

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA CARACTERÍSTICA DE EFICIÊNCIA
ALIMENTAR EM TECIDO HEPÁTICO DE FÊMEAS GIROLANDO F1 EM
LACTAÇÃO**

Juiz de Fora
2024

Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza

**Análise da expressão gênica para característica de eficiência alimentar em
tecido hepático de fêmeas Girolando F1 em lactação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética e Biotecnologia.

Dr. Marco Antonio Machado (Orientador)

Dra. Mariana Magalhães Campos (Coorientadora)

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ribeiro de Lima Reis Faza, Daniele.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA CARACTERÍSTICA DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR EM TECIDO HEPÁTICO DE FÊMEAS GIROLANDO F1 EM LACTAÇÃO / Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza. -- 2024.

61 p. : il.

Orientador: Marco Antonio Machado

Coorientadora: Mariana Magalhães Campos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. consumo alimentar residual. 2. gado de leite. 3. RNA-seq. I. Machado, Marco Antonio, orient. II. Magalhães Campos, Mariana, coorient. III. Título.

Daniele Ribeiro de Lima Reis Faza

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PARA CARACTERÍSTICA DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR EM TECIDO HEPÁTICO DE FÊMEAS
GIROLANDO F1 EM LACTAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética & Biotecnologia.

Aprovada em 04 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Machado - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Gado de Leite

Prof. Dr. Lucas Lima Verardo

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Prof. Dr. Mateus Pies Gionbelli

Universidade Federal de Lavras - UFLA

Juiz de Fora, 15/02/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Mateus Pies Gionbelli**, **Usuário Externo**, em 06/03/2024, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Machado**, **Usuário Externo**, em 06/03/2024, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Lima Verardo**, **Usuário Externo**, em 07/03/2024, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1705258** e o código CRC **27A702EF**.

Dedico este trabalho aos meus filhos, Beatriz e Eduardo, e ao meu esposo, Thiago. A vida é mais bonita com vocês ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFJF, especialmente aos professores do PPGCBIO, que contribuíram para meu crescimento profissional. Agradeço também à FAPEMIG pelo financiamento do projeto e à Embrapa Gado de Leite, onde todo o experimento pode ser realizado, com toda estrutura necessária.

Agradeço aos meus pais, Aurea e Hélio, que sempre me apoiaram e me guiaram para o caminho dos estudos, e nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor educação que podiam me fornecer. Agradeço também a minha irmã, Clarice, pelo companheirismo e carinho de sempre.

Ao meu marido Thiago, pelo amor, dedicação e compreensão, que mesmo nos momentos difíceis, sempre me fez acreditar no meu melhor. Agradeço aos meus filhos, Beatriz e Eduardo, por me trazerem alegria e amor, renovando sempre minhas energias e me fazendo sentir muito amada e especial.

Gostaria de agradecer também aos meus orientadores, pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, professor Dr. Marco Antonio Machado e Dra. Mariana Magalhães Campos, pelo apoio, ajuda, confiança e ensinamentos. Aprendi e cresci muito em todos estes anos de parceria.

Às pesquisadoras da Embrapa Gado de Leite, Dra. Ana Luisa Azevedo, Dra. Emanuelle Gaspar, Dra. Marta Martins e Dra. Wanessa Araújo, pelas discussões e ensinamentos. Ao analista Robert Domingues, à Dra. Ana Luiza Franco e ao Dr. Hyago Passe pelas trocas e contribuições.

Agradeço a todo pessoal do laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, pelo companheirismo, pelas conversas e risadas.

Esta trajetória só foi possível por todas essas pessoas incríveis que estiveram ao meu lado.

RESUMO

A seleção de bovinos com alta eficiência alimentar (EA) é um objetivo promissor na pecuária de corte e leite, contribuindo para aprimorar a lucratividade e mitigar impactos ambientais nos sistemas de produção. Uma abordagem para investigar os mecanismos subjacentes à EA envolve a análise do perfil de expressão gênica em tecido hepático. No presente estudo, o consumo alimentar residual (CAR) foi utilizado como métrica de EA para selecionar 10 vacas primíparas em lactação da raça Girolando F1, divididas em dois grupos: alta EA (5); baixa EA (5). Biópsias hepáticas foram usadas para avaliação de expressão gênica diferencial por RNA-seq, com *reads* do tipo *paired-end* de 150bp. Foram geradas 74.967.988 *reads* de dado bruto por amostra e 20.787 genes conhecidos foram mapeados de acordo com o genoma bovino de referência. A comparação dos grupos de alta e baixa eficiência alimentar revelou 149 genes diferencialmente expressos (DEGs) significativos, sendo 41 regulados positivamente e 109 negativamente, no grupo de baixa eficiência. Dentre os DEGs, alguns se destacaram como possíveis genes candidatos associados à EA, como o *DLK1*, *CACNG4*, *SCL2A12*, *SCL26A4*, *DUOX2* e *DUOXA2*. As análises de enriquecimento funcional mostraram que os DEGs participam de certas vias, que possivelmente influenciam a EA, como a regulação negativa da migração de leucócitos, a regulação da atividade do canal de cálcio, a regulação negativa da migração e adesão celular, organização da matriz extracelular (MEC) e síntese de hormônio tireoidiano. Foi destacado também a influência da composição da MEC e o papel do sistema imunológico na EA. Este trabalho forneceu novas descobertas e perspectivas sobre a base genética da eficiência alimentar em bovinos leiteiros. Alguns mecanismos previamente identificados foram apoiados e novas vias de controle da eficiência alimentar em bovinos Girolando F1 foram descobertas. Os resultados ampliaram a compreensão dos mecanismos relacionados à EA em bovinos de leite, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de seleção visando aprimorar a característica.

Palavras-chave: consumo alimentar residual; gado de leite; RNA-seq.

ABSTRACT

The selection of cattle with high feed efficiency (FE) represents a valuable goal in beef and dairy farming, contributing to improving profitability and mitigating environmental impacts in production systems. An approach to investigate the underlying mechanisms of FE involves analyzing the gene expression profile in the hepatic tissue. In this study, residual feed intake (RFI) was used as a metric for FE to select 10 primiparous lactating cows of the Girolando F1 breed, divided into two groups: high feed efficiency (5); low feed efficiency (5). Hepatic biopsies were used for the evaluation of differential gene expression through RNA-seq, with paired-end reads of 150bp. A total of 74,967,988 raw reads per sample were generated, and 20,787 known genes were mapped accordingly to the bovine reference genome. The comparison of high and low feed efficiency groups revealed 149 significantly differentially expressed genes (DEGs), with 41 up-regulated and 109 down-regulated in the low-efficiency group. Among the DEGs, some stood out as potential candidate genes, including *DLK1*, *CACNG4*, *SCL2A12*, *SCL26A4*, *DUOX2*, and *DUOXA2*. Functional enrichment analyses showed the role of these DEGs in certain pathways that potentially influence FE, such as the negative regulation of leukocyte migration, regulation of calcium channel activity, negative regulation of cell migration and adhesion, extracellular matrix (ECM) organization, and thyroid hormone synthesis. The influence of ECM composition and the role of the immune system in FE were also highlighted. This work provided new findings and perspectives on the genetic basis of feed efficiency in dairy cattle. Some previously identified mechanisms were supported and new pathways of feed efficiency control in Girolando F1 cattle were discovered. These results enhanced the understanding of the mechanisms related to FE in dairy cattle, contributing to the development of selection strategies to improve this trait.

Keywords: residual feed intake; dairy cattle; RNA-seq

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Representação de um fígado sadio: principais células, canalículo biliar, espaço de Disse e sinusoide.....	20
Figura 2	- Fluxograma de análises das <i>reads</i> para estudo da expressão gênica diferencial e ontologia gênica.....	30
Figura 3	- Gráfico com o índice de qualidade das bases baseado no Phred Score, após RNA-Seq do tipo <i>paired-end</i> 2 x 150 bp de biópsias hepáticas de vacas Girolando em lactação com diferenças quanto a eficiência alimentar. Resultado extraído após análise no programa FastQC (versão 0.11.9).	32
Figura 4	- Conteúdo de N em porcentagem, resultado da amostra D4545 1 como exemplo para o conjunto de amostras de RNA de fígado de fêmeas Girolando F1 em lactação com diferentes valores de CAR, após RNA-Seq do tipo <i>paired-end</i> 2 x 150 bp. O eixo X representa a posição da base, que varia de 1 a 150 e o eixo Y mostra a porcentagem de bases lidas como N.....	33
Figura 5	- <i>Volcano plot</i> representando os DEGs detectados. Os pontos vermelhos indicam DEGs de fígado de vacas em lactação Girolando F1 com eficiência alimentar contrastante AE x BE. Do lado esquerdo estão os genes regulados negativamente (<i>down-regulated</i>) e do lado direito os regulados positivamente (<i>up-regulated</i>) no grupo baixa eficiência.....	37
Figura 6	- Gráfico <i>heat map</i> destacando os 21 genes diferencialmente expressos ($p\text{-adj} < 0,05$), por RNA-Seq, em fígado de fêmeas lactantes Girolando F1, com característica de eficiência alimentar contrastantes (AE x BE).	38
Figura 7	- Rede de interação de proteínas a partir dos genes diferencialmente expressos, encontrados por RNA-Seq, no fígado de vacas Girolando F1 em lactação com eficiência alimentar contrastantes.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Divisão das fêmeas primíparas de Girolando F1 nos grupos de alta eficiência (AE) e baixa eficiência (BE) em relação aos valores de consumo residual alimentar (CAR).	26
Tabela 2	- Resumo da qualidade dos dados brutos obtidos após o RNA-seq de biópsias hepáticas de fêmeas Girolando F1, em lactação, apresentando valores de eficiência alimentar divergentes. Erro: taxa de erro de bases em %; Q20 e Q30: percentual de bases com valor Phred > 20 ou 30; GC: percentual de bases G e C.	33
Tabela 3	- Lista dos genes diferencialmente expressos em fígado de fêmeas Girolando F1 em lactação, com valores contrastantes de eficiência alimentar (AE x BE), obtidos por análise de RNA-Seq.....	34
Tabela 4	- Análise de enriquecimento funcional: Processos biológicos, componentes celulares, vias e localizações subcelulares enriquecidas, de acordo com os DEGs encontrados.....	40

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C	Graus Celcius
µL	Microlitro
AE	Alta Eficiência Alimentar
AFRC	Agricultural and Food Research Council
BE	Baixa Eficiência Alimentar
bp	“Base Pair”, Pares de Bases
CAR	Consumo Alimentar Residual
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar a Fita de Ácido Ribonucleico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH ₄	Gás Metano
DEGs	“Differential Expressed Genes”; Genes Diferencialmente Expressos
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”; Ácido Desoxirribonucleico
EA	Eficiência Alimentar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eQTL	“Expression Quantitative Trait Loci”; Locus de Característica Quantitativa de expressão
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
Gb	Gigabase
GO	“Gene Ontology”, Ontologia Gênica
GT	“Glucose Transporter”, Transportador de Glicose
GWAS	Estudo de Associação Genômica Amplo
h	Hora
INRA	Institut National De la Recherche Agronomique
lncRNA	RNA Longo Não Codificante
KEGG	“Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes”, Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	RNA Mensageiro
ng	Nanogramas
NGS	"Next Generation Sequencing"; Sequenciamento de Nova Geração
NRC	National Research Council
p-adj	Adjusted p Value, Valor de p Ajustado
PCR	"Polymerase Chain Reaction", Reação em Cadeia de Polimerase
PMGG	Programa de Melhoramento Genético do Girolando
PPI	"Protein-Protein Interaction Networks", Rede de Interação de Proteínas
RIN	"RNA Integrity Number", Número de Integridade do RNA
RNA	"Ribonucleic Acid", Ácido Ribonucleico
RNA-seq	"RNA Sequencing", Sequenciamento de RNA
rRNA	RNA Ribossomal
SNP	"Single Nucleotide Polymorphism"; Polimorfismo de Nucleotídeo Único
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina ou Tiroxina
TP	Teste de Progênie
tRNA	RNA Transportador

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. A RAÇA GIROLANDO	16
2.2. EFICIÊNCIA ALIMENTAR.....	17
2.3. TRANSCRIPTOMA HEPÁTICO	19
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. OBJETIVO GERAL	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	25
4.2. COLETA DE BIÓPSIA HEPÁTICA.....	26
4.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	26
4.4. SEQUENCIAMENTO DO RNA	27
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E DE BIOINFORMÁTICA	27
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Em um cenário mundial, o setor pecuário vem enfrentando grandes desafios, pois ao mesmo tempo em que necessita aumentar a produção dos alimentos devido ao crescimento da população mundial, precisa reduzir os impactos ambientais e conseguir maior sustentabilidade do setor (Ranganathan et al., 2016). Espera-se que a demanda global por produtos alimentícios de origem animal aumente em 20% até 2050, como uma fonte essencial de nutrientes, carne, ovos e produtos lácteos desempenharão um papel crucial para garantir a segurança alimentar, melhorar a nutrição e manter dietas saudáveis (FAO, 2023).

