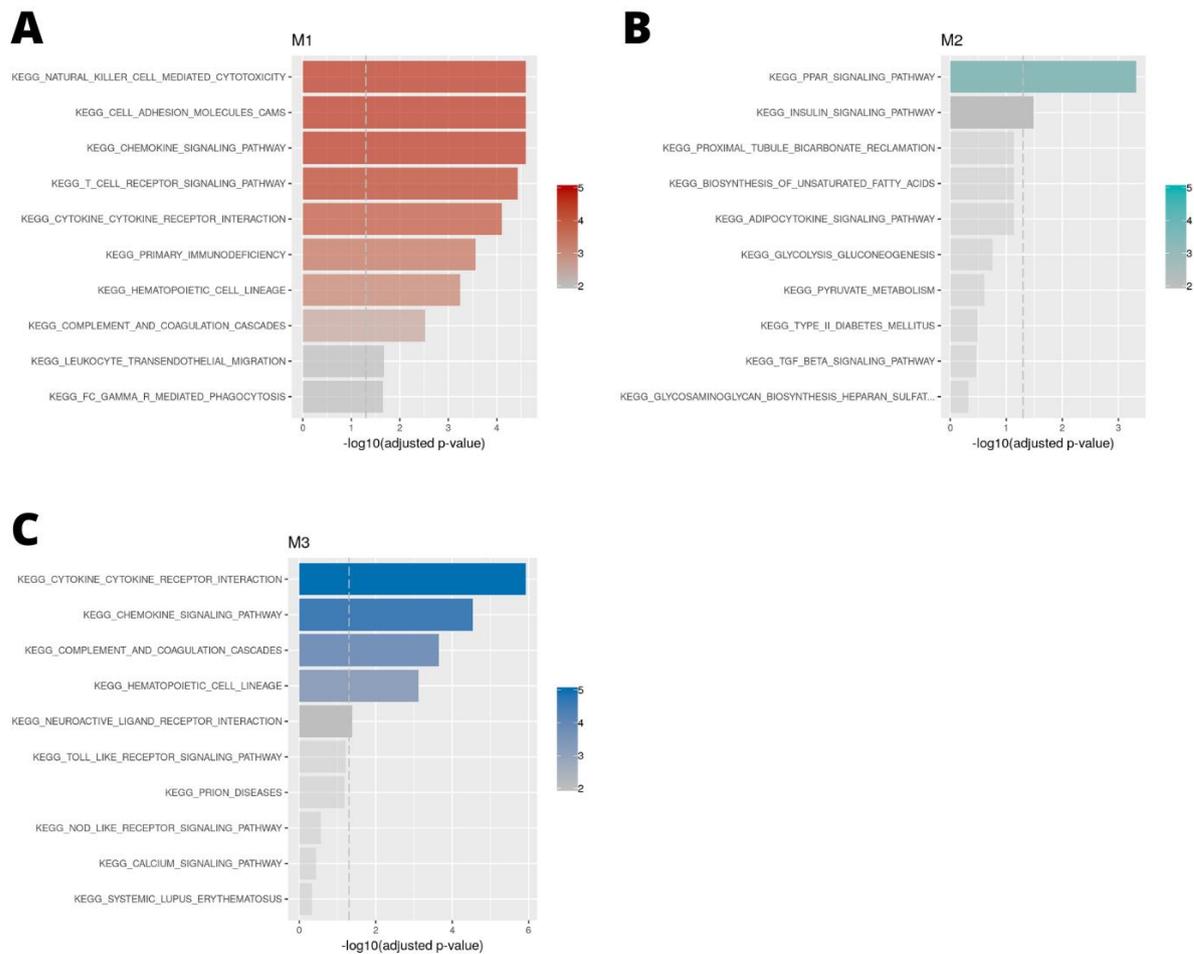


Figura 2. Enriquecimento funcional de vias metabólicas KEGG para os módulos M1(A), M2(B) e M3(C). No eixo x está representado a significância estatísticas do teste de enriquecimento, dada em $-\log_{10}$ do p-valor ajustado (Benjamini-Hockberg) e no eixo y está a descrição ordenada das vias KEGG mais significativas. A linha vertical tracejada indica o p-valor ajustado de 0,05.

No Módulo 2 foi contabilizado 274 genes coexpressos e na análise de rede de interação gênica seus principais genes *Hubs* foram: *PLIN1*, *CIDEA*, *RBP4*, *PPP1R1B* e *MAL2* (Figura 3). Este módulo, obteve maior número de genes significativamente ($p < 0,05$) enriquecidos em vias metabólicas (*pathways*) relacionadas ao metabolismo energético da glicose de lipídios e adipogênese, na análise de sobre-representação (*over representation analysis*) realizado pelo *software* Enrichr conjugado ao WebCEMiTool (Figura 2). Dessa forma o módulo 2 recebeu maior foco de discussão neste estudo, uma vez que as vias metabólicas encontradas no mesmo estão mais relacionadas a hipótese e objetivos do nosso experimento, sendo elas a via de

sinalização da insulina (*Insulin Signaling Pathway*) e a via de sinalização PPAR (*PPAR signaling Pathway*) cujas quais serão pautadas nessa discussão.

