

# GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM MÚSCULO DE NOVILHOS NELORE DIVERGENTES PARA EFICIÊNCIA PARCIAL DE CRESCIMENTO

## *DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN SKELETAL MUSCLE OF NELORE STEERS DIVERGENT FOR PARTIAL EFFICIENCY OF GROWTH*

Juliana Virginio da Silva<sup>(1)</sup>

Polyana Cristiane Tizioto<sup>(2)</sup>

Priscila Silva Neubern Oliveira<sup>(2)</sup>

Juliana Afonso<sup>(3)</sup>

Luiz Lehmann Coutinho<sup>(4)</sup>

Luciana Correia de Almeida Regitano<sup>(5)</sup>

### Resumo

A seleção de animais com alta eficiência alimentar pode resultar em redução nos custos de produção devido ao aumento na eficiência da cadeia produtiva. Uma das medidas de eficiência alimentar é a eficiência parcial de crescimento. Obter informações acerca dos genes que influenciam essa característica é importante a fim de se obter informações adicionais sobre os processos biológicos subjacentes à variação da eficiência alimentar. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi verificar o perfil de expressão gênica do músculo *Longissimus dorsi* de animais da raça Nelore divergentes quanto à eficiência parcial de crescimento utilizando a abordagem de RNA-seq. A análise da expressão gênica diferencial realizada entre os grupos positivo (eficiente) e negativo (ineficiente) identificou 141 genes diferencialmente expressos anotados, dos quais 125 genes foram *up-regulated* no grupo eficiente. A análise de anotação funcional mostrou que os genes diferencialmente expressos estão envolvidos em processos biológicos, tais como biossíntese de carboidratos e resposta inflamatória, os quais influenciam a característica em estudo. A partir dessa análise funcional foi possível apontar prováveis genes candidatos funcionais que deverão ser utilizados em estudos posteriores visando identificar variantes funcionais associadas à eficiência alimentar.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*. Eficiência alimentar. RNA-seq.

### Abstract

*The selection of more efficient animals may result in higher profitability of the herd due to an increase of efficiency of the production process. One measure of feed efficiency is the Partial Efficiency Growth. Information about the genes influencing the partial efficiency growth is important in order to provide additional information about biological processes that influence feed efficiency variation. Therefore, our objective was to determine the gene*

<sup>1</sup>Aluna de graduação em Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; juliana-virginio@bol.com.br; <sup>2</sup>Aluna de pós-doc da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; <sup>3</sup>Aluna de doutorado em Genética e Evolução, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP; <sup>4</sup>Professor do Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP; <sup>5</sup>Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

*expression profile of the Longissimus dorsi muscle of Nelore animals with divergent phenotypes for partial efficiency growth using the approach of RNA-Seq. The differential gene expression analysis between high (efficient) and low (inefficient) groups identified 141 differentially expressed genes (DEGs) that are annotated, being 125 genes up regulated in efficient group. Functional analysis showed that DEGs are involved in functions such as carbohydrate biosynthesis, and inflammatory response. From this functional analysis, it was possible to point more likely candidate genes that can be useful in posterior studies that aim to identify functional variants associated with feed efficiency.*

**Keywords:** *Bos indicus. Feed efficiency. RNA-Seq.*

## 1. Introdução

A eficiência da produção do rebanho está estritamente relacionada com a eficiência alimentar (KOCH *et al.*, 1963). Dessa maneira, a seleção de animais mais eficientes deve resultar em redução nos custos de produção devido ao aumento na eficiência do processo produtivo. Uma das medidas de eficiência alimentar é a Eficiência Parcial de Crescimento (EPC), calculada como sendo a razão entre o ganho de peso médio diário e a diferença entre o consumo de matéria seca médio diário necessário para manutenção (ARTHUR *et al.*, 2001). Animais que apresentam maior índice de EPC apresentam um ganho de peso médio diário maior com menor ingestão de matéria seca, ou seja, são mais eficientes.

Obter informações acerca dos genes que influenciam a EPC se faz necessário a fim de entender melhor os processos biológicos e vias metabólicas que influenciam características relacionadas a eficiência alimentar. Sendo assim, nosso objetivo foi verificar diferenças no perfil de expressão gênica do músculo *Longissimus dorsi* (LD) de animais da raça Nelore divergentes para EPC, para identificar genes candidatos funcionais que influenciam esta característica.