Os produtores enfrentam desafios que reduzem as margens de lucro, como a escassez de mão de obra no campo, aumento de salários e de custos dos insumos (Llanos, Astigarraga & Picasso, 2018). Já os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto à segurança do alimento, ao bem-estar animal e à redução dos impactos ambientais. O aumento da produtividade dos rebanhos parece ser o melhor caminho a ser adotado para produzir maior quantidade de alimento, enquanto diminuem os custos de produção e os prejuízos ao meio ambiente (Vandehaar et al., 2016).

Em 2022, o Brasil foi o quinto maior produtor de leite mundial (FAO, 2022). Embora venha apresentando crescimento em produtividade de leite, o Brasil ainda se encontra muito aquém de outros países. A produtividade de leite do Brasil é de 2.192 litros/vaca ordenhada/ano, enquanto que nos Estados Unidos, país com maior produtividade, esse valor passa de 10.000 litros/vaca ordenhada/ano (EMBRAPA, 2022).

A seleção de vacas leiteiras mais eficientes no aproveitamento do alimento ingerido é uma estratégia para aumento da produtividade brasileira de leite. Essas vacas destacam-se como as que consomem menos para atingir o mesmo patamar de produção, ou seja, são mais eficientes na conversão da matéria seca consumida em leite produzido. O uso destes animais significa, portanto, um menor custo com alimentação, maior produção por área, menor quantidade de dejetos produzidos, menor emissão de metano entérico, reduzido impacto ambiental e maior rentabilidade do sistema.

No Brasil, a seleção para eficiência alimentar (EA) vem sendo abordada somente nos últimos anos e o maior número de pesquisas está restrito à pecuária de

corte. Na literatura internacional relacionada à EA, a maior parte dos estudos foi desenvolvida com animais de raças puras especializadas em leite e adaptadas às condições de clima temperado, sendo que quase sua totalidade foi realizada com vacas da raça Holandesa. Dessa forma, há poucos relatos científicos sobre a EA em outras raças, mesmo que sejam europeias, como Jersey e Nordic Red Dairy, por exemplo (Liinamo et al., 2015). Logo, estudar a EA e entender os mecanismos genéticos da característica em uma raça sintética (*Bos taurus x Bos indicus*), como é a raça Girolando, e ainda submetida ao clima tropical, configura em uma abordagem muito relevante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A RAÇA GIROLANDO

A raça girolando é uma raça sintética, desenvolvida no Brasil a partir de 1940 como resultado do cruzamento entre as raças Gir e Holandesa. Tal cruzamento tinha como objetivo gerar animais que aliassem a alta capacidade de produção de leite, precocidade e mansidão do gado da raça Holandesa (*Bos taurus indicus*) à rusticidade da raça Gir (*Bos taurus indicus*), a fim de conferir a produtores brasileiros condição de produzir leite em qualquer região do país (Canaza-Cayo et al., 2014). Entre as características inerentes à raça, destacam-se a boa produtividade, alta fertilidade e vigor, constituindo-se em uma composição racial importante para a pecuária nacional (Delgado et al., 2012).

A Portaria 79 de 7 de fevereiro de 1996 do então Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), oficializou a criação da raça, com intuito de obter e fixar uma raça leiteira tropical nacional. A Associação Brasileira de Criadores de Girolando, criada com a finalidade de aprimorar a criação da raça, é a entidade oficial responsável pelo registro genealógico dos animais.

O Teste de Progênie (TP) da raça Girolando foi iniciado em 1997, como resultado de uma parceria da Girolando com a Embrapa Gado de Leite. Ele impulsionou a intensidade de seleção dos animais, permitindo que criadores passassem a investir em melhoramento genético e em novas técnicas de reprodução e manejo. Como resultado, a raça ganhou reconhecimento internacional, principalmente por atender às demandas de regiões tropicais do planeta e atender tanto grandes quanto pequenos produtores (Silva et al., 2022). O Programa de Melhoramento Genético do Girolando (PMGG), implantado em 2007, tem como objetivos principais identificar indivíduos geneticamente superiores, multiplicar a genética de forma orientada, realizar avaliação genética de características economicamente importantes e promover a sustentabilidade da atividade leiteira (Silva et al., 2023).

No Brasil, a raça Girolando é a mais utilizada na produção de leite, e também a que mais cresce na comercialização de sêmen, chegando à marca de 920.848 doses produzidas no ano de 2021. Esta raça é bastante utilizada no país, e cerca de 80% do leite produzido provém de animais Girolando, ou de animais com composição racial

entre as raças Holandesa e Gir, que são capazes de manter bom nível de produção em diferentes sistemas de manejo e de condições climáticas (Silva et al., 2023). Com o trabalho do PMGG, a produção de leite cresceu mais de 60% num período de 20 anos (Silva et al., 2022). Devido a estes e a outros fatores, a raça Girolando vem ganhando cada vez mais reconhecimento nacional e internacional, tornando-se, desta forma, a preferida para produção de leite nas regiões tropicais (Silva et al., 2023).

Desde 2016, o PMGG utiliza as informações genômicas de diferentes formas, como corrigir possíveis erros de pedigree e fornecer aos criadores os valores genômicos de tourinhos candidatos ao pré TP. A partir de 2017, a equipe do PMGG passou a usar os genótipos dos animais, de forma integrada com os registros de produção e de genealogia, para a predição dos valores genéticos das vacas participantes do TP, obtendo-se assim os valores genéticos genômicos. Essa metodologia foi usada para touros a partir de 2019, e com isso, foram obtidos valores genéticos mais acurados, especialmente para os animais jovens, incrementando significativamente os ganhos genéticos na raça (Silva et al., 2023).

2.2. EFICIÊNCIA ALIMENTAR

A eficiência alimentar em bovinos leiteiros pode ser definida como a eficiência na conversão dos nutrientes do alimento em leite e peso corporal (Lu et al., 2018). Como a alimentação pode representar aproximadamente 50% dos custos totais e o leite vendido é o principal componente da receita em um sistema leiteiro, a EA animal tem um grande impacto na sustentabilidade dos sistemas de produção de leite (USDA-NASS, 2012).

A EA em bovinos leiteiros na América do Norte duplicou nos últimos 50 anos, em resposta à seleção genética de vacas de maior produtividade, pois esses animais convertem mais energia alimentar para a produção de leite que para manutenção (Vandeharr, 2014). A EA é regulada principalmente por um conjunto de processos metabólicos endógenos e pela habilidade do animal em absorver eficientemente os nutrientes.

O consumo alimentar residual (CAR) é a métrica para mensuração da EA de maior destaque, pois permite identificar os fenótipos produtivos de maior interesse. Nas vacas em lactação, o CAR é estimado pela diferença entre o consumo de alimento

real (em matéria seca ou energia), medido durante longo período controlado ou vários períodos curtos, e o consumo esperado de alimento (em matéria seca ou energia) (Herd & Arthur, 2009).

A estimativa do consumo esperado pode ser feita com base na energia ou matéria seca necessária para atender as demandas de manutenção, produção de leite e gestação (durante o período produtivo) do animal. Uma forma de prever a ingestão esperada é por meio da utilização de normas e padrões de alimentação conhecidos. Os sistemas energéticos mais adotados atualmente são os da América do Norte, [National Research Council (NRC), 2001], França [Institut National De la Recherche Agronomique (INRA), 2018], e do Reino Unido [Agricultural and Food Research Council (AFRC), 1993]. Outro meio de estimar a ingestão esperada é por modelo matemático de regressão, que utiliza dados da alimentação real de um ensaio, realizado em grupo de animais contemporâneos (Arthur et al, 2001).

A medição precisa do consumo alimentar é essencial para quantificar a EA, porém nem sempre ela é de fácil obtenção. É necessário um sistema que demande estrutura adequada e que possua um custo relativamente elevado. Os sistemas automatizados de monitoramento de alimentação são a forma mais comum de mensurar a ingestão de alimentos, como, por exemplo, que usam identificação por radiofrequência, para registrar a ingestão individual dos animais. Alguns sistemas também registram outros eventos, como o número de episódios de ingestão por dia, o tempo gasto e o número de visitas no alimentador. Sistemas de bebedouros acoplados a balanças eletrônicas também permitem que o animal seja pesado diversas vezes ao dia, como o bebedouro automático com plataforma de pesagem corporal.

Na interpretação dos resultados, os animais com CAR negativo são mais eficientes (consumo observado menor que o esperado) e os animais com CAR positivo menos eficientes (consumo observado maior que o estimado). O CAR vem sendo aplicado com sucesso em frangos, suínos e gado de corte e tem se tornado cada vez mais importante para estudo da EA em gado de leite (Berry & Crowley, 2013; Connor, 2015).

Em ruminantes, o CAR é geneticamente e fortemente correlacionado com as emissões de metano (CH_4) (de Haas et al., 2011), indicando que a seleção para menor CAR tem potencial para reduzir as emissões de CH_4 . A digestão de carboidratos no estômago de ruminantes é caracterizada por diversas vias de fermentação que

resultam na produção de CH₄ como perda de energia. Assim, a menor produção de CH₄, em relação ao consumo de energia ou produção de leite, representa maior eficiência energética (Yan et al., 2010). Além de sua importância energética nutricional, o CH₄ liberado da fermentação ruminal contribui para o aumento global das emissões atmosféricas de gases de efeito estufa (Herrero et al., 2016).

A variação na EA entre animais é atribuída a diferenças nos processos biológicos. Em ruminantes, acredita-se que os principais processos biológicos que contribuem para a variação da EA são: consumo de alimentos, digestibilidade, metabolismo, atividade e termorregulação, sendo o metabolismo o fator que mais influencia a característica. Mais estudos precisam ser realizados para melhor compreensão de quais genes e/ou vias metabólicas estão relacionadas aos animais mais eficientes, principalmente estudos do transcriptoma hepático.

2.3. TRANSCRIPTOMA HEPÁTICO

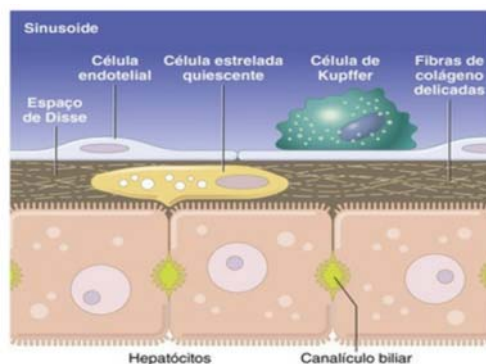
O fígado é um órgão com funções endócrinas e exócrinas. Entre as funções endócrinas, estão a secreção de vários hormônios como o fator de crescimento semelhante à insulina, conhecido como somatomedina, e a eritropoetina. Adicionalmente, secreta a maioria das proteínas plasmáticas, como: a albumina, o angiotensinogênio, fatores de coagulação, proteínas carreadoras de ferro, proteínas do sistema complemento e proteínas que participam do transporte plasmático de colesterol e de triglicerídeos. Como função exócrina, o fígado é responsável pela secreção da bile (Oriá & Brito, 2016), sendo um órgão fisiológico e metabólico central dos animais ruminantes. É responsável ainda, pela modulação e distribuição de nutrientes aos tecidos e órgãos periféricos para fins de manutenção e produção, como deposição muscular em bovinos de corte ou produção de leite em bovinos leiteiros (Seal & Reynolds, 1993). O fígado também está envolvido em importantes funções metabólicas e fisiológicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas, minerais e vitaminas, além de atuar fortemente na área imunológica, bem como no catabolismo de hormônios esteroides e desintoxicação de amônia e endotoxinas (Donkin, 2012, Drackley et al., 2005).