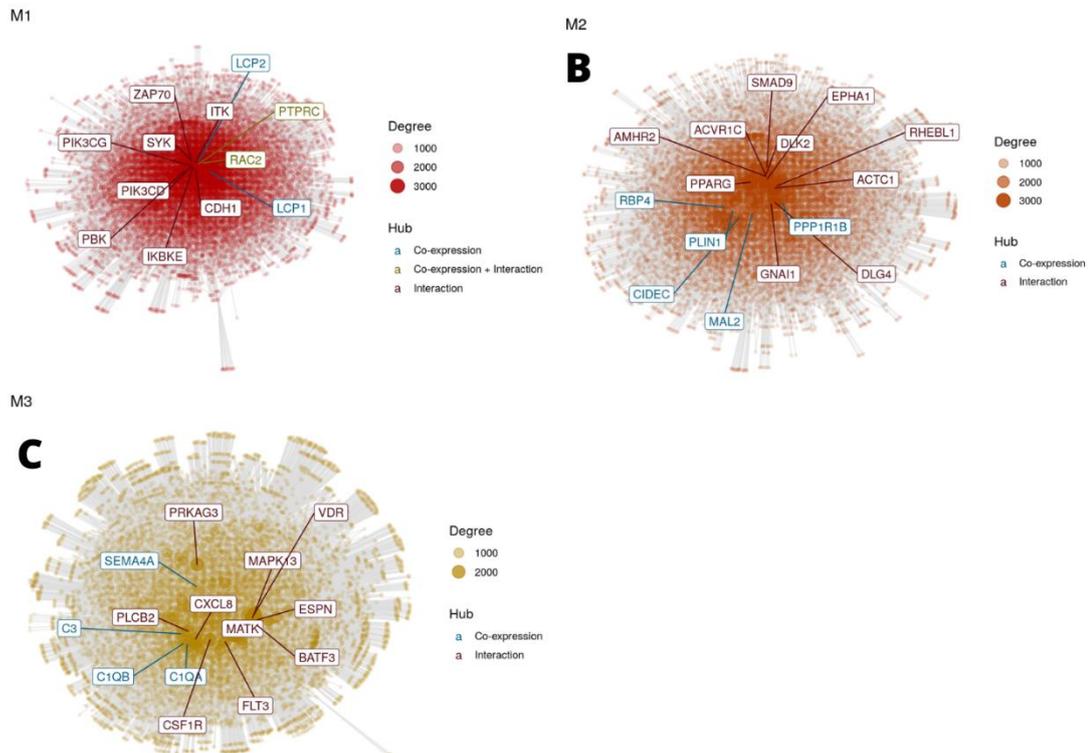


Figura 3. Redes de interação gênica dos módulos M1(A) M2(B) e M3(C). Os genes destacados são aqueles com maior número de conexões (*Hubs*) e as cores das caixas indicam a origem da informação do gene: azul se a interação veio somente da análise de co-expressão, bordô se foi inserido pelo arquivo de interações e verde se a interação consta em ambos

Complementarmente o gráfico da análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA) (Figura 4), apresenta o nível de atividade em cada módulo através do escore enriquecimento representado pelo valor NES, no módulo 2 o grupo DC_C2 (desmama convencional) obteve escore de enriquecimento -2,19 (p-adj. = 0,021) enquanto grupo DP_C2 (desmama precoce) obteve o valor 2,22 (p-adj. = 0,024), portanto os genes do módulo 2 foram encontrados no topo da lista ranqueada de genes do grupo experimental DP com base em seus valores de expressão em ordem decrescente, e que o contrário foi observado para o grupo DC, isso significa dizer que a atividade dos genes do módulo 2 dentro do grupo DP é maior ou análogo a *up-regulated*.

