



## Identificacao de vias moleculares associadas a eficiencia alimentar em figado de bovinos nelore

Alexandre, P. A.; Kogelman, Lisette; Santana, M. H. A.; Eler, J. P.; Silva, S. L.; Leme, P. R.; Coutinho, L. L.; Kadarmideen, Haja; Fukumasu, H.

*Publication date:*  
2014

*Document version*  
Tidlig version også kaldet pre-print

*Citation for published version (APA):*  
Alexandre, P. A., Kogelman, L., Santana, M. H. A., Eler, J. P., Silva, S. L., Leme, P. R., ... Fukumasu, H. (2014). *Identificacao de vias moleculares associadas a eficiencia alimentar em figado de bovinos nelore*. Paper præsenteret ved XXIII Semana Cientifica Benjamin Eurico Malucelli, Sao Paulo, Brasilien.

# IDENTIFICAÇÃO DE VIAS MOLECULARES ASSOCIADAS À EFICIÊNCIA ALIMENTAR EM FÍGADO DE BOVINOS NELORE

ALEXANDRE, P.A.<sup>1</sup>, KOGELMAN, L.J.A.<sup>2</sup>, SANTANA, M.H.A.<sup>1</sup>, ELER, J.P.<sup>1</sup>, SILVA, S.L.<sup>3</sup>, LEME, P.R.<sup>3</sup>, COUTINHO, L.L.<sup>4</sup>, KADARMIDEEN, H.N.<sup>2</sup> e FUKUMASU, H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil. Email: pamela.alexandre@usp.br

<sup>2</sup>Department of Veterinary Clinical and Animal Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Denmark

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Brasil.

## Introdução

A crescente demanda por energia e proteína para suprir a população humana em constante expansão traz para a pecuária preocupações com o aumento da produtividade e, ao mesmo tempo, com a diminuição do impacto ambiental gerado por esta atividade [1]. Uma forma de lidar com essas questões é através da melhora na eficiência alimentar (EA) de bovinos de corte, característica diretamente relacionada à produtividade e lucratividade, já que um animal mais eficiente produz mais carne por quilograma de alimento ingerido [2]. Além disso, animais mais eficientes produzem menos poluentes como esterco e metano, o que diminui o impacto ambiental da criação de bovinos [3].

Apesar de importante, a seleção para EA representa um desafio, já que se espera que uma combinação de diferentes processos biológicos esteja associada à sua variação [4]. Abordagens de biologia de sistemas para análise de dados transcriptômicos podem nos ajudar a entender as complexas funções e interações de genes que trabalham coordenadamente para a expressão dessa característica, tornando possível no futuro, sua modulação pela dieta, meio ambiente ou mesmo pela identificação de marcadores moleculares responsáveis pela alteração fenotípica [5].

O objetivo do presente trabalho foi, a partir da expressão gênica global hepática de animais com alta e baixa eficiência alimentar, identificar novos genes, funções biológicas e genes reguladores associados a esse fenótipo.