A principal célula do fígado, responsável pelas funções essenciais de metabolismo e produção da bile, é o hepatócito, uma célula parenquimatosa que se

organiza em unidades estruturais chamados de lóbulos hepáticos. Os hepatócitos estão dispostos nos lóbulos hepáticos, e entre eles estão vasos chamados sinusóides hepáticos, que são circundados por uma bainha de fibras reticulares. Os hepatócitos apresentam seis ou mais superfícies, ou faces, que se relacionam com o canalículo biliar, com a membrana de hepatócitos vizinhos e com o sinusóide, sendo que nesse caso existe um espaço entre estas duas estruturas, que é denominado espaço perissinusoidal ou espaço de Disse. Além dos hepatócitos, outros tipos celulares estão regularmente relacionados aos sinusóides e no espaço de Disse: as células endoteliais dos sinusóides; os macrófagos denominados células de Kupffer e as células estreladas armazenadoras de lipídio, também conhecidas como células de Ito (Figura 1) (Oriá & Brito, 2016).

Na região de contato intercelular entre hepatócitos, são observadas junções intercelulares do tipo aderente, de oclusão e desmossomos que permitem uma adesão firme entre essas células, além de junções comunicantes que constituem uma via de comunicação intercelular. Especializações da membrana plasmática são muito importantes para a homeostasia funcional do hepatócito; tanto que certas doenças hepáticas, agudas ou crônicas (cirrose, fibrose e hepatite), estão frequentemente associadas com diminuição significativa na expressão das proteínas estruturais dessas junções ou com inibição da formação dessas junções intercelulares (Oriá & Brito, 2016). Logo, estudos de expressão gênica do fígado podem fornecer informações biológicas sobre a eficiência do processamento de alimentos e ajudar a determinar os mecanismos que influenciam a EA em bovinos leiteiros.

Figura 1. Representação de um fígado sadio: principais células, canalículo biliar, espaço de Disse e sinusóide.



Fonte: Kumar, Abbas & Aster, 2016.

Atualmente, existem algumas metodologias para avaliar o perfil de expressão gênica de um determinado tecido ou célula em face do tratamento ou desafio. Dentre essas metodologias, destaca-se o Sequenciamento de Nova Geração (*New Generation Sequencing* -NGS), que ganhou muita força em laboratórios e centros de pesquisa devido à sua capacidade de gerar milhões de leituras (*reads*) por ensaio, tornando esta metodologia aplicável a uma ampla variedade de estudos biológicos. O Sequenciamento de Nova Geração é baseado no sequenciamento de ácidos nucleicos em plataformas capazes de gerar milhões de informações em uma única etapa e fornecem informações adicionais em comparação a outros métodos de sequenciamento, como Sanger, pois permitem a estimativa da expressão gênica, a detecção de eventos de *splicing* alternativos, a identificação de novos transcritos, dentre outros (Kadarmideen, 2014). Dessa forma, as análises transcriptômicas são úteis para estudar características de interesse à pecuária e fornecem informações instantâneas da expressão gênica em um determinado tecido e das funções gênicas pertencentes a uma característica específica (Kadarmideen, 2014). Nos últimos anos, a transcriptômica em gado leiteiro foi usada para identificar genes candidatos para produção de leite, produção de proteína, fertilidade e doenças metabólicas (Bionaz, 2014 & McCabe et al., 2012). No entanto, poucos estudos transcriptômicos foram realizados em dados hepáticos de EA em gado leiteiro, e nada foi encontrado em gado leiteiro de raças e clima tropicais.

Em geral, o sequenciamento do RNA mensageiro por RNA-seq via NGS segue uma série de etapas que se iniciam com a extração do RNA total de amostras de células ou tecidos. Posteriormente, o RNA ribossomal (rRNA), RNA transportador (tRNA) e outras pequenas moléculas de RNA são removidos das amostras, e os fragmentos restantes são quebrados em pequenos fragmentos, que são submetidos a uma reação de transcrição reversa para a construção de uma biblioteca de cDNA. As amostras são então sequenciadas, gerando pequenas sequências chamadas de *reads*. Posteriormente, análises de bioinformática são realizadas a fim de compreender e interpretar os resultados (Wang et al., 2009). Atualmente, o RNA-seq é considerado a técnica mais poderosa, robusta e adaptável para avaliar a expressão gênica e a ativação da transcrição em todo o genoma. Como a análise de dados de RNA-seq é complexa, foi gerada uma grande quantidade de pesquisas sobre seus algoritmos e métodos, resultando em um aumento substancial no número de opções disponíveis em cada etapa da análise. Consequentemente, não há um consenso claro

sobre os algoritmos e *pipelines* mais apropriados que devem ser usados para analisar dados de RNA-seq (Corchete et al., 2020).

As etapas de análises das *reads* por bioinformática incluem o controle de qualidade, o *trimming*, o alinhamento, a contagem de *reads*, a normalização e a análise de expressão diferencial. Uma etapa importante na análise do sequenciamento é o alinhamento dos *reads*, que consiste em encontrar um único local para um determinado *read* no genoma de referência de uma determinada espécie. Depois de alinhar as *reads*, o próximo passo é encontrar o significado biológico para eles (éxons, transcritos ou genes) usando uma abordagem que leva em consideração o número de *reads* que se sobrepõem aos éxons de um determinado gene. Como um número significativo de *reads* é mapeado em regiões genômicas fora dos éxons conhecidos, isso leva à possibilidade de encontrar novos transcritos ou mesmo novos genes expressos. (Finotello & Di Camillo, 2015).

Para a etapa de análise de genes diferencialmente expressos (DEGs), que consiste em encontrar genes que tenha seu nível de expressão modificado em diferentes condições, é necessário normalizar os dados para que os valores de expressão gênica sejam comparáveis, já que as etapas de sequenciamento geram diferenças muito grandes no número de *reads* gerados em cada rodada de sequenciamento. Assim, os procedimentos de normalização tentam equalizar essas diferenças, permitindo maior precisão na comparação entre grupos de amostras. Nas últimas décadas, várias metodologias foram propostas para a análise de genes diferencialmente expressos em um estudo de RNA-seq. Existem vários pacotes de normalização e análises de expressão gênica diferencial disponíveis em vários pacotes de análise estatística, entre eles DESeq, DESeq2, baySeq, EBSeq, edgeR, NOIseq, limma+voom, SANseq e sleth, sendo os métodos de identificação de DEGs com resultados mais consistentes o limma+voom, NOIseq e DESeq2 (Costa-Silva, Domingues, & Lopes, 2017).

Grande parte da complexidade dentro das células surge de interações funcionais e regulatórias entre proteínas (PPI), e estas interações são cada vez mais conhecidas. Entretanto, tais informações ainda permanecem distribuídas aleatoriamente entre os diferentes recursos de base de dados e modalidades experimentais. O banco de dados STRING, por sua vez, coleta e integra sistematicamente interações proteína-proteína, tanto interações físicas quanto associações funcionais. Os dados provêm de uma série de fontes: mineração

automatizada de texto da literatura científica, previsões de interação computacional de co-expressão, contexto genômico conservado, bancos de dados de experimentos de interação e complexos/vias conhecidos de fontes selecionadas. Todas essas interações são criticamente avaliadas, pontuadas e subsequentemente transferidas automaticamente para organismos menos estudados usando informações ortológicas hierárquicas (Szklarczyk et al., 2023). Além disso, o STRING faz análise de enriquecimento funcional com base nos dados de Ontologia Gênica (GO), Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEEG), dentre outros. A lista de DEGs pode conter uma super-representação de uma ou mais funções biológicas, ajudando na compreensão de mecanismos relacionados às diferenças entre as condições, dando à análise de dados um ‘fator de plausibilidade’. Essa evidência é associada a um valor estatístico que resume a probabilidade de a super-representação não ocorrer por acaso. A análise de enriquecimento funcional é, portanto, uma estratégia amplamente usada para legitimar os estudos ômicos (Solero & Grynberg, 2020).

Dessa forma, devido ao papel do fígado na regulação da homeostase e principalmente no metabolismo e aproveitamento dos nutrientes dos alimentos, como dos carboidratos, lipídios, proteínas, minerais e vitaminas essenciais para a produção do leite, a hipótese deste trabalho é que exista uma expressão diferencial de genes no tecido hepático de vacas da raça Girolando F1 em lactação com diferentes níveis de EA.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a expressão diferencial de genes de tecido hepático de fêmeas primíparas da raça Girolando F1 em relação ao consumo alimentar residual contrastante.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes diferencialmente expressos entre os grupos de fêmeas primíparas Girolando F1 com alto e baixo valor de CAR.
- Estabelecer redes de interação de proteínas, com base nos genes diferencialmente expressos, relacionada à eficiência alimentar em vacas Girolando F1 em lactação.
- Identificar processos biológicos e componentes celulares enriquecidos, relacionados a variação da eficiência alimentar, por meio análise de enriquecimento funcional.

4. METODOLOGIA

4.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite, com o registro número CEUA nº 926422031. O experimento foi conduzido no Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária que fica no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil.

Em projetos anteriores, 27 fêmeas da raça Girolando (F1 - Gir x Holandesa) primíparas, pertencentes ao rebanho da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, estado de Minas Gerais, foram avaliadas durante toda a lactação (300 dias) quanto à EA. O experimento foi conduzido em *free-stall* e as vacas foram alimentadas à vontade com dieta total contendo silagem de milho, feno de Tifton e concentrado a base de milho e soja, sendo que a proporção entre volumoso e concentrado e a composição química das dietas variaram de acordo com os dias em lactação. Parâmetros produtivos (ganho de peso, medidas morfológicas, produção de leite), o consumo de água e o consumo alimentar foram avaliados diariamente. Foram utilizados cochos eletrônicos (AF-1000, Intergado® Ltd., Contagem, Minas Gerais, Brasil), bebedouros automáticos com plataforma de pesagem corporal (VW-1000, Intergado® Ltd.) para a medida do consumo alimentar e peso do animal. A produção de leite foi registrada, diariamente, por meio de medidores eletrônicos automáticos acoplados ao sistema de ordenha (DeLaval, HB30, Tumba, Suécia).

Para este trabalho, foram selecionadas cinco vacas mais eficientes e cinco vacas menos eficientes do experimento anterior, com os menores e maiores valores de CAR, criando-se assim dois grupos contrastantes em relação a EA (Tabela 1). O grupo de alta eficiência (AE) apresentou CAR médio de $-0,956 \pm 0,302$ e o de baixa eficiência (BE) apresentou CAR médio de $0,646 \pm 0,192$. Os grupos foram estatisticamente diferentes entre si pelo teste t ($p < 0,0001$).

Tabela 1. Divisão das fêmeas primíparas de Girolando F1 nos grupos de alta eficiência (AE) e baixa eficiência (BE) em relação aos valores de consumo residual alimentar (CAR).

Grupo	Amostras	CAR
Alta Eficiência (AE)	D4560	-1,48
	D4535	-1,02
	D4536	-0,98
	D4525	-0,94
	D4066	-0,58
Baixa Eficiência (BE)	D5403	0,42
	D4572	0,47
	D5407	0,6
	D4545	0,85
	D4581	0,89

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4.2. COLETA DE BIÓPSIA HEPÁTICA

Foram injetados sob a pele e músculos intercostais, no local de inserção do instrumento de biópsia, 5 mL do anestésico lidocaína 2%. De 15 a 30 minutos após a injeção, foi inserida a cânula semiautomática para biópsia de tecidos moles, Biomedical (14g x 200 mm). Aproximadamente 10 a 20 mg de tecido hepático foram coletados e imersos em uma solução de RNAlater® (Ambion, Austin, Texas, EUA) e armazenados a 4°C por 24 h. Após as 24 h, as amostras em RNAlater® foram armazenadas a -20 °C até a extração do RNA. A coleta foi realizada no centésimo dia de lactação. O procedimento foi asséptico e realizado por um médico veterinário.