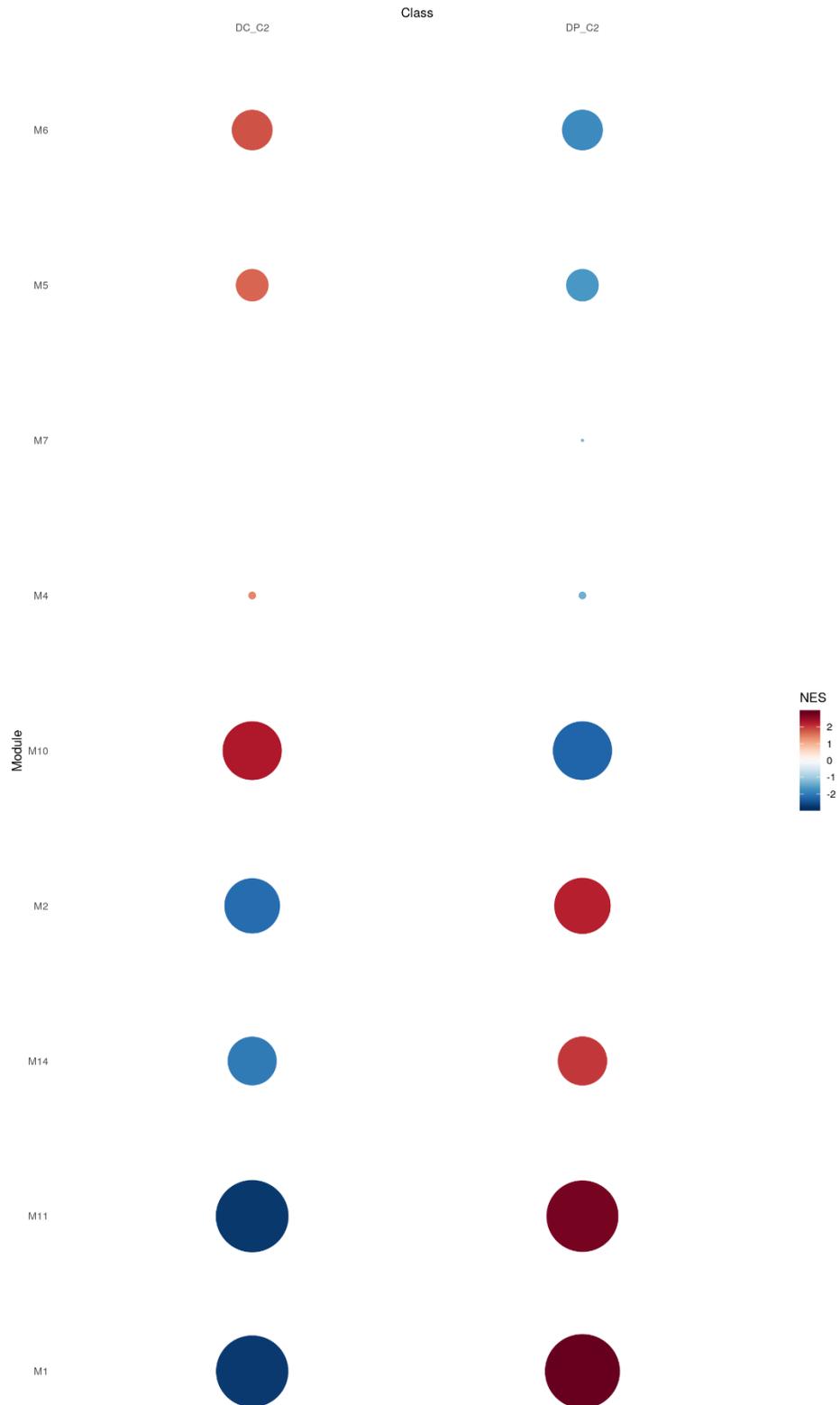


Figura 4. Análise GSEA (*gene set enrichment analysis*), representando a atividade dos módulos dentro de cada classe de amostra, DC_C2 = desmama convencional e DP_C2 = desmama precoce; NES (*Normalized enrichment score*) ou escore de enriquecimento normalizado, cor e circunferência indicam o escore de enriquecimento

A via de sinalização da insulina é uma cascata de eventos intracelulares que ocorrem em resposta a ligação de insulina aos seus receptores. A principal ação da via de sinalização da insulina no tecido muscular é a ativação da translocação da proteína GLUT4 do pool intracelular para a membrana plasmática, GLUT4 pertence à família das proteínas transportadoras de glicose sensíveis a insulina, sendo essa exclusivamente expressa no tecido muscular e adiposo e GLUT4 bovina é altamente homóloga com GLUT4 de outras espécies (Abe et al., 1997).

Portanto a insulina é responsável por controlar os níveis de glicose circulante no sangue, aumentando a quantidade de glicose que entra nas células, isso resulta em aumento da atividade glicolítica (tecido adiposo e muscular), estimula a síntese de glicogênio (tecido adiposo, muscular e fígado), diminui a taxa de depleção de glicogênio no tecido muscular e fígado e inibe a taxa de glicogenólise e gliconeogênese no fígado (Dimitriadis et al., 2011). Entretanto seus efeitos não se limitam somente ao metabolismo de carboidratos, a insulina pode diminuir a taxa de lipólise no tecido adiposo, estimular a síntese de ácidos graxos e triacilglicerol, aumentar a absorção de triglicerídeos do sangue para o músculo e tecido adiposo e diminuir a taxa de oxidação de ácidos graxos no músculo e no fígado. No metabolismo proteico ela aumenta a taxa de transporte de alguns aminoácidos para dentro dos tecidos, aumenta as taxas de síntese de proteína no músculo, tecido adiposo, fígado e outros tecidos e diminui as taxas de degradação de proteínas no músculo (Dimitriadis et al., 2011).

Outra via encontrada no módulo 2 foi a via de sinalização do PPAR, que é importante via sinalização intracelular que está envolvida na regulação do metabolismo lipídico e do metabolismo de glicose. O PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), é uma família de receptores nucleares ativados por ácidos-graxos, suas isoformas trabalham como um heterodímero com o receptor de retinóide X (RXR) e juntos se ligam a regiões específicas do DNA em uma região promotora de um gene alvo, induzindo ou reprimindo sua expressão, realizando importantes funções na regulação do metabolismo e homeostase energética (Lemay e Hwang, 2006).

Existem três isoformas de PPAR, α , β e γ . A PPAR α é altamente expressa no fígado, seguido do intestino, tecido adiposo e coração (Bunger et al., 2007), e desempenha seu principal papel na oxidação de ácidos-graxos (Tyagi et al., 2011). O PPAR γ é codificado pelo gene *PPARG*, que foi sinalizado como gene *Hub* no módulo

2, essa isoforma é altamente expressa no tecido adiposo, mas também no tecido muscular embora um pouco menos (Kersten, 2014) e desempenha um papel fundamental no controle da adipogênese, lipogênese e sensibilidade a insulina (Olefsky e Saltiel, 2000).