## 2. Material e Métodos

Os 200 animais utilizados para amostrar dois grupos extremos (n=10) para EPC, são provenientes de uma população de meios-irmãos composta de 800 animais (TIZIOTO *et al.*, 2013). Os novilhos foram mantidos em confinamento na EMBRAPA Pecuária Sudeste (São Carlos, São Paulo, Brasil) com acesso *ad libitum* a alimento e água como descrito por Oliveira *et al.*, (2014). As medidas de consumo diário de alimento foram feitas ao longo de 70 dias e o peso corporal medido a cada 14 dias. A eficiência parcial de crescimento (EPC, em kg/kg) foi calculada como descrito por Zinn e Shen (1998). Os valores genéticos genômicos (GEBV) foram calculados em um estudo prévio de associação genômica ampla (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Com base nos GEBVs para EPC foram selecionados dois grupos extremos,

contendo 10 indivíduos cada, formando assim os grupos EPC positivo e negativo. Amostras do músculo LD desses 20 animais tiveram seu mRNA extraído com Trizol (Invitrogen®). A quantificação e avaliação da integridade bem como o preparo das bibliotecas de mRNA e sequenciamento, realizado pelo laboratório de biotecnologia animal da ESALQ, foram realizados conforme descrito por Tizioto *et al.* (2015).

Foram produzidos *Paired-end reads* de 2X 100 pb. Após a verificação da qualidade dos dados pelo programa FastqQC, adaptadores e *reads* com baixa qualidade foram removidos usando o programa SeqClean. O *pipeline Tuxedo suite* (TRAPNEEL *et al.*, 2012), que inclui os programas TopHat (v2.0.6), Cufflinks (v2.0.2), Cuffmerge (v2.0.2), Cuffdiff (v2.0.2) e cummeRbund, foi empregado para realizar as demais análises conforme descritas por Tizioto *et al.* (2015). O valor de *False Discovery Rate* (FDR)  $\leq 0,05$  foi adotado para considerar o gene como diferencialmente expresso. O programa DAVID (*Database for annotation, Visualization and Integrated Discovery*) v6.7 (DENNIS *et al.*, 2003) foi utilizado para análise de enriquecimento funcional a fim de identificar vias e processos biológicos nos quais os GDE estão envolvidos.

### 3. Resultados e Discussão

A análise da expressão diferencial de genes entre os grupos EPC positivo (eficiente) e EPC negativo (ineficiente) identificou 162 GDEs (q-valor  $\leq 0,05$ ), dos quais 141 são anotados. Desses, 125 genes foram classificados como *up-regulated* no grupo EPC positivo (eficiente).

A análise funcional mostrou que alguns dos GDEs *up-regulated* no grupo eficiente, tais quais, *ARID5B*, *B3GNT2*, *BMP5*, *CALCRL*, *CD302*, *CR2*, *DGKH*, *FBN1*, *FOXO1*, *FRS2*, *HIF1A*, *IL1RAP*, *IL6ST*, *JAK2*, *KITLG*, *KRAS*, *MAP1B*, *MAP3K2*, *NOX4*, *POSTN*, *PRKAG3*, *PTEN*, *RCAN1*, *RELN*, *RICTOR*, *SMAD5*, *TGFBR3*, *TIPARP*, *TNFAIP6*, *TWSG1* e *UGDH*, apresentam relação com a ativação da proteína quinase, regulação da atividade catalítica, regulação da via BMP, regulação da fosforilação, biossíntese de carboidrato, estímulo hormonal, desenvolvimento esquelético, resposta inflamatória e desenvolvimento do tecido ósseo.

Gustafson (2013) relata em seu trabalho que a obesidade é um estado inflamatório pois o tecido adiposo branco produz uma série de citocinas (adipocinas) que estão envolvidas no processo inflamatório. Dentre essas adipocinas podemos citar a IL-6ST, uma mediadora da resposta anti-inflamatória da adiponectina (PRADO, 2008) cujo gene foi encontrado em nosso estudo como *up-regulated* no grupo eficiente. O gene *CISH* (*Cytokine-inducible SH2-*

*containing protein*), *dow-regulated* no grupo eficiente, está relacionado com supressão da sinalização de citocinas (MIAH; BAE, 2013). Outra característica da obesidade é a resistência do tecido adiposo à insulina. (GUSTAFSON, 2013). Os tecidos adiposos branco e marrom são chamados de tecidos sensíveis à insulina. A via de sinalização da insulina é mediada por vários precursores, dentre eles encontra-se a proteína JAK2, cujo gene *JAK2* foi encontrado nesse estudo como *up-regulated* no grupo eficiente (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). O gene *ARRDC3* (*Arrestin domain-containing protein 3*), encontrado em nesse estudo como *up-regulated* no grupo eficiente, possui relação com a obesidade (PATWARI *et al.*, 2011).