4.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA

O RNA total foi extraído das biópsias de tecido hepático usando o equipamento de trituração mecânica QIAGEN Tissue Ruptor e o kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), conforme orientação do fabricante, usando o passo opcional de tratamento com a enzima DNase (QIAGEN, Hilden, Alemanha) para eliminar possíveis

contaminantes por DNA. O RNA foi eluído em 35 µL de água livre de nucleases, fornecida pelo kit de extração.

A quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas usando o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) e o equipamento de eletroforese capilar microfluidica Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Foster City, CA, EUA). O valor RIN (*RNA Integrity Number*), fornecido pelo 2100 Expert (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), foi o parâmetro utilizado para determinar a integridade da amostra de RNA. Esse índice varia de 1 a 10, onde 1 indica RNA muito degradado e 10 indica RNA íntegro (Schroeder et al., 2006). O RNA extraído foi armazenado a -80° C até o envio para o sequenciamento.

4.4. SEQUENCIAMENTO DO RNA

Todas as amostras passaram pelo controle de qualidade prévio e seguiram para o preparo de bibliotecas de cDNA. O RNA mensageiro foi purificado a partir do RNA total usando esferas magnéticas poli-T. Em seguida foram realizadas a fragmentação do RNA mensageiro, a transcrição reversa formando a primeira fita de cDNA, a síntese da segunda fita de cDNA, o reparo final da cauda poli-A, a ligação do adaptador, a seleção por tamanho do fragmento, e por fim, a amplificação por PCR e purificação. O sequenciamento do mRNA foi realizado utilizando-se a plataforma Illumina NovaSeq 6000 (San Diego, CA), com *reads* do tipo *paired-end* 2x150bp, com a geração de cerca de 30 milhões de sequências, chamadas de *reads*, totalizando aproximadamente 9 gigabases (Gb) por amostra.

4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E DE BIOINFORMÁTICA

O controle de qualidade das *reads* foi realizado usando os programas FastQC Read Quality reports versão 0.11.9 (Andrews, 2010), e fastp versão 0.23.2 (Chen et al., 2018). Foram realizadas as seguintes análises de qualidade: controle de qualidade dos dados, distribuição da qualidade do sequenciamento, distribuição da taxa de erros do sequenciamento, distribuição de bases nitrogenadas, resumo estatístico da

qualidade das sequências incluindo a quantidade de dados gerados, taxa de erro, Q20, Q30 e conteúdo GC.

Após primeira verificação de qualidade das *reads*, foi realizada a etapa de *trimming* das amostras, usando o software Trimmomatic versão 0.38 (Bolger, Lohse & Usadel, 2014), sendo excluídas as sequências de adaptadores, sequências pequenas e sequências de baixa qualidade (Phred<20) e com separação das sequências em pareadas e não pareadas. Após a etapa de *trimming*, as *reads* pareadas foram mais uma vez analisadas quanto a qualidade e quantidade, usando o programa FastQC Read Quality reports versão 0.11.9 (Andrews, 2010) e foram aprovadas para a próxima etapa.

O alinhamento das *reads* pareadas foi realizado a partir do genoma de referência bovino (ARS-UCD1.3, anotação RefSeq GCF_002263795.2), usando a ferramenta Hisat2 (Kim et al., 2015). O programa samtools versão 1.3 (Li et al., 2009) foi usado para transformar o formato dos arquivos e ordenar as *reads*. A contagem das *reads* foi realizada utilizando featureCounts versão 1.5.2 (Liao et al., 2014) e os genes diferencialmente expressos (DEG) foram identificados usando o pacote DESeq2 (Love et al., 2014) no RStudio versão 4.3.1 (R Core Team, 2023). As análises de DEG foram realizadas comparando os dois grupos contrastantes do experimento, de alta e baixa eficiência alimentar. O resultado final foi a geração de um arquivo com a lista de todos os genes sequenciados, com os valores de *log2FoldChange*, *p-value* e *p-adj*. Os valores obtidos do *log2FoldChange* foram calculados pelo logaritmo na base 2 das contagens por milhão médias para cada gene. O *p-value* é a probabilidade de um valor tão ou mais extremo quanto o observado ocorrer dentro da hipótese nula. Um ponto de corte histórico e intuitivo de *p-value* para rejeitar a hipótese nula é 0,05. Entretanto, há uma controvérsia considerável em torno do valor p na inferência científica e isso se tornou ainda mais agravado pelo surgimento da análise de *big data*, em que são analisados milhões de dados, tornando um erro de 5% um valor muito alto. O *p-adj* é uma maneira de ajustar os valores de p pelo método de Benjamini e Hochberg, denominado *false discovery rate* (FDR), baseado no valor esperado da proporção do número de falso positivos dentre as hipóteses rejeitadas. É um método mais conservador que o *p-value* bruto, o que pode diminuir as chances de falso positivos, mas em contrapartida, pode gerar falsos negativos (Ferreira & Zwinderman, 2006). Desta forma, foi utilizado um critério intermediário, para considerar os genes

diferencialmente expressos estatisticamente significativos, sendo adotado um *p-value* $< 0,01$ e $\log_2\text{FoldChange} > 1$ (*up-regulated*) ou < -1 (*down-regulated*).

Usando os pacotes *Enhancedvolcano* e *heatmap3* no ambiente RStudio, foi elaborado um gráfico do tipo *Volcano plot* evidenciando todos os DEGs, e um *heat map* para os DEGs de maior significância ($p\text{-adj} < 0,05$).

Para construir redes de interação de proteínas (PPI), a partir dos DEGs e identificar os processos e componentes biológicos enriquecidos, foi utilizado o programa *online* STRING Database versão 12.0 (Szklarczyk et al., 2023), disponível em <https://string-db.org/>, que contém 59.309.604 proteínas, de 12.535 genomas de organismos de alta qualidade e 27.541.372.833 interações. Os nomes dos DEGs foram inseridos como entrada na lista de nomes, e *Bos taurus* foi escolhido como organismo para análise. Este banco de dados apresenta informações sobre interações que já são conhecidas e também contém informações sobre interações previstas, desta forma, cada uma delas é associada a uma pontuação de confiabilidade, que pode assumir valores entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 for a pontuação, maior a certeza da existência da interação. Os parâmetros de análise foram definidos para rede STRING completa, onde as bordas indicam associações funcionais e físicas de proteínas, com pontuação mínima de interação exigida 0,400 (confiança média). Os nós desconectados foram ocultados da rede. O programa STRING foi escolhido, devido a forma como o ele faz suas análises, uma vez que ele busca um número de interações e de organismos maior do que os demais bancos de dados, além das informações serem atualizadas com maior frequência. Ele também possui um grande número de citações, possui ferramentas de análise de PPI e análise de enriquecimento e é de uso livre.

O fluxograma de análises das *reads* está apresentado na Figura 2, com os respectivos programas de bioinformática usado em cada etapa.

Figura 2. Fluxograma de análises de RNA-seq para estudo da expressão gênica diferencial e ontologia gênica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

5. RESULTADOS

As amostras de RNA extraídas apresentaram quantidade e qualidade satisfatórias para seguirem para o sequenciamento. A concentração média das amostras de RNA foi de 268,9 ng/uL $\pm$ 161,5 ng/uL e o valor de RIN (*RNA Integrity Number*) médio das amostras foi 7,3 $\pm$ 0,4.

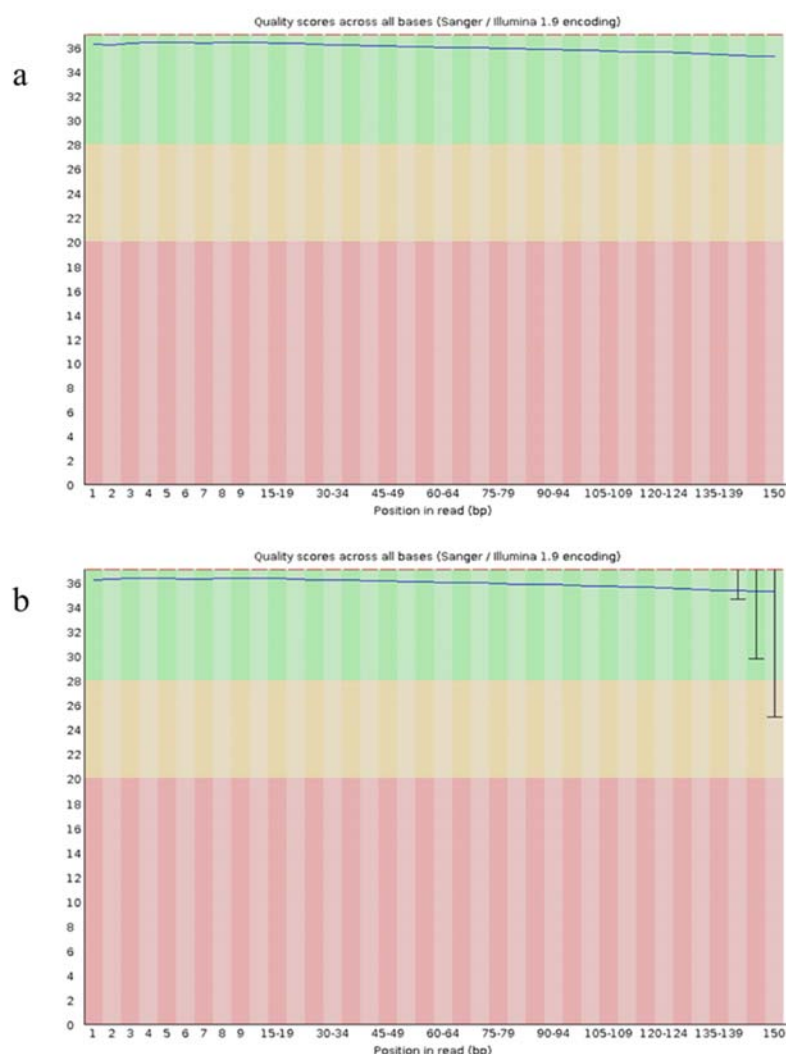
Todas as amostras de RNA foram sequenciadas com sucesso e após as análises da qualidade das sequências geradas no programa FastQC e fastp, mostraram-se aptas a seguirem para as próximas etapas. Não foram identificados problemas como *reads* de baixa qualidade, contaminação, amostras com baixo número de *reads*, etc. A Figura 3 ilustra, como exemplo, a amostra D4545, sequenciada nos dois sentidos, nomeadas D4545 1 e D4545 2. No eixo X, pode ser observada a posição da base lida, que varia de 1 a 150. Já no eixo Y, é revelado o índice de qualidade de bases chamado *Phred Score*, cujos valores variam de 0 a 40, de acordo com a fórmula $Q_{\text{phred}} = -10\log_{10}(e)$, onde “e” representa a taxa de erro do sequenciamento e “ Q_{phred} ” representa o valor de qualidade da base (se $Q_{\text{phred}}=10$, por exemplo, a taxa de erro de sequenciamento é de 1 para cada 10 bases lidas e quando o $Q_{\text{phred}}=40$, temos uma taxa de erro de 1 a cada 10000 bases lidas). Os valores ideais são de Q_{phred} são acima de 30, porém valores acima de 20 também são aceitáveis. O fundo do gráfico divide o eixo y em três níveis de confiança: muito confiável (verde), qualidade razoável (laranja) e baixa qualidade (vermelho). A linha azul corresponde à média de Q_{phred} em cada posição. Como podemos observar nessa amostra, o valor de *Phred* variou de 34 a 36, indicando que a qualidade das bases pode ser considerada excelente.

Outro importante parâmetro analisado foi a quantidade de bases identificadas como N, ou seja, que não pode ser diferenciada como adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G). Na Figura 4, é observado o resultado da amostra D4545. No eixo X, pode ser observado a posição da base, que varia de 1 a 150 e no eixo Y, a porcentagem de bases lidas como N. A amostra D4545 apresentou uma porcentagem praticamente igual a zero em todas as posições, confirmando a alta qualidade das sequências obtidas. Todas as outras amostras apresentaram resultados semelhantes.