Além disso PPAR γ tem grande notoriedade na pesquisa com ruminantes, desde que foi associado como gene candidato a adipogênese no tecido adiposo intramuscular de bovinos (Lim et al., 2011). Diversos estudos com cultura de células *in vitro* sugeriram que o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) e as proteínas de ligação ao intensificador-CCAAT (C/EBP) são fatores cruciais que controlam a adipogênese desde o comprometimento de células-tronco multipotentes até a diferenciação em adipócitos (Cho e Jefcoate, 2004; Fernyhough et al., 2007), isso indica um possível potencial do PPAR γ na diferenciação de pré-adipócitos durante o período pós-natal de bezerros. Dessa forma de acordo com nossos resultados há indícios de haver uma regulação positiva de genes e vias envolvidas na diferenciação de adipócitos e lipogênese no grupo experimental desmamado precocemente e que recebeu suplementação com concentrado.

Nossos resultados são corroborados por Moisé et al. (2013) neste estudo o padrão de expressão de 35 genes alvos em bezerros das raças Angus e Angus x Simental, que foram divididos em dois grupos: os desmamados precocemente (141 dias, dia 0 do tratamento), que passaram a comer exclusivamente ração de alto teor de amido, e os que permaneceram junto as vacas à pastagem, recebendo também ração de alto amido no regime de *creep-feeding* até serem desmamados aos 222 dias de idade. A expressão de *PPARG* e outros ativadores adipogênicos e lipogênicos e várias enzimas que participam do processo de deposição de gordura intramuscular, aumentou gradualmente no grupo de animais desmamados precoces, atingindo seu pico aos 96 e 167 dias do tratamento, o mesmo não foi observado no grupo de desmama convencional. Além disso após o abate as maiores pontuações de marmoreio foram encontradas no grupo de animais cruzados Angus x Simental desmamados precocemente, seguido pelo grupo de animais puro Angus também desmamados precocemente.

Moriel et al. (2014), trabalhando também com a comparação entre desmama precoce e convencional (70 dias e 250 dias de idade respectivamente) em bezerros de corte, de influência genética zebuína, concluíram que exposição precoce a dieta

de alto-concentrado aprimorou a performance de crescimento em bezerros desmamados precoce bem como induziu a diferenciação de adipócitos, concomitante com a alta expressão de mRNA de *PPARG* em comparação com o grupo de desmama convencional, o que colabora com o resultados fenotípicos observados.

Destaca-se também o gene *PLIN1* que foi sinalizado como gene *Hub* dentro do módulo 2 e também foi enriquecido para via de sinalização PPAR, esse gene codifica a proteína Perilipina 1, também conhecida como proteína associada a gotículas lipídicas, nos adipócitos, em condições basais *PLIN1* (hipofosforilada) protege as gotículas lipídicas das lipases presentes no citosol, atuando como válvula impedindo que a lipase entre nas gotículas, e promove armazenamento de lipídio. A proteína Perilipina é fosforilada pela proteína quinase A (PKA), após fosforilação promove ativamente atividade lipolítica, transportando HSL (lipase sensível a hormônios) para a superfície das gotículas lipídicas para facilitar a lipólise sobre condições de deficiência energética (Raza et al., 2020; Shijum et al., 2020).

Shijum et al. (2020) realizaram uma ampla análise em torno do gene *PLIN1* trouxe novas elucidações sobre sua função em bovinos. Eles encontraram os maiores níveis de expressão de *PLIN1* na gordura subcutânea, seguido por coração e músculos *Longissimus*, e encontram um pico de expressão de mRNA durante a diferenciação de adipócitos do segundo ao sexto dia seguido de uma queda do sexto ao décimo dia. Outro resultado importante foi obtido a partir do silenciamento do gene em adipócitos, o *knockdown* de *PLIN1* bem como de seus fatores de transcrição, resultou em expressão *up-regulated* para genes de lipases (HSL e ATGL) e inibiu a expressão de *SCD1*, *ACC* e *SREBP-1c* (marcadores de diferenciação), portanto inibindo a síntese de ácidos graxos e aumentando lipólise que foi constada pela mensuração do conteúdo de triglicerídeos nos adipócitos. Portanto os autores concluem que *PLIN1* é o principal regulador de adipogênese e lipogênese bovina e seus fatores de transcrição *E2F1*, *C/EBP β* , *PLAG1*, e *SMAD3* são seus principais reguladores transcricionais.

Os genes e proteínas destacados acima (*SCD1*, *ACC*, e *SREBP-1c*) também foram encontrados no módulo 2 e foram enriquecidos para via de sinalização PPAR (KEGG): *SCD1* codifica a enzima esteroil-CoA- dessaturase, que converte ácido graxo saturados em insaturados e via de sinalização da insulina (KEGG): *ACACA* codifica a enzima acetil-CoA carboxylase (*ACC*). Foi encontrado também o gene *FASN* (*fatty*

acid synthase), ácido-graxo sintase enriquecido na via de sinalização da insulina, esses genes codificam as principais enzimas envolvidas na síntese *de novo* de ácidos graxos. Além disso o fator de transcrição SREBP-1c sinalizado como um dos principais genes ativado pela ação de *PLIN1* por Shijum et al. (2020), codificado pelo gene *SREBF1* (*sterol regulatory element-binding transcription factor 1*) exerce regulação positiva sobre as enzimas ACC e FASN. Contudo *SREBF1* junto ao PPAR γ são relatados como os principais fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de lipídeos (Ladeira et al., 2016).