Dois GDEs, *LIN7C* e *ADAM12*, relacionados, respectivamente, com obesidade em humanos (CHEUNG *et al.*, 2010) e envolvimento na regulação da miogênese e adipogênese em bovinos de corte (COLES; WADESON, 2014), estão localizados em regiões de loci de características quantitativas (QTL, do inglês *Quantitative Trait Loci*) previamente definidas no estudo de associação genômica ampla realizado por Oliveira *et al.* (2014) com a mesma população Nelore utilizada no presente estudo

#### 4. Conclusão

Os GDEs identificados no presente estudo estão envolvidos em processos biológicos, tais como a biossíntese de carboidratos e resposta inflamatória, os quais influenciam a EPC. Além disso, dois desses genes estão localizados em regiões de QTL para eficiência alimentar nessa população. Esses resultados auxiliam na compreensão dos mecanismos biológicos que regulam a eficiência alimentar, além de serem úteis em estudos futuros que visem identificar variantes funcionais relacionados à característica em estudo.

#### 5. Apoio Financeiro

Esse trabalho teve o apoio financeiro da FAPESP processo: 2012/23638-8

#### Referências

ARTHUR, P.F., *et al.* **Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle.** J Anim Sci, v. 79, p.2805–2811, 2001.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. **Vias de Sinalização da Insulina.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

CHEUNG, C. Y. Y. *et al.* **Obesity Susceptibility Genetic Variants Identified from Recent**

**Genome-Wide Association Studies: Implications in a Chinese Population.** Endocrine Research, v. 95, p. 1395–1403, 2010.

COLES, C.; WADESON, J. **A disintegrin and metalloprotease-12 is type I myofiber specific in Bos taurus and Bos indicus cattle.** J Anim, p. 1473–1483, 2014.

DE OLIVEIRA, P. *et al.* **Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle.** BMC genomics, v. 15, n. 1, p. 100, 2014.

DENNIS, G. J. *et al.* **DAVID : Database for Annotation , Visualization , and Integrated.** Genome Biology, v. 4, n. 9, 2003.

DO PRADO, W. L. *et al.* **Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 15, n. 5, p. 378–383, 2009.

GUSTAFSON, B. *et al.* **Restricted Adipogenesis in Hypertrophic Obesity The Role of WISP2, WNT, and BMP4.** Diabetes Journals, v. 62, p. 2997–3004, 2013.

KOCH, R.M., *et al.* **Efficiency of feed use in beef cattle.** J Anim Sci, v.22, p. 486–494, 1963

MIAH, M.A; BAE, Y. **Regulation of DC development and DC-mediated T-cell immunity via CISH.** Oncoimmunology, Coreia do Sul, v. 2, n. 3, p.8-9, mar. 2013.

PATWARI, P. *et al.* **The arrestin domain-containing 3 protein regulates body mass and energy expenditure.** Cell Metabolism, v. 14, n. 5, p. 671–683, 2011.

POWIS, R. *et al.* **Increased levels of UCHL1 are a compensatory response to disrupted ubiquitin homeostasis in spinal muscular atrophy and do not represent a viable therapeutic target.** Neuropathology and Applied Neurobiology, v. 40, n. 2014, p. 873–887, 2014.

TIZIOTO, P. C. *et al.* **Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes.** BMC genomics, v. 16, n. 1, p. 242, 2015.

TIZIOTO, P. C. *et al.* **Updates on Mapping Quantitative Trait Loci Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle.** Physiol Genomics, v. 25, p. 1012–1020, 2013.

TRAPNELL, C. *et al.* **Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks.** Nature Biotechnology, v. 31, n. 1, p. 46–53, 2012.

ZINN, A., SHEN, Y. A. **An evaluation of ruminal degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves.** J Anim Sci., v.76, p.1280-1289, 1998.