O sequenciamento gerou, em média, 74.967.988 *reads* (37.483.994 *reads* pareadas) e 11,4 Gb por amostra de dados brutos. O conteúdo CG das amostras variou entre 51,0 e 52,4%. Em relação ao Q20(%), em média, 97,34% das bases lidas

apresentaram qualidade elevada, ou seja, valores de *Phred Score* acima de 20, com 99% de certeza da base lida ser a base correta. Na Tabela 2 são apresentados os dados do sequenciamento bruto por amostra, obtidos após análises nos programas FastQC e fastp.

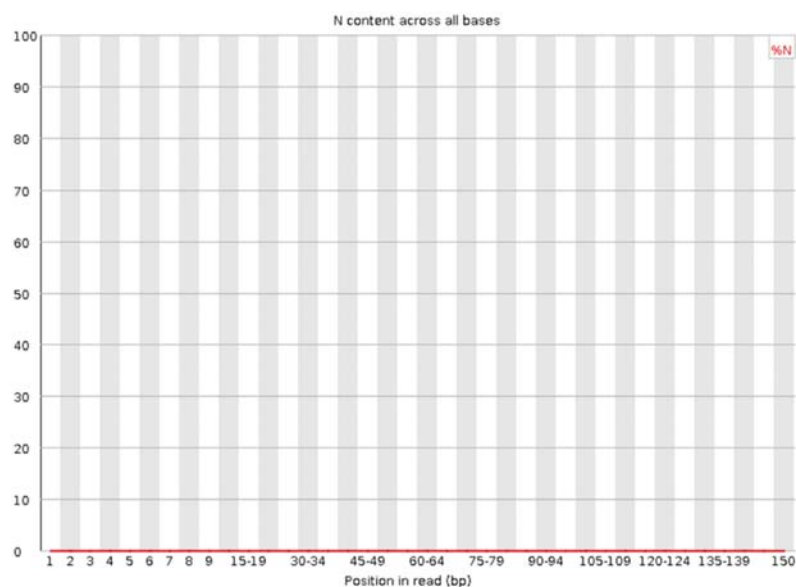
Figura 3. Gráfico com o índice de qualidade das bases baseado no Phred Score, após RNA-Seq do tipo *paired-end* 2 x 150 bp de biópsias hepáticas de vacas Girolando em lactação com diferenças quanto a eficiência alimentar. Resultado extraído após análise no programa FastQC (versão 0.11.9).



Legenda: a) Amostra D4545 1 b) Amostra D4545 2.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 4. Conteúdo de N em porcentagem, resultado da amostra D4545 1 como exemplo para o conjunto de amostras de RNA de fígado de fêmeas Girolando F1 em lactação com fifierentes valores de CAR, após RNA-Seq do tipo *paired-end* 2 x 150 bp. O eixo X representa a posição da base, que varia de 1 a 150 e o eixo Y mostra a porcentagem de bases lidas como N.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 2. Resumo da qualidade dos dados brutos obtidos após o RNA-seq de biópsias hepáticas de fêmeas Girolando F1, em lactação, apresentando valores de eficiência alimentar divergentes. Erro: taxa de erro de bases em %; Q20 e Q30: percentual de bases com valor Phred > 20 ou 30; GC: percentual de bases G e C.

Amostra	Total bruto de reads	Dados (Gb)	Erro (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
D4536	72410954	10,9	0,03	97,25	92,94	52,4
D4581	61940284	9,3	0,03	97,47	93,28	51,5
D4535	65943988	9,9	0,03	97,36	93,10	51,2
D5403	67412870	10,1	0,03	97,50	93,48	51,5
D4545	101613390	15,2	0,03	97,57	93,53	51,0
D5407	79166074	11,9	0,03	97,36	93,22	51,6
D4572	81576558	12,2	0,03	97,51	93,37	51,5
D4560	81095762	12,2	0,03	97,38	93,13	51,7
D4066	67656726	10,1	0,03	97,75	94,09	52,3
D4525	70863270	10,6	0,03	96,28	90,63	51,1
Média	74967988	11,2	0,03	97,34	93,08	51,6

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Após a etapa de *trimming*, mapeamento e contagem das *reads*, foram obtidas em média, por amostra, 56.121.969 *reads*. Dos 30.543 genes presentes na anotação do genoma de referência bovino utilizada, 20.787 genes foram expressos pelas amostras analisadas. Ao final desta etapa, foi obtida uma tabela com a contagem do número de *reads* em cada gene, por cada amostra. A partir desse resultado, foi feita a análise da expressão gênica diferencial, considerando os grupos Alta Eficiência (AE) versus Baixa Eficiência (BE). Um total de 149 genes diferencialmente expressos foram encontrados (Tabela 3), sendo 108 genes regulados negativamente e 41 regulados positivamente no grupo BE ($p\text{-value} < 0,01$ e $\log_2\text{FoldChange} > |1|$). A Figura 5 mostra os genes diferencialmente expressos do contraste AE x BE.

Tabela 3. Lista dos genes diferencialmente expressos em fígado de fêmeas Girolando F1 em lactação, com valores contrastantes de eficiência alimentar (AE x BE), obtidos por análise de RNA-Seq.

Genes up-regulated no grupo BE				Genes down-regulated no grupo BE			
Símbolo do Gene	Log ₂ FC	p-value	p-adj	Símbolo do Gene	Log ₂ FC	p-value	p-adj
LOC101907335	7,64	4,2E-06	8,1E-03	LOC112448801	-8,02	3,1E-05	3,3E-02
LOC112445540	7,24	8,0E-09	6,9E-05	KLRF2	-7,03	2,2E-04	1,1E-01
LOC112446473	5,27	7,5E-04	1,9E-01	LOC100847268	-5,53	4,0E-03	4,4E-01
LOC112445652	4,87	3,7E-04	1,4E-01	LOC100300442	-5,25	3,6E-03	4,3E-01
LOC104974249	4,38	1,4E-03	2,6E-01	LOC101907929	-5,23	2,2E-04	1,1E-01
LOC112442667	4,36	2,2E-03	3,3E-01	LOC107132214	-5,21	2,7E-03	3,7E-01
LOC112448028	4,25	5,2E-05	4,3E-02	LOC112444174	-5,21	1,4E-05	1,8E-02
SLC38A11	3,95	6,3E-05	4,6E-02	ASCL2	-5,05	9,4E-04	2,2E-01
LOC100299144	3,77	6,5E-05	4,6E-02	PENK	-4,97	7,3E-03	5,6E-01
LOC101906006	3,59	5,2E-03	4,9E-01	SUSD5	-4,60	7,8E-04	1,9E-01
LOC104973018	3,54	4,0E-03	4,4E-01	LOC104970790	-4,43	4,5E-03	4,6E-01
LOC112447397	3,02	8,7E-03	6,0E-01	LOC104969409	-4,03	3,8E-03	4,4E-01
LOC112448029	2,68	8,9E-04	2,1E-01	FXSD2	-4,03	4,6E-04	1,6E-01
EPHA5	2,53	2,5E-03	3,5E-01	KCNG1	-3,84	1,6E-03	2,9E-01
RAD51AP1	2,42	1,9E-04	9,9E-02	APOD	-3,74	7,0E-04	1,9E-01
CARMIL3	2,40	5,6E-03	5,1E-01	TMC5	-3,71	1,3E-03	2,4E-01
LOC112444360	2,27	3,7E-03	4,3E-01	GPR20	-3,68	4,0E-03	4,4E-01
DLK1	2,26	7,8E-06	1,3E-02	SLC26A4	-3,45	7,0E-03	5,6E-01
LOC508646	2,19	4,1E-03	4,4E-01	FAT3	-3,38	1,1E-03	2,4E-01
ENPP3	2,09	3,4E-03	4,2E-01	LHB	-3,34	5,3E-03	4,9E-01
CNIH3	2,08	1,2E-03	2,4E-01	LOC618219	-3,16	7,4E-03	5,7E-01
LOC101904258	1,97	3,2E-03	4,0E-01	NRIP3	-2,80	5,4E-04	1,7E-01
ASTN1	1,96	9,9E-04	2,2E-01	LOC112441847	-2,77	6,3E-03	5,3E-01
LOC783540	1,80	5,3E-04	1,7E-01	LDB3	-2,76	3,8E-03	4,4E-01
LOC101905518	1,79	8,2E-04	2,0E-01	ANXA8L1	-2,65	3,3E-03	4,1E-01
SYCP2L	1,74	7,9E-04	1,9E-01	FBLN7	-2,65	4,1E-05	3,7E-02
ZNF383-2	1,67	6,1E-04	1,8E-01	FBLN2	-2,54	5,8E-08	2,5E-04
CACNG4	1,61	8,1E-08	2,8E-04	LOC782884	-2,54	4,0E-03	4,4E-01

Cont.