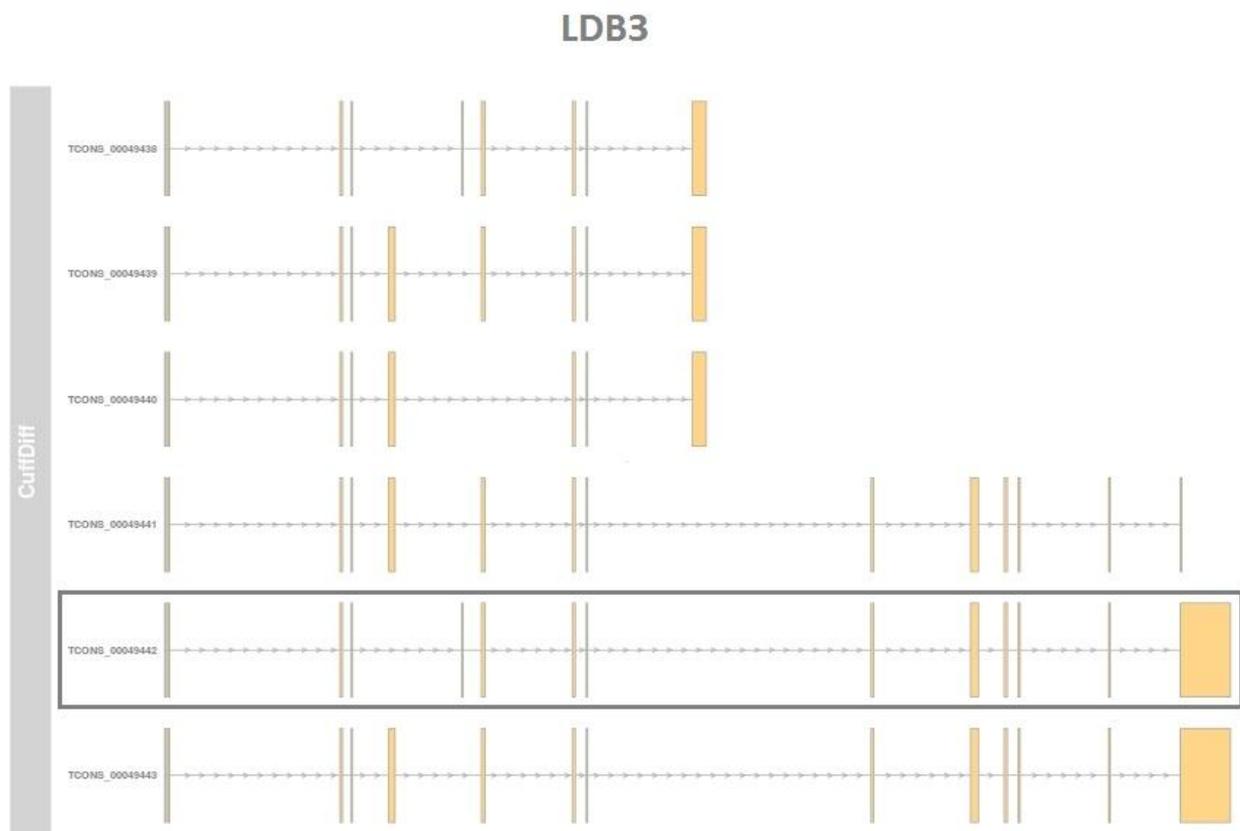
## Material e métodos

No presente trabalho, 98 animais machos inteiros da raça Nelore foram avaliados quanto à sua EA pela medida de consumo e ganho residual (CGR) [3]. Baseado nos valores extremos de CGR foram formados dois grupos, um com 8 animais de alta eficiência alimentar e outro com 8 animais de baixa eficiência alimentar. Amostras de fígado desses animais foram coletadas por biopsia, o seu mRNA foi extraído e posteriormente sequenciado no equipamento Illumina HiSeq 2500. As leituras resultantes do sequenciamento tiveram sua qualidade avaliada pelo software FastQC e adaptadores, cauda poliA e bases com baixa qualidade foram removidas pelo software Seqclean. O alinhamento das sequências e a análise de expressão diferencial foram feitos utilizando TopHat2/Bowtie2 e Cufflinks2 como descrito por [4]. A análise de co-expressão gênica foi realizada através do pacote WGCNA do R para identificar módulos de genes altamente conectados, detalhes da metodologia podem ser encontrados em [8]. A correlação entre o perfil de expressão gênica desses módulos e o valor de CGR de cada animal foi calculado para identificar

módulos associados à EA. Com o objetivo de determinar genes reguladores dos módulos de interesse, o software Lemon-tree foi utilizado [9], [10]. Finalmente, a co-expressão diferencial entre os grupos de alta e baixa EA foi determinada pela diferença no valor de conectividade dos genes em cada grupo, como descrito em [8]. Para os genes encontrados em cada abordagem descrita, foi executada uma análise de enriquecimento funcional utilizando-se a ferramenta *on line* GeneCoDis.