O gene *CIDEA* também destacado como *Hub* dentro do módulo 2, também é envolvido no metabolismo lipídico, seu produto é uma proteína que se associa a superfície de gotículas lipídicas e colocaliza-se com a Perilipina (*PLIN1*), e tem a função de suprimir a lipólise, estimular o tamanho da gotícula e acumular triglicerídeos (Puri et al., 2007). Kim et al. (2008) demonstraram que a atividade transcricional de *CIDEA* é induzida por PPAR γ 2 na diferenciação adipócitos.

Outro gene *Hub* encontrado no módulo 2 foi o *RBP4*, o produto desse gene é a proteína de ligação ao retinol-4, uma proteína circulante que age como uma transportadora do retinol (Vitamina A) do fígado para os órgãos periféricos (Liu et al., 2019). Entretanto sua função pode ser muito mais ampla, visto que recentemente foi descoberto que *RBP4* pode se ligar e transportar ácido-graxos (Perduca et al., 2018). Além disso *RBP4* foi associado também a deposição de gordura intramuscular no músculo *Longissimus* de bovinos, um estudo analisando raças taurinas e zebuínas, identificaram *RBP4* entre um conjunto de genes envolvidos no metabolismo lipídico de adipócitos intramusculares, revelando uma correlação positiva entre a expressão de *RBP4* e deposição de gordura intramuscular (De Jager et al., 2013).

Contudo diante disso, podemos prever que o manejo de desmama precoce seguida de alimentação com concentrado, resultou numa regulação positiva de genes e vias metabólicas diretamente envolvidas na lipogênese e adipogênese, inclusive dentre os quais também estão relacionados a deposição de gordura intramuscular, possivelmente em virtude de uma priorização de vias glicolíticas para obtenção de energia no tecido muscular, e ativação de genes ligados a lipogênese.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo conclui-se que o manejo de desmame precoce aos 120 dias de idade em bezerros da raça Nelore, suplementados com concentrado pode levar a alterações a níveis moleculares e metabólicos, foram encontradas vias metabólicas enriquecidas associados a atividade de adipogênese e lipogênese. Foi identificado um módulo de genes coexpressos com regulação positiva para o grupo desmamado precoce que desempenham papel chave na regulação do metabolismo de lipídeos, bem como destacados genes *Hubs* que podem ser alvos de investigações futuras sobre a regulação da lipogênese e adipogênese em zebuínos. Desse modo, a suplementação com concentrado em bezerros que foram desmamados precocemente tem potencial de afetar a regulação de vias metabólicas e expressão de genes diretamente relacionadas a hiperplasia de adipócitos e armazenamento de lipídios, abrindo possibilidade de alterações na deposição de gordura subcutânea, possivelmente intramuscular, composição de carcaça e qualidade da carne pós-abate.

6 REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Molecular cloning and mRNA expression of the bovine insulin-responsive glucose transporter (GLUT4). **Journal of animal science**, v. 75, n. 1, p. 182-188, 1997.
- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Beef Report 2023 Perfil da Pecuária no Brasil. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/catpub/impressos/>. Acesso em: 19/06/2023.
- ALMEIDA, Luciane Salgueiro Pio de; LOBATO, José Fernando Piva; SCHENKEL, Flávio Schramm. Idade de desmame e suplementação no desenvolvimento e em características de carcaças de novilhos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1713-1721, 2003.
- ANDERS, Simon; PYL, Paul Theodor; HUBER, Wolfgang. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **bioinformatics**, v. 31, n. 2, p. 166-169, 2015.
- ARTHINGTON, J. D.; KALMBACHER, R. S. Effect of early weaning on the performance of three-year-old, first-calf beef heifers and calves reared in the subtropics. **Journal of animal science**, v. 81, n. 5, p. 1136-1141, 2003.