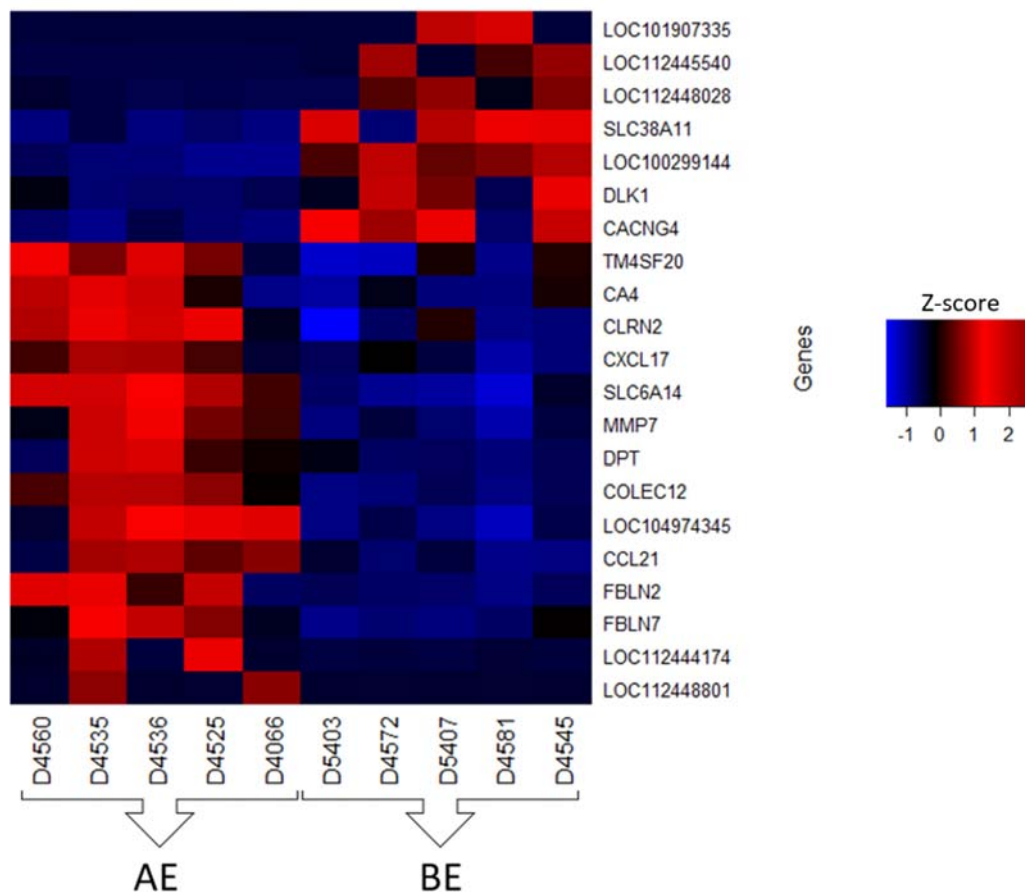
Genes up-regulated no grupo BE				Genes down-regulated no grupo BE			
Símbolo do Gene	Log₂ FC	p-value	p-adj	Símbolo do Gene	Log₂ FC	p-value	p-adj
<i>LOC619159</i>	1,50	6,0E-04	1,8E-01	<i>DUOXA2</i>	-2,52	4,0E-03	4,4E-01
<i>RAPSN</i>	1,42	7,8E-03	5,8E-01	<i>CCL21</i>	-2,45	8,5E-07	2,1E-03
<i>BCAT1</i>	1,33	2,2E-03	3,3E-01	<i>ANGPT4</i>	-2,45	1,2E-03	2,4E-01
<i>IFT43</i>	1,31	2,9E-04	1,2E-01	<i>LOC104974739</i>	-2,42	6,5E-03	5,5E-01
<i>KLHDC7A</i>	1,27	7,2E-03	5,6E-01	<i>MGAT3</i>	-2,29	8,5E-05	5,8E-02
<i>ACOD1</i>	1,16	5,6E-03	5,1E-01	<i>FOXL1</i>	-2,27	4,3E-03	4,5E-01
<i>AZGP1</i>	1,16	2,2E-03	3,3E-01	<i>NRIP2</i>	-2,23	6,2E-04	1,8E-01
<i>CHD5</i>	1,15	3,0E-03	4,0E-01	<i>C11H2orf40</i>	-2,23	3,0E-04	1,2E-01
<i>RALGPS1</i>	1,07	4,2E-04	1,5E-01	<i>SH3TC2</i>	-2,21	6,1E-04	1,8E-01
<i>LOC618456</i>	1,03	9,2E-04	2,1E-01	<i>EFS</i>	-2,21	2,5E-03	3,5E-01
<i>OASL</i>	1,03	5,0E-03	4,8E-01	<i>PRRX2</i>	-2,13	2,2E-03	3,3E-01
<i>CDKL1</i>	1,03	2,4E-03	3,5E-01	<i>LOC104974345</i>	-2,11	6,1E-12	1,1E-07
<i>LOC107132251</i>	1,00	2,0E-03	3,3E-01	<i>MARVELD3</i>	-2,11	3,0E-04	1,2E-01
				<i>FBLN1</i>	-2,06	3,8E-03	4,4E-01
				<i>TFF3</i>	-2,04	2,2E-04	1,1E-01
				<i>GLP1R</i>	-2,02	3,1E-03	4,0E-01
				<i>MMRN1</i>	-2,00	6,2E-03	5,3E-01
				<i>MAP1B</i>	-1,97	1,7E-03	3,0E-01
				<i>COLEC12</i>	-1,95	1,2E-06	2,5E-03
				<i>CLDN11</i>	-1,95	9,5E-05	6,3E-02
				<i>COX4I2</i>	-1,95	7,6E-03	5,7E-01
				<i>ZBTB7C</i>	-1,95	1,6E-03	2,9E-01
				<i>WNT7B</i>	-1,95	6,5E-04	1,8E-01
				<i>KCNE4</i>	-1,93	9,7E-04	2,2E-01
				<i>GPX2</i>	-1,85	2,2E-03	3,3E-01
				<i>ADCY2</i>	-1,80	5,2E-03	4,9E-01
				<i>MRGPRF</i>	-1,75	4,5E-03	4,6E-01
				<i>MEOX2</i>	-1,73	1,3E-03	2,4E-01
				<i>DUOX2</i>	-1,69	4,1E-03	4,4E-01
				<i>SLC28A3</i>	-1,66	1,4E-04	8,3E-02
				<i>LUM</i>	-1,64	2,9E-03	3,8E-01
				<i>SVEP1</i>	-1,63	4,2E-03	4,5E-01
				<i>FAM69B</i>	-1,60	6,8E-03	5,5E-01
				<i>CYP2S1</i>	-1,60	2,8E-03	3,8E-01
				<i>RRAD</i>	-1,60	5,5E-04	1,7E-01
				<i>C7</i>	-1,59	1,6E-03	2,9E-01
				<i>SLC2A12</i>	-1,59	6,0E-03	5,3E-01
				<i>FRRS1L</i>	-1,59	2,2E-03	3,3E-01
				<i>COL1A2</i>	-1,55	8,1E-03	5,8E-01
				<i>COL16A1</i>	-1,53	2,7E-04	1,2E-01
				<i>NTRK3</i>	-1,52	8,1E-03	5,8E-01
				<i>LAMC2</i>	-1,51	4,3E-04	1,5E-01
				<i>DPT</i>	-1,50	3,7E-05	3,7E-02
				<i>LOC524810</i>	-1,47	6,8E-03	5,5E-01
				<i>MMP7</i>	-1,47	4,1E-08	2,3E-04
				<i>PI16</i>	-1,47	3,2E-03	4,1E-01
				<i>MCAM</i>	-1,46	3,3E-03	4,1E-01
				<i>CPE</i>	-1,45	7,5E-04	1,9E-01
				<i>ABI3BP</i>	-1,44	2,3E-03	3,4E-01
				<i>CELA1</i>	-1,43	6,7E-03	5,5E-01

Cont.

Genes <i>up-regulated</i> no grupo BE				Genes <i>down-regulated</i> no grupo BE			
Símbolo do Gene	Log ₂ FC	p-value	p-adj	Símbolo do Gene	Log ₂ FC	p-value	p-adj
				MGP	-1,43	9,6E-04	2,2E-01
				DPP10	-1,41	6,8E-03	5,5E-01
				EVC	-1,38	9,3E-03	6,4E-01
				THY1	-1,37	3,8E-03	4,4E-01
				LOC104975607	-1,36	1,2E-03	2,4E-01
				MN1	-1,33	2,0E-03	3,3E-01
				ADAMDEC1	-1,33	9,0E-04	2,1E-01
				NCMAP	-1,32	8,1E-03	5,8E-01
				SLC6A14	-1,31	7,4E-07	2,1E-03
				BICDL2	-1,30	7,4E-03	5,7E-01
				CXCL17	-1,29	1,3E-05	1,8E-02
				DPYSL3	-1,29	2,1E-03	3,3E-01
				FAM81A	-1,29	1,9E-03	3,3E-01
				MMP28	-1,27	2,8E-04	1,2E-01
				ITGA3	-1,26	1,7E-04	9,2E-02
				F3	-1,25	5,1E-03	4,9E-01
				GEM	-1,18	4,7E-03	4,7E-01
				CCL2	-1,16	5,8E-03	5,2E-01
				MAP1A	-1,15	7,6E-03	5,7E-01
				CTNND2	-1,13	5,9E-03	5,2E-01
				DUSP26	-1,12	8,8E-03	6,0E-01
				CLRN2	-1,11	3,9E-05	3,7E-02
				CD34	-1,07	5,4E-03	5,1E-01
				CA4	-1,06	6,0E-05	4,6E-02
				IGFBP6	-1,05	1,7E-03	2,9E-01
				FAM13C	-1,05	1,3E-03	2,4E-01
				SCTR	-1,03	1,8E-04	9,8E-02
				KRT19	-1,03	6,0E-04	1,8E-01
				ARHGEF25	-1,03	4,4E-03	4,5E-01
				TM4SF20	-1,02	5,3E-05	4,3E-02

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

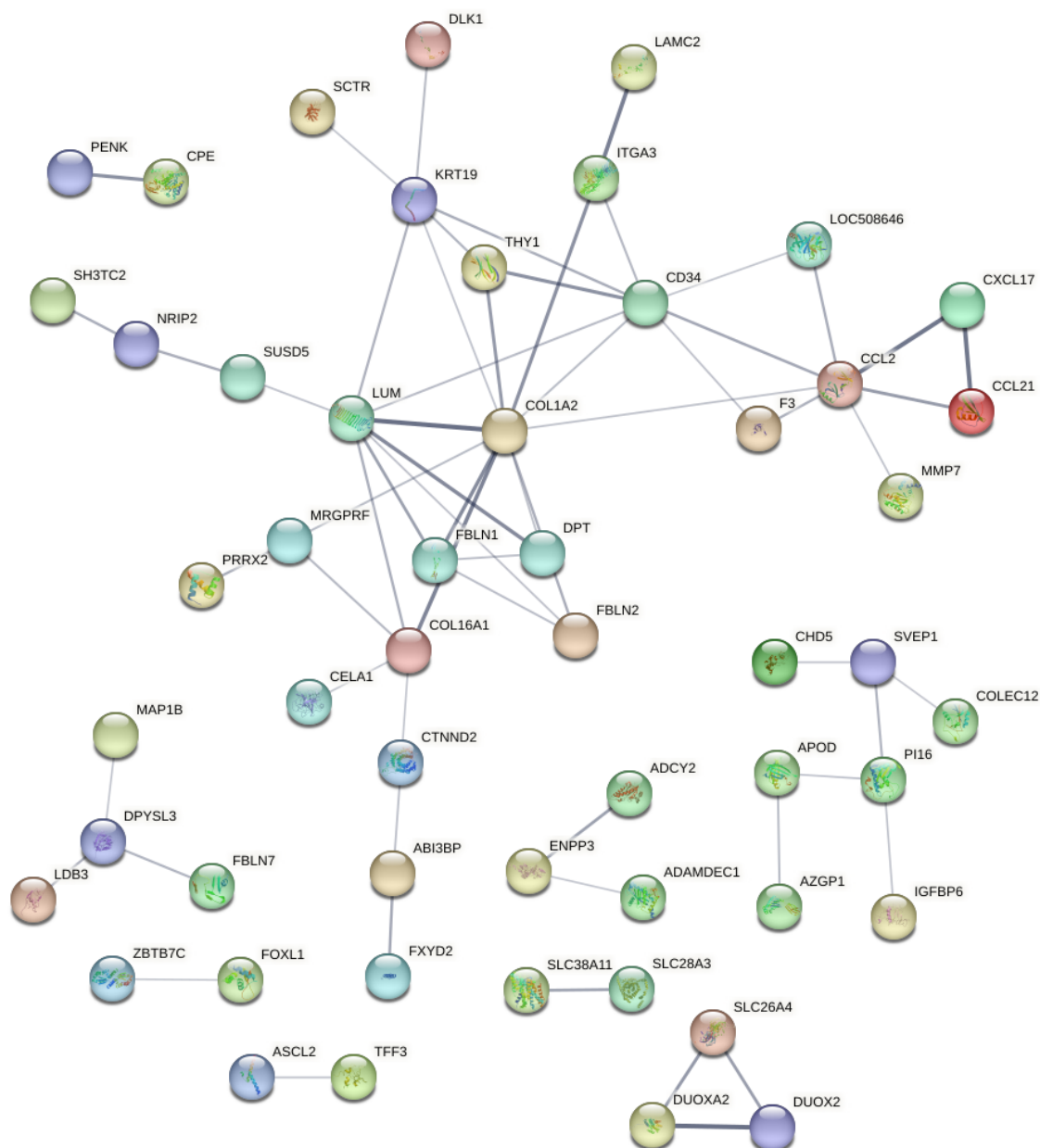
Figura 6. Gráfico *heat map* destacando os 21 genes diferencialmente expressos (p -adj <0,05), por RNA-Seq, em fígado de fêmeas lactantes Girolando F1, com característica de eficiência alimentar contrastantes (AE x BE).



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

A análise de redes de interação de proteínas e de enriquecimento funcional por ontologia gênica gerou resultados que estão apresentados na Figura 7 e Tabela 4. A rede gerada (Figura 7) possui 62 arestas e valor p de enriquecimento PPI de $1,55E-13$, isso significa que suas proteínas têm mais interações entre si do que seria esperado para um conjunto aleatório de proteínas do mesmo tamanho e grau de distribuição extraídas do genoma. Tal enriquecimento indica que as proteínas estão pelo menos parcialmente ligadas biologicamente a um grupo. A espessura da linha que conecta os nós (genes) na rede indica a confiança dos dados.

Figura 7. Rede de interação de proteínas a partir dos genes diferencialmente expressos, encontrados por RNA-Seq, no fígado de vacas Girolando F1 em lactação com eficiência alimentar contrastantes.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Tabela 4. Análise de enriquecimento funcional: Processos biológicos, componentes celulares, vias e localizações subcelulares enriquecidas, de acordo com os genes diferencialmente expressos encontrados no fígado de vacas Girolando F1 em lactação com eficiência alimentar contrastantes.

Processo Biológico - Ontologia Gênica				
GO	Descrição	Contagem na rede	Força	p-value
IR:0002686	Regulação negativa da migração de leucócitos	4 de 35	1,32	3,93E-02
IR:2001257	Regulação da atividade do canal catiônico	6 de 120	0,96	4,14E-02
IR:2000146	Regulação negativa da motilidade celular	10 de 214	0,93	5,10E-03
IR:0030336	Regulação negativa da migração celular	9 de 204	0,91	5,20E-03
IR:0010810	Regulação da adesão célula-substrato	7 de 159	0,91	2,74E-02
IR:0030198	Organização da matriz extracelular	9 de 236	0,85	1,09E-02
IR:1904062	Regulação do transporte transmembrana de cátions	8 de 248	0,77	4,79E-02
IR:2000145	Regulação da motilidade celular	16 de 766	0,58	8,00E-03
IR:0007155	Adesão celular	14 de 676	0,58	2,06E-02
IR:0030334	Regulação da migração celular	14 de 722	0,55	3,43E-02
IR:0022008	Neurogênese	17 de 1034	0,48	3,66E-02
IR:0007399	Desenvolvimento do sistema nervoso	22 de 1519	0,42	2,11E-02
IR:0048731	Desenvolvimento de sistema	36 de 2880	0,36	5,10E-03
IR:0050789	Regulação do processo biológico	88 de 11260	0,16	5,10E-03
IR:0050794	Regulação do processo celular	83 de 10613	0,16	5,20E-03
IR:0065007	Regulação biológica	91 de 12011	0,14	5,10E-03
Componente Celular - Ontologia Gênica				
GO	Descrição	Contagem na rede	Força	p-value
IR:0005583	Trímero de colágeno fibrilar	3 de 11	1,70	1,04E-02
IR:0005581	Trímero de colágeno	5 de 56	1,21	5,00E-03
IR:0062023	Matriz extracelular contendo colágeno	11 de 202	1,00	8.05E-06
IR:0031012	Matriz extracelular	15 de 358	0,89	1.54E-06
IR:0005615	Espaço extracelular	30 de 1465	0,58	4.26E-07

IR:0005576	Região extracelular	34 de 2064	0,48	1.54E-06
IR:0031226	Componente intrínseco da membrana plasmática	20 de 1332	0,44	8,10E-03
IR:0005887	Componente integral da membrana plasmática	18 de 1271	0,42	3,10E-02
IR:0071944	Periferia celular	58 de 5694	0,27	3.05E-05

Via KEGG

Via	Descrição	Contagem na rede	Força	p-value
bta04918	Thyroid hormone synthesis	5 of 71	1,11	0,0193

Localização Subcelular

Compartimento	Descrição	Contagem na rede	Força	p-value
GOCC:0005576	Região extracelular	31 de 1519	0,57	2.36E-07
GOCC:0031012	Matriz extracelular	9 de 209	0,90	2,80E-03
GOCC:0062023	Matriz extracelular contendo colágeno	7 de 143	0,95	1,13E-02
GOCC:0005583	Trímero de colágeno fibrilar	3 de 11	1,70	2,58E-02
GOCC:0005615	Espaço extracelular	12 de 556	0,60	2,58E-02
GOCC:0099512	Fibra supramolecular	10 de 424	0,64	3,48E-02

Legenda: Contagem na rede: O primeiro número indica quantas proteínas na rede estão anotadas com um termo específico. O segundo número indica quantas proteínas no total têm este termo atribuído. Força: Log10(observado/esperado) descreve quão grande é o efeito de enriquecimento. *p-value* = significância do enriquecimento. São mostrados valores de p corrigidos para múltiplos testes dentro de cada categoria usando o procedimento de Benjamini-Hochberg.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

6. DISCUSSÃO

O estudo do transcriptoma hepático pode levar à identificação de genes que são importantes para regular a eficiência alimentar. A compreensão dos mecanismos de ação e das funções biológicas dos DEGs altamente significativos, em animais de alta versus baixa eficiência alimentar, testados experimentalmente, melhora nossa compreensão da biologia da eficiência alimentar em bovinos leiteiros.

DLK1, mais expresso no grupo de BE, é um gene candidato à EA, e associado ao metabolismo lipídico em bovinos. Ele codifica uma glicoproteína de membrana tipo 1, semelhante ao fator de crescimento epidérmico. Além disso, o gene DLK1 está envolvido na adipogênese, o que pode afetar a qualidade da carne em animais de produção. DLK1 funciona como um regulador negativo da diferenciação de adipócitos (Wang et al., 2020). Moon e colaboradores (2002) descobriram que camundongos nulos para DLK1 apresentavam obesidade, aumento de metabólitos lipídicos séricos, malformação esquelética e retardo de crescimento. Estes resultados indicaram que o DLK1 poderia desempenhar um papel essencial na diferenciação de adipócitos em camundongos. Albrecht e colaboradores (2015) demonstraram um nível de expressão mais alto do gene DLK1 no músculo menos marmorizado de novilhos Holandeses e que o número de células positivas para DLK1 por imuno-histoquímica foi negativamente associado ao conteúdo de gordura. Os autores sugerem que o DLK1 esteja envolvido na deposição e distribuição de gordura por todos os depósitos de gordura corporal.

Além disso, dois SNPs do gene DLK1 já foram identificados e demonstraram estar associados a características de qualidade de carcaça e carne em novilhos Simental chineses. Estes resultados indicaram que o gene DLK1 bovino pode afetar o metabolismo lipídico, e dois SNPs poderiam ser aplicados como marcadores moleculares para seleção de bovinos de corte no futuro (Wang et al., 2020). O gene DLK1 é um gene de interesse em bovinos de corte e mais estudos precisam ser realizados para validar a associação deste gene com a eficiência alimentar para produção de leite.

CACNG4 é também um gene de interesse, mais expresso no grupo de BE. Este gene codifica a subunidade auxiliar gama 4 do canal de cálcio dependente de voltagem, permitindo a entrada de Ca^{+2} na célula, que por sua vez o utiliza como mensageiro secundário nas funções e diferenciação das células. As associações do

CACNG4, portanto, indicaram que ele está relacionado às atividades de transmissão de informações e à formação de células nervosas (Yin et al., 2016). Os canais de cálcio dependentes de voltagem desempenham um papel importante tanto no sistema nervoso (fluxo intracelular de Ca^{2+} por potenciais de ação na sinapse), quanto no sistema cardiovascular (regula o acoplamento excitação-contração do coração) (Paredes-Sánchez et al., 2020). Estudos atuais relacionaram variações no gene CACNG4 do tipo SNP, na parte intrônica, com características de temperamento em bovinos da raça Brahman (Paredes-Sánchez et al., 2020; Ruiz-De-La-Cruz et al., 2023). No trabalho de Ruiz-De-La-Cruz e colaboradores (2023), o SNP no gene CACNG4 Rs3423464051:G>A foi associado à característica velocidade de saída e ao temperamento. Os autores afirmaram que, particularmente, CACNG4 é um gene candidato que necessita de análises mais detalhadas para revelar seu papel nas características relacionadas ao temperamento. Nesse sentido, o temperamento bovino também está relacionado a eficiência alimentar, uma vez que animais mais estressados, gastam mais energia. Na análise de ontologia gênica, a regulação da atividade do canal catiônico foi um dos processos biológicos enriquecidos, estando o CACNG4 dentro deste processo.

O grupo de transportadores de soluto (SLC), consiste em proteínas de membrana classificadas em 52 famílias. Neste trabalho, cinco genes que codificam proteínas SLC foram diferencialmente expressos. Os transportadores de solutos (SLCs) são o maior grupo de transportadores, abrangendo transportadores de íons inorgânicos, aminoácidos, neurotransmissores, açúcares, purinas e ácidos graxos, dentre outros substratos. Os membros das famílias SLC têm propriedades bioquímicas variadas, sendo alguns transportadores acoplados, alguns trocadores, muitas vezes impulsionados pelo gradiente de sódio celular, e alguns sendo transportadores passivos, apenas translocando moléculas ao longo de seu gradiente de concentração (Fredriksson et al., 2008). Sua localização celular também varia como a maioria dos transportadores, podendo estar localizados na membrana plasmática, mas também nas mitocôndrias, vesículas sinápticas ou peroxissomos (Fredriksson et al., 2008).

SLC38A11, único gene da família SLC que está mais expresso no grupo BE, pertence à família de transportadores de soluto 38 (SLC38) e é, juntamente com as famílias SLC32 e SLC36, os únicos membros conhecidos da superfamília de transportadores de aminoácidos/poliamina/organocátion, também chamado de grupo

β. A família SLC38 consiste em 11 membros, SLC38A1 a SLC38A11 (Hägglund et al., 2015). Os 11 membros da família SLC38 são dependentes de sódio (Na⁺) e realizam o transporte líquido de aminoácidos neutros (Jiang et al., 2023).

Em contrapartida, outros quatro genes da família SLC estão menos expressos no grupo BE: SLC6A14, SLC2A12, SLC28A3 e SLC26A4. O gene SLC6A14 codifica um transportador de aminoácidos neutros e catiônicos. Em humanos, um SNP na região 3' não traduzida (3'-UTR) do gene *SLC6A14* está associado à obesidade. A ligação entre SLC6A14 e obesidade foi investigada em camundongos selvagens e *SLC6A14*^{-/-}. O SNP associado à obesidade reduziu a expressão de SLC6A14. Com uma dieta rica em gordura, os camundongos *SLC6A14*^{-/-} ganharam mais peso do que os camundongos do tipo selvagem, e também desenvolveram fígado gorduroso e síndrome metabólica (Sivaprakasam et al., 2021). Não foram encontrados, na literatura, estudos que relacionem o gene SLC6A14 com obesidade, gordura hepática ou síndrome metabólica em bovinos.

Já o gene SLC2A12, localizado no BTA9, codifica a proteína GLUT12, uma das proteínas de membrana responsável pelo transporte passivo de glicose para a célula. A família GLUT bovina de transportadores de glicose compreende 12 proteínas, que desempenham um papel crucial no metabolismo celular determinado pela sua especificidade de substrato, expressão em diferentes tecidos (órgãos) e pelo estado fisiológico do animal (Ostrowska, Jarczak, & Zwierzchowski, 2015). Os transportadores de glicose (GTs) desempenham um papel fundamental na homeostase da glicose em espécies pecuárias, interferindo no metabolismo energético e, portanto, na capacidade de produção de carne ou leite. Durante a lactação, a glândula mamária utiliza grandes quantidades de glicose, principalmente para a síntese de lactose, que é transportada para as células epiteliais mamárias pelos GTs. Alterações na expressão dos genes GT podem levar a alterações na concentração de proteínas transportadoras de glicose; isso, por sua vez, pode alterar o fornecimento de glicose aos tecidos e órgãos animais, como o fígado e a glândula mamária, e assim influenciar o metabolismo em geral (Zwierzchowski et al., 2023). Em um trabalho recente, Zwierzchowski e colaboradores (2023) relataram a presença de um SNP na região promotora 5' do gene SLC2A12 em bovinos da raça Holandesa e correlacionaram esse SNP ao aumento da produção de leite. Segundo os autores, o SNP g.-671C > G (NC_037336.1: g.72224078C > G), pode ser um marcador eficaz para características de produção bovina e que os genótipos CC e CG estão

associados à melhor produtividade. Ademais, análises de qPCR de vacas com genótipo CC demonstraram uma abundância relativa de mRNA de SLC2A12 três vezes maior que vacas CG, em células somáticas recém-isoladas do leite. Esses achados corroboram nossos resultados, em que vacas em lactação com baixa eficiência alimentar expressam menos SLC2A12, e com isso possuem menos GLUT12 na superfície da membrana e fazem o transporte da glicose de forma menos eficiente. O transporte eficiente de glicose desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo celular. A glicose é utilizada nas vias metabólicas para a produção de ATP (trifosfato de adenosina), sendo a principal forma de energia celular.

Os transportadores codificados pelo gene SLC28A3 são Na⁺ dependentes, pertencem à família de transportadores de nucleosídeos e estão envolvidos no transporte de nucleosídeos, como adenosina e citidina, necessários para a síntese de DNA e RNA, através da membrana celular. Regulam múltiplos processos celulares, incluindo a neurotransmissão, o tônus vascular, a concentração de adenosina nas proximidades dos receptores da superfície celular e transporte e metabolismo de fármacos sintéticos de análogo de nucleosídeos (Ritzel et al., 2001). Os estudos no gene SLC28A3 concentram-se em humanos e estão relacionados a terapias antitumorais.