## Resultados

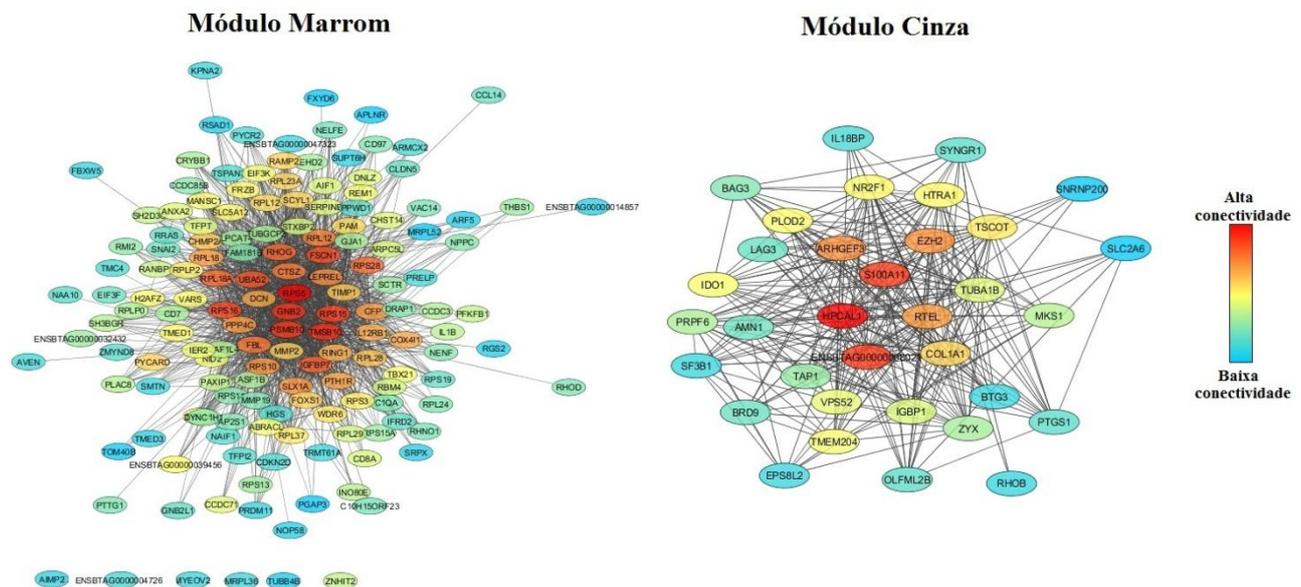
Foram identificados 43 transcritos diferencialmente expressos entre os grupos de alta e baixa eficiência alimentar, 23 deles correspondem a genes conhecidos, 4 codificam proteínas não caracterizadas ou pseudogenes recentemente descobertos e 16 são novos transcritos, ou seja, não constam no genoma de referência utilizado (*Bos taurus* UMD 3.1 - ENSEMBL V67). Dentre os transcritos diferencialmente expressos, 17 deles correspondem a apenas uma das diferentes isoformas expressas pelo respectivo gene. Um exemplo é o gene *LDB3* que apresenta 6 isoformas diferentes, mas apenas a isoforma TCONS\_00049442 é diferencialmente expressa (Figura 1). A análise modular de enriquecimento funcional mostrou que os genes diferencialmente expressos estão enriquecidos para ligação de grupo heme, região extracelular, citocromo P450, classe E, grupos I e IV, ligação de íons de metal e atividade de homodimerização de proteína (P-valor corrigido para taxa de falso positivo < 0,05).



**Figura 1. Isoformas expressas do gene *LDB3*, em destaque a isoforma TCONS\_00049442 expressa diferencialmente entre os grupos de alta e baixa EA.**

As análises seguiram no sentido de identificar grupos de genes que apresentam perfil de expressão correlacionados e que, portanto, trabalham cooperativamente para uma dada função biológica ou estão sob o controle do mesmo conjunto de fatores de transcrição. A análise de co-expressão identificou 35 módulos de genes co-expressos e altamente conectados, mas apenas dois deles apresentaram correlação com eficiência alimentar e foram chamados de módulo Marrom e módulo Cinza (Figura 2). O módulo Marrom é composto por 155 genes e a análise modular de enriquecimento funcional mostrou que eles são, em sua maioria, constituintes estruturais de ribossomo e estão envolvidos na tradução de proteínas (P-valor corrigido para taxa de falso positivo  $< 0,05$ ). Já o módulo Cinza é formado por 34 genes com funções diversas que mostraram estar associadas às vias metabólicas spliceossoma, fagossoma, digestão e absorção de proteínas, degradação de lisina e adesão focal (P-valor corrigido para taxa de falso positivo  $< 0,05$ ). Genes centrais em ambos os módulos, que estão altamente conectados aos demais e apresentam alta correlação com a medida de CGR são considerados genes candidatos para a EA.

Cinco genes reguladores foram identificados, dois deles estão relacionados à regulação de um subgrupo de 24 genes pertencentes ao módulo Marrom e, da mesma forma, três deles estão relacionados a um subgrupo de 24 genes pertencentes ao módulo Cinza. Esses genes são fatores de transcrição, receptores de membrana ou estão relacionados ao controle de apoptose.



**Figura 2. Módulos Marrom e Cinza. Os nós representam os genes e os vértices o valor de correlação entre genes. Para facilitar a visualização, valores baixos de correlação não foram representados na figura.**

A análise de co-expressão diferencial foi realizada gerando duas subredes de genes, uma para alta EA e outra para baixa EA para determinar como a importância de um gene dentro da rede muda entre as duas condições, através da medida de conectividade. Genes altamente conectados têm supostamente papéis biológicos centrais na determinação de um fenótipo, já que podem influenciar diversos outros genes e, conseqüentemente, mudanças no comportamento desses genes podem estar estreitamente associadas à regulação da EA. Os valores gerados para conectividade diferencial variaram de 1, representando genes altamente conectados para baixa EA mas não para alta EA, até -1, representando genes altamente conectados para alta EA mas não para baixa EA, e foi possível determinar 400 genes diferencialmente conectados (conectividade diferencial absoluta  $> 0,60$ ). Para selecionar genes biologicamente relevantes, esse conjunto de genes foi reduzido para

os 12 genes que apresentaram diferenças no nível de expressão entre as duas condições ( $P < 0,05$ ). Todos os 12 genes são genes altamente conectados para alta EA, mas não para baixa EA. A análise de enriquecimento funcional mostrou que esses genes fazem parte de vias metabólicas diferentes, entre elas glicólise/gliconeogênese, metabolismo de frutose e manose, via das pentoses fosfato e cisticercose.