- BERRY, D. P.; WALL, Eileen; PRYCE, J. E. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. **animal**, v. 8, n. s1, p. 105-121, 2014.
- BERTON, Mariana Piatto et al. Integration analyses of structural variations and differential gene expression associated with beef fatty acid profile in Nellore cattle. **Animal Genetics**, v. 53, n. 5, p. 570-582, 2022.
- BLUM, J. W. Nutritional physiology of neonatal calves. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 90, n. 1-2, p. 1-11, 2006.
- BOICHARD, Didier et al. Genomic selection in French dairy cattle. **Animal Production Science**, v. 52, n. 3, p. 115-120, 2012.
- BONAMY, Martin et al. Genetic association between different criteria to define sexual precocious heifers with growth, carcass, reproductive and feed efficiency indicator traits in Nellore cattle using genomic information. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 136, n. 1, p. 15-22, 2019.
- BONIN, Marina de Nadai et al. Genetic parameters associated with meat quality of Nellore cattle at different anatomical points of longissimus: Brazilian standards. **Meat Science**, v. 171, p. 108281, 2021.
- BRUNES, Ludmilla C. et al. Weighted single-step genome-wide association study and pathway analyses for feed efficiency traits in Nellore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 138, n. 1, p. 23-44, 2021.
- BUNGER, Meike et al. Genome-wide analysis of PPAR α activation in murine small intestine. **Physiological genomics**, v. 30, n. 2, p. 192-204, 2007.
- CARDOZO, Lucas E. et al. webCEMiTool: Co-expression modular analysis made easy. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 146, 2019.
- CARVALHO, Minos Esperândio et al. Identification of genomic regions related to tenderness in Nellore beef cattle. **Advances in Animal Biosciences**, v. 8, n. s1, p. s42-s44, 2017.
- CHEN, Edward Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2013.
- CHEN, Shifu et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884-i890, 2018.
- CHENG, Chew Weng; BEECH, David J.; WHEATCROFT, Stephen B. Advantages of CEMiTool for gene co-expression analysis of RNA-seq data. **Computers in Biology and Medicine**, v. 125, p. 103975, 2020.
- CHO, Young C.; JEFCOATE, Colin R. PPAR γ 1 synthesis and adipogenesis in C3H10T1/2 cells depends on S-phase progression, but does not require mitotic clonal expansion. **Journal of cellular biochemistry**, v. 91, n. 2, p. 336-353, 2004.
- CLOONAN, Nicole et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature methods**, v. 5, n. 7, p. 613-619, 2008.
- CULLUM, Rebecca; ALDER, Olivia; HOODLESS, Pamela A. The next generation: using new sequencing technologies to analyse gene regulation. **Respirology**, v. 16, n. 2, p. 210-222, 2011.

CURION, Fabiola et al. Targeted RNA sequencing enhances gene expression profiling of ultra-low input samples. **RNA biology**, v. 17, n. 12, p. 1741-1753, 2020.

DE JAGER, N. et al. Gene expression phenotypes for lipid metabolism and intramuscular fat in skeletal muscle of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1112-1128, 2013.

DE MELO, Thaise Pinto et al. Across-breed validation study confirms and identifies new loci associated with sexual precocity in Brahman and Nelore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 137, n. 2, p. 139-154, 2020.b

DE OLIVEIRA, Priscila SN et al. Co-expression networks reveal potential regulatory roles of miRNAs in fatty acid composition of Nelore cattle. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 651, 2019.

DIMITRIADIS, George et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes research and clinical practice**, v. 93, p. S52-S59, 2011.

DINIZ, Wellison JS et al. Detection of co-expressed pathway modules associated with mineral concentration and meat quality in nelore cattle. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 210, 2019.

DINIZ, Wellison JS et al. KCNJ11 gene expression is associated to feed consumption and growth traits in Nelore beef cattle. **Agri Gene**, v. 9, p. 1-4, 2018.

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

DONKIN, S. S.; HAMMON, H. Hepatic gluconeogenesis in developing ruminants. **Biology of growing animals**, v. 3, p. 375-390, 2005.

EUSTAQUIO FILHO, A. et al. Balanco energetico negativo. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 11, Ed. 116, Art. 785, 2010.

FENG, Huijuan; QIN, Zhiyi; ZHANG, Xuegong. Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq. **Cancer letters**, v. 340, n. 2, p. 179-191, 2013.

FERGUSON, Drewe M., et al. Effect of electrical stimulation on protease activity and tenderness of M. longissimus from cattle with different proportions of Bos indicus content. **Meat Science**, 2000, 55.3: 265-272.

FERNANDES JUNIOR, Gerardo A. et al. Imputation accuracy to whole-genome sequence in Nelore cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 53, n. 1, p. 1-10, 2021.

FERNYHOUGH, M. E. et al. PPAR γ and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 367-378, 2007.

FERREIRA, A. de M. Efeito da amamentação na reprodução de vacas: uma revisão. 1992.

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

- GIRARD, J. E. A. N. et al. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. **Physiological reviews**, v. 72, n. 2, p. 507-562, 1992.
- GOMES, Mariana Mundim Alves; LÔBO, Rayisildo Barbosa; DE FARIA, Carina Ubirajara. Genetic correlation between feed efficiency and carcass traits in Nellore cattle in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 44, n. 1, p. 97-112, 2023.
- GONÇALVES, Tássia Mangetti et al. Gene co-expression analysis indicates potential pathways and regulators of beef tenderness in Nellore cattle. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 441, 2018.
- GRAUGNARD, Daniel E. et al. Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus× Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2009.
- GREENWOOD, P. L.; CAFE, L. M. Prenatal and pre-weaning growth and nutrition of cattle: long-term consequences for beef production. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1283-1296, 2007.
- HAMMON, H. M. et al. Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: endocrine changes and responses to milk-borne and systemic hormones. **Domestic animal endocrinology**, v. 43, n. 2, p. 171-185, 2012.
- HANLEY, Bryan et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics—a review of present priorities and future opportunities. **British journal of nutrition**, v. 104, n. S1, p. S1-S25, 2010.
- HAYES, Ben J. et al. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 433-443, 2009.
- HRDLICKOVA, Radmila; TOLOUE, Masoud; TIAN, Bin. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 1, p. e1364, 2017.
- IRANO, Natalia et al. Genome-wide association study for indicator traits of sexual precocity in Nellore cattle. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0159502, 2016.
- JOHNSON, D. D., et al. Effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science**, 1990, 68.7: 1980-1986.
- JÚNIOR, Gerardo Alves Fernandes, et al. Current applications and perspectives of genomic selection in *Bos indicus* (Nellore) cattle. **Livestock Science**, 2022, 105001.
- KERSTEN, Sander. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . **Molecular metabolism**, v. 3, n. 4, p. 354-371, 2014.
- KIM, Yoon-Jin et al. Transcriptional activation of Cidec by PPAR γ 2 in adipocyte. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 377, n. 1, p. 297-302, 2008.
- LADEIRA, Marcio M. et al. Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 6, p. 918, 2016.

- LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2008.
- LEMAY, Danielle G.; HWANG, Daniel H. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. **Journal of lipid research**, v. 47, n. 7, p. 1583-1587, 2006.
- LIM, Dajeong et al. Gene co-expression analysis to characterize genes related to marbling trait in Hanwoo (Korean) cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 19, 2013.
- LIM, Dajeong et al. Identification of candidate genes related to bovine marbling using protein-protein interaction networks. **International journal of biological sciences**, v. 7, n. 7, p. 992, 2011.
- LIU, Yinuo et al. Retinol binding protein 4 abundance in plasma and tissues is related to body fat deposition in cattle. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8056, 2019.
- LOBATO, José Fernando Piva et al. Efeito da idade de desmame no desenvolvimento e nas características de carcaça de novilhos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 596-602, 2007.
- LONDOÑO-GIL, Marisol et al. Heritability and genetic correlations between marbling in longissimus dorsi muscle and conventional economic traits in Nellore beef cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54, n. 5, p. 274, 2022.
- LOWE, Rohan et al. Transcriptomics technologies. **PLoS computational biology**, v. 13, n. 5, p. e1005457, 2017.
- LUSBY, K. S.; WETTEMANN, R. P.; TURMAN, E. J. Effects of early weaning calves from first-calf heifers on calf and heifer performance. **Journal of animal science**, v. 53, n. 5, p. 1193-1197, 1981.
- MAGALHAES, Ana FB et al. Genome-wide association study of meat quality traits in Nellore cattle. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157845, 2016.
- MEYER, D. L. et al. Growth rate, body composition, and meat tenderness in early vs. traditionally weaned beef calves. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 12, p. 2752-2761, 2005.
- MORAES, Giovanna Faria et al. Selection for feed efficiency does not change the selection for growth and carcass traits in Nellore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 136, n. 6, p. 464-473, 2019.
- MORIEL, P. et al. Effects of calf weaning age and subsequent management systems on growth performance and carcass characteristics of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 8, p. 3598-3609, 2014.
- MORIEL, P. et al. Effects of calf weaning age and subsequent management systems on growth performance and carcass characteristics of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 8, p. 3598-3609, 2014.
- MORTAZAVI, Ali et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature methods**, v. 5, n. 7, p. 621-628, 2008.

- MOTA, L. F. M. et al. Genomic reaction norm models exploiting genotype× environment interaction on sexual precocity indicator traits in Nelore cattle. **Animal Genetics**, v. 51, n. 2, p. 210-223, 2020.
- MUTZ, Kai-Oliver et al. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 22-30, 2013.
- MYERS, S. E. et al. Comparison of three weaning ages on cow-calf performance and steer carcass traits. **Journal of animal science**, v. 77, n. 2, p. 323-329, 1999.
- MYERS, S. E. et al. Production systems comparing early weaning to normal weaning with or without creep feeding for beef steers. **Journal of animal science**, v. 77, n. 2, p. 300-310, 1999.
- NOVAIS, Francisco José de et al. Multi-omic data integration for the study of production, carcass, and meat quality traits in Nelore cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 948240, 2022.
- ODEN, Jon; TREEN, W. R. Inborn errors of fasting adaptation. **Nutrition in Pediatrics**, p. 591, 2003.
- OLEFSKY, Jerrold M.; SALTIEL, Alan R. PPAR γ and the treatment of insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 9, p. 362-368, 2000.
- OLIVEIRA, Luiz Orcirio Fialho de et al. Productive performance of pre-weaned calves reared in the pantanal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, 2019.
- PASCOAL, Leonir Luiz; EIFERT, Eduardo da Costa; RESTLE, João. Nível de proteína bruta para bezerros de corte desmamados aos 66 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1537-1544, 2000.
- PATEL, Mulchand S.; SRINIVASAN, Malathi. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 58, n. Suppl. 2, p. 18-28, 2011
- PERCIVAL, J. C. et al. Growth rates of early and late weaned single and identical twin calves. In: **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**. 1952.
- PERDUCA, Massimiliano et al. Human plasma retinol-binding protein (RBP4) is also a fatty acid-binding protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1863, n. 4, p. 458-466, 2018.
- PIMENTEL, C. A. et al. Effects of early weaning on reproductive efficiency in beef cows. **Theriogenology**, v. 11, n. 6, p. 421-427, 1979.
- PÖTTER, Bernardo Augusto Albornoz; LOBATO, José Fernando Piva. Performance and carcass traits of Braford steers weaned at 100 or 180 days and slaughtered at 13-14 months old. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1220-1226, 2003.
- PURI, Vishwajeet et al. Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 47, p. 34213-34218, 2007.
- RAU, Andrea; MAUGIS-RABUSSEAU, Cathy. Transformation and model choice for RNA-seq co-expression analysis. **Briefings in bioinformatics**, v. 19, n. 3, p. 425-436, 2018.