O SLC26A4 é o gene que codifica a glicoproteína pendrina, que é expressa em vários tecidos, como ouvido interno, tireoide, fígado e vias aéreas. A pendrina é um trocador de ânions responsável pelo efluxo de íons iodeto (I⁻) nos tireócitos e por mediar a troca de íons cloreto/bicarbonato (Cl⁻ /HCO⁻³) (Rebeh et al., 2010). Mutações neste gene estão relacionadas com defeitos estruturais da tireoide e com a síndrome de Pendret, que resulta em perda auditiva (Kühnem et al., 2014). A principal função da tireoide é a produção dos hormônios triiodotironina (T3) e tetraiodotironina ou tiroxina (T4), que regulam o consumo energético no organismo, sendo indispensáveis para o crescimento, o desenvolvimento e a maturação de vários órgãos. O iodo é um elemento essencial na síntese de T3 e T4, ele é proveniente da dieta e absorvido na forma de iodeto. A pendrina, codificada pelo gene SLC26A4, que é a responsável pelo transporte do I⁻, por isso a importância deste gene na síntese de hormônios da tireoide.

Na análise de enriquecimento funcional, banco de dados KEGG, o processo “síntese de hormônio tireoidiano” foi o único significativo. O gene SLC26A4, juntamente com o DUOX2 (*dual oxidase 2*) e DUOXA2 (*dual oxidase maturation fator*

2), todos regulados negativamente no grupo BE e integrantes da via “síntese de hormônio tireoidiano”, foram altamente relacionados entre si (Figura 7 e Tabela 4). Os genes *DUOX2* e *DUOX2A* são responsáveis pelo fornecimento de peróxido H_2O_2 , que age como cofator enzimático na reação de oxidação do iodeto, necessário para a síntese de T3 e T4. Mutações nos genes *DUOX2* e *DUOX2A* são descritas em pacientes com hipotireoidismo congênito em humanos (Aycan et al., 2017; Park et al., 2016 e Zamproni et al., 2008). Em um outro estudo, um SNP no gene *DUOX2* foi descrito no panda gigante. Esta mutação é crítica na síntese do hormônio tireoidiano, e explica como esse animal carnívoro, possui uma dieta especializada em bambu, à qual seu trato alimentar está pouco adaptado. Os pandas tem gasto energético excepcionalmente baixo, em parte devido ao tamanho reduzido de vários órgãos vitais e à baixa atividade física e também por apresentar os níveis circulantes dos hormônios tireoidianos T4 e T3 mais baixos que os níveis esperados para um mamífero eutério de tamanho comparável (Nie et al., 2015).

Em bovinos não foram encontrados estudos relacionados aos genes *SLC26A4*, *DUOX2* e *DUOX2A*. Contudo, com base nos dados encontrados na literatura relativos à importância destes genes em outras espécies, especialmente devido ao papel que eles desempenham na síntese dos hormônios T3 e T4, seria de grande valia a realização de pesquisas complementares.

Outro grupo de genes com expressão reduzida no grupo BE foi das quimiocinas *CCL21* e *CXCL17*. Quimiocinas são um grupo de citocinas quimiotáticas que fazem o recrutamento de leucócitos para locais de inflamação. A citocina *CCL21* tem função antimicrobiana e pertence ao grupo de citocina CC. As citocinas são uma família de proteínas secretadas envolvidas em processos imunorreguladores e inflamatórios. As citocinas CC são proteínas caracterizadas por duas cisteínas adjacentes. Semelhante a outras quimiocinas, *CCL21* inibe a hematopoiese e estimula a quimiotaxia e também pode desempenhar um papel na mediação do retorno de linfócitos para órgãos linfóides secundários. *CCL21* é considerada uma quimiocina homeostática, produzida constitutivamente, no entanto, sua produção aumenta durante a inflamação. Esta quimiocina se liga a um receptor de superfície celular conhecido como *CCR7*, para exercer sua função que é guiar os leucócitos e células dendríticas que expressam o *CCR7* para os órgãos linfóides secundários (Comeford et al., 2013). Quando *CCL21* não é reconhecido pelas células, por exemplo, em camundongos deficientes em *CCR7*, ocorre uma resposta imune adaptativa retardada e reduzida devido à redução

das interações entre células dendríticas e células T nos gânglios linfáticos (Comeford et al., 2013). CCL21 e seu receptor CCR7 são expressos no tecido adiposo em -4, 1 e 16 semanas pós parto em vacas com balanço energético negativo severo e moderado. A expressão de CCL21 é regulada positivamente no tecido adiposo de vacas com balanço energético negativo moderado durante um período de mobilização de alta energia (1 semana pós parto) (Melloouk et al., 2019). Melloouk e colaboradores (2019) sugerem que CCL21 seja considerada uma adipocina, citosina secretada pelo tecido adiposo.

Já a quimiocina CXCL17 é uma pequena citocina, que pertence à família CXC e atrai células dendríticas e monócitos (Pisabarro et al., 2006). CXCL17, exibe um padrão de expressão abundante e específico em locais de mucosas, mas o significado funcional de seu perfil de expressão específico ainda é indeterminado. Estudos documentaram sua capacidade de recrutar células imunológicas, anti-inflamatórias e até antibacterianas, sugerindo sua atuação como uma quimiocina homeostática. O papel do CXCL17 na angiogênese e na tumorigênese também foi demonstrado em diferentes tipos de tumores. Ainda assim, nota-se que não há muita informação sobre o CXCL17, e pesquisas mais específicas devem ser feitas para descobrir seu receptor, ainda indeterminado, sua função fisiológica e até mesmo seu papel na imunidade tumoral (Xiao, Xie & Zhou, 2021).

O gene COLEC12, também regulado negativamente no grupo de baixa eficiência alimentar, codifica uma lectina do tipo C, conhecida como colectina 12 ou CL-P1, cujo objetivo é a ligação às estruturas dos carboidratos encontrados nos patógenos invasores. Ela é responsável pela formação de um receptor que apresenta diversas funções associadas à defesa do hospedeiro, que promove a ligação e a fagocitose de bactérias e leveduras Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso, também medeia o reconhecimento, internalização e degradação da lipoproteína de baixa densidade modificada oxidativamente (oxLDL) pelas células endoteliais vasculares, ligando-se a vários carboidratos, incluindo ligantes do tipo Gal, D-galactose, L- e D-fucose. (UNIPROT, 2019). Em um trabalho realizado com 10300 taiwaneses, Lin e colaboradores (2017) realizaram uma análise por GWAS, relacionando a síndrome metabólica com SNPs, e encontrou uma associação com o SNP rs16944558 no gene COLEC12, que também foi relacionado a valores de triglicérides elevados e colesterol HDL baixos. Os autores relacionaram esta associação ao fato de a COLEC12 estar envolvido no metabolismo lipídico, uma vez

que ela desempenha um papel na mediação da captação de lipoproteína de baixa densidade oxidada nas células endoteliais vasculares.

Além dos DEGs relacionados ao sistema imunológico, na análise de ontologia gênica, destacamos o processo biológico “regulação negativa da migração de leucócitos” como o de maior força, evidenciando que o sistema imunológico contribui de alguma forma com a dinâmica da eficiência alimentar. O fígado humano muitas vezes não é associado a um órgão imunológico, pois está envolvido principalmente em atividades metabólicas, de armazenamento de nutrientes e de desintoxicação. No entanto, atualmente sabemos que o fígado saudável é também um local de atividade imunológica complexa mediada por um repertório diversificado de células imunes e citocinas. Neste contexto, os agentes imunológicos hepáticos toleram moléculas inofensivas, ao mesmo tempo que permanecem alerta a possíveis agentes infecciosos, células malignas ou danos nos tecidos. Após a ativação imunológica apropriada para o desafio por patógenos ou danos nos tecidos, os mecanismos para resolver a inflamação são essenciais para manter a homeostase hepática. Falhas nesses mecanismos podem levar a inflamação local, perda de função e até fibrose, cirrose e insuficiência hepática (Robinson, Harmon e O’Farrelly, 2016). No fígado ativado ocorre um desbalanço, pois ele precisa produzir mais substâncias do que um fígado em estado normal. Num indivíduo saudável, o fígado produz uma gama de proteínas séricas, incluindo albumina, fatores de coagulação e complemento. Durante a infecção aguda, os hepatócitos são induzidos a produzir uma série de proteínas antimicrobianas, mediadores inflamatórios, fatores de coagulação e opsoninas, para ativação da resposta de fase aguda. Este desbalanço pode estar envolvido na perda da eficiência alimentar, pois além de comprometer as funções de metabolismo do fígado, pode estar aumentado o gasto energético para a produção de substâncias do sistema imunológico (Robinson, Harmon e O’Farrelly, 2016).

Em um trabalho de Salleh e colaboradores (2017), que analisou o transcriptoma hepático por RNA-seq de vacas leiteiras com baixo e alto valor de CAR, foi destacado a importância dos genes GIMAP para a característica EA, uma vez que o gene GIMAP4 foi significativamente mais expresso em vacas Jersey de alta EA do que em vacas Jersey de baixa EA. Em outro trabalho, Salleh e colaboradores (2018) analisaram dados transcriptômicos de RNA-seq do fígado de vacas das raças Jersey e Holandesa, com baixo e alto valor de CAR, que foram integrados a dados genômicos por SNP (777k *BovineHD Illumina BeadChip*) para detecção de expressão de loci de características quantitativas (eQTLs), que são variantes genéticas que regulam os níveis de expressão gênica. Dois principais genes candidatos foram destacados neste trabalho, BDH2 e GIMAP4. A expressão do gene BDH2 foi regulada negativamente em animais com alto CAR (baixa eficiência alimentar). BDH2 codifica a enzima 3-hidroxibutirato desidrogenase 2, que é responsável pela degradação do 3-hidroxibutirato, um corpo cetônico derivado em parte da fermentação ruminal e em parte da oxidação incompleta de ácidos graxos no fígado (Geisler et al., 2016). O GIMAP4, outro gene candidato encontrado pelos autores, que pertence à família GIMAP, e o único membro relatado como tendo atividade GTPase verdadeira, possui sua transcrição regulada diferencialmente durante a diferenciação inicial de linfócitos T auxiliares CD4⁺ (Th) humanos. O GIMAP4 foi previamente relacionado principalmente ao desenvolvimento e sobrevivência de células T e B e à apoptose de células T (Heinonen et al, 2015). Uma explicação possível é que animais com pior função imunológica são mais propensos a desenvolver doenças infecciosas como, por exemplo, mastite, e isso pode reduzir a produção de leite, induzir aumento do metabolismo associado à febre e, portanto, aumentar o gasto de energia por kg de leite produzido, o que consequentemente poderia reduzir sua eficiência alimentar (Salleh et al., 2018)

Um outro trabalho de Salleh e colaboradores (2018) fornece informações sobre as funções biológicas do fígado que estão potencialmente envolvidas no controle da EA. Genes também relacionados ao sistema imune, como o IFNG e IL10RA, foram destacados como potenciais genes candidatos para o desenvolvimento de novos biomarcadores de eficiência alimentar.

Fonseca e colaboradores (2019), avaliaram touros da raça Nelore para EA usando amostras de fígado. Foram coletados seis animais com alta EA e seis animais com baixa EA, para extração, digestão e análise de proteínas por HPLC-MS/ EM. Os

dados foram analisados quanto a proteínas abundantes diferenciais (DAPs), redes de proteínas e enriquecimento funcional. Foram encontradas 42 DAPs e as principais vias associadas foram: metabolismo microbiano; biossíntese de ácidos graxos, aminoácidos e vitaminas; glicólise/gluconeogênese; metabolismo xenobiótico e processamento e apresentação do antígeno.

Além desses achados em transcriptoma hepático, sabe-se que no início do pós-parto, as vacas leiteiras são caracterizadas por imunossupressão afetando a imunidade inata e adaptativa, incluindo a imunidade celular e humoral (Cheng et al., 2022). Estudos mostraram uma redução tanto no número de leucócitos quanto em sua capacidade funcional durante o período periparto. Os efeitos relatados incluem fagocitose prejudicada e atividade de explosão oxidativa, uma diminuição da capacidade de resposta das células T circulantes a agentes mutagênicos e produção reduzida