Vários são os mecanismos fisiológicos que provavelmente contribuem para a EA em bovinos [11] [12]. Neste trabalho, diferentes abordagens resultaram indicações de processos biológicos que podem ser importantes na determinação desse fenótipo, como por exemplo, o *splicing* alternativo, que leva a isoformas com implicações diferentes para a característica. Outros termos enriquecidos nas análises como fagocitose, ligação de heme e de íons de metal como o ferro, indicam participação importante da reciclagem tecidual. O grupamento heme também é parte importante do citocromo P450, uma hemoproteína responsável pela metabolização de uma série de enzimas imunológicas do organismo bem como metabolismo de xenobióticos. A função de síntese de proteínas identificada para o módulo Marrom e o metabolismo energético representado pelo enriquecimento de vias como glicólise, frutose, manose e pentoses fosfato, corrobora resultados encontrados anteriormente [13].

## Conclusão

As diferentes abordagens utilizadas para analisar expressão gênica de amostras de fígado de animais com alta e baixa eficiência alimentar apontaram reciclagem tecidual, metabolismo energético e de xenobióticos, controle de expressão gênica e síntese de proteínas como algumas das diferentes funções biológicas relacionadas a este fenótipo, que é sabidamente complexo e está sob o controle de diversos genes. Abordagens sistêmicas para análise de características complexas nos ajudam a entender melhor os processos fisiológicos relacionados a elas e nos guiam para continuar as investigações no sentido de identificar polimorfismos genéticos causais que nos ajudem na seleção de animais superiores, ou na adequação de técnicas de manejo e nutrição que aumentem a produtividade ao mesmo tempo que contribuam para a sustentabilidade da criação de gado de corte.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Proc. 2012/14792-3) e de estágio de pesquisa no exterior (Proc. 2014/00307-1) da aluna Pâmela A. Alexandre.

## Referências

- [1] Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., Tempio, G., 2013. Tackling Climate Change Through Livestock - A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities. Food and Agriculture Organization, Rome.
- [2] Arthur, P.F., Archer, J.A., Herd, R.M., 2004. Feed intake and efficiency in beef cattle: overview of recent Australian research and challenges for the future. Australian Journal of Experimental Agriculture, vol. 44, no. 5, p. 361.
- [3] Nkrumah, J.D., Okine, E.J. Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., Moore, S.S., 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding

behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *Journal of animal science*, vol. 84, no. 1, pp. 145–53.

[4] Herd, R.M., Arthur, P.F., 2009. Physiological basis for residual feed intake. *Journal of Animal Science*, vol. 87, no. 14 Suppl, pp. E64–71.

[5] Fuller, T.F., Ghazalpour, A., Aten, J.E., Drake, T., Lusk, A.J., Horvath, S., 2007. Weighted gene coexpression network analysis strategies applied to mouse weight. *Mammalian Genome*, vol. 18, no. 6–7, pp. 463–72.

[6] Berry, D.P., Crowley, J.J., 2012. Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. *Journal of Animal Science*, vol. 90, no. 1, pp. 109–15.

[7] Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, vol. 7, no. 3, pp. 562–78.

[8] Langfelder, P., Horvath, S., 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, vol. 9, p. 559.

[9] Segal, E., Shapira, M., Regev, A., Pe'er, D., Botstein, D., Koller, D., Friedman, N., 2003. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nature Genetics*, vol. 34, no. 2, pp. 166–76.

[10] Michoel, T., Maere, S., Bonnet, E., Joshi, A., Saeys, Y., Van den Bulcke, T., Van Leemput, K., van Remortel, P., Kuiper, M., Marchal, K., Van de Peer, Y., 2007. Validating module network learning algorithms using simulated data. *BMC Bioinformatics*, vol. 8 Suppl 2, no. Suppl 2, p. S5.

[11] Richardson, E.C., Herd, R.M., Archer, J.A., Arthur, P.F., 2004. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 44, no. 5, p. 441.

[12] Herd, R.M., Oddy, V.H., Richardson, E.C., 2004. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 1. Review of potential mechanisms. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, vol. 44, no. 5, p. 423.

[13] Chen, Y., Gondro, C., Quinn, K., Herd, R.M., Parnell, P.F., Vanselow, B., 2011. Global gene expression profiling reveals genes expressed differentially in cattle with high and low residual feed intake. *Animal genetics*, vol. 42, no. 5, pp. 475–90.