- RAVASZ, Erzsébet et al. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. **science**, v. 297, n. 5586, p. 1551-1555, 2002.
- RAZA, Sayed Haidar Abbas, et al. Polymorphism of the PLIN1 gene and its association with body measures and ultrasound carcass traits in Qinchuan beef cattle. *Genome*, 2020, 63.10: 483-492.
- ROSEN, B.D.; BICKHART, D.M.; SCHNABEL, R.D.; et al. 2018. Modernizing the bovine reference genome assembly. Proc. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018. Auckland, New Zealand. p. 802, 2018.
- ROYCE, Thomas E.; ROZOWSKY, Joel S.; GERSTEIN, Mark B. Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 15, p. e99, 2007.
- RUAN, Jianhua; DEAN, Angela K.; ZHANG, Weixiong. A general co-expression network-based approach to gene expression analysis: comparison and applications. **BMC systems biology**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2010.
- RUSSO, Pedro de Sa Tavares. **Desenvolvimento de uma ferramenta computacional para análise de coexpressão gênica e sua aplicação na biologia de sistemas**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. (b)
- RUSSO, Pedro ST et al. CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2018.
- SANTANA JR, M. L. et al. Structure and genetic diversity of Brazilian Zebu cattle breeds assessed by pedigree analysis. **Livestock Science**, v. 187, p. 6-15, 2016.
- SCHEFFLER, J. M. et al. Early metabolic imprinting events increase marbling scores in fed cattle. **Journal of animal science**, v. 92, n. 1, p. 320-324, 2014.
- SCHOONMAKER, J. P.; FLUHARTY, F. L.; LOERCH, S. C. Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on adipocyte cellularity and lipogenic enzyme activity in the intramuscular and subcutaneous fat depots of Holstein steers. **Journal of animal science**, v. 82, n. 1, p. 137-148, 2004.
- Shijun, L., Khan, R., Raza, S. H. A., Jieyun, H., Chugang, M., Kaster, N., ... & Linsen, Z. (2020). Function and characterization of the promoter region of perilipin 1 (PLIN1): Roles of E2F1, PLAG1, C/EBP β , and SMAD3 in bovine adipocytes. *Genomics*, 112(3), 2400-2409.
- SHORT, Robert E.; ADAMS, D. C. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 68, n. 1, p. 29-39, 1988.
- SILVA-VIGNATO, Bárbara et al. Gene co-expression networks associated with carcass traits reveal new pathways for muscle and fat deposition in Nelore cattle. **BMC genomics**, v. 20, p. 1-13, 2019.
- SITHYPHONE, Khounsaknalath et al. Comparison of feeding systems: feed cost, palatability and environmental impact among hay-fattened beef, consistent grass-only-fed beef and conventional marbled beef in Wagyu (Japanese Black cattle). **Animal Science Journal**, v. 82, n. 2, p. 352-359, 2011.

SUBRAMANIAN, Aravind et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15545-15550, 2005.

TIZIOTO, P. C. et al. Variation in myogenic differentiation 1 mRNA abundance is associated with beef tenderness in Nelore cattle. **Animal genetics**, v. 47, n. 4, p. 491-494, 2016.

TIZIOTO, Polyana Cristine et al. Calcium and potassium content in beef: Influences on tenderness and associations with molecular markers in Nelore cattle. **Meat science**, v. 96, n. 1, p. 436-440, 2014.

TRAPNELL, Cole et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, 1980, 50.6: 1201-1205.

TYAGI, Sandeep et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 236, 2011.

VALENTE, Júlia de Paula Soares et al. Heritability and genetic association of social organization traits with feeding behavior, feed efficiency and growth in *Bos indicus*. **Applied Animal Behaviour Science**, p. 105976, 2023.

VAN DAM, Sipko et al. Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. **Briefings in bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 575-592, 2018.

VAZ, Fabiano Nunes; RESTLE, João. Aspectos qualitativos da carcaça e da carne de machos Braford superprecoces, desmamados aos 72 ou 210 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2078-2087, 2002.

VAZ, Ricardo Zambarda; LOBATO, José Fernando Piva; PASCOAL, Leonir Luiz. Desenvolvimento de bezerros de corte desmamados aos 80 ou 152 dias até os 15-16 meses de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 221-229, 2011.

VISSCHER, Peter M. et al. Cinco anos de descoberta do GWAS. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 1, pág. 7-24, 2012.

WADDINGTON, Conrad H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, v. 150, n. 3811, p. 563-565, 1942.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WARNER RG and FLATT WP 1965. Anatomical developments of the ruminant stomach. In *Physiology and digestion in the ruminant* (ed. RW Doherty, RS Allen, W Burroughs, NL Jacobsen and AD McGilliard), pp. 24–38. Butterworths, Washington, DC, USA.

WATERMAN, R. C. et al. Early weaning in Northern Great Plains beef cattle production systems: III. Steer weaning, finishing and carcass characteristics. **Livestock Science**, v. 148, n. 3, p. 282-290, 2012.

ZHANG, Bin; HORVATH, Steve. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. **Statistical applications in genetics and molecular biology**, v. 4, n. 1, 2005.

ZHAO, Shanrong et al. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e78644, 2014.

ZHOU, Xiaoguang et al. The next-generation sequencing technology and application. **Protein & cell**, v. 1, n. 6, p. 520-536, 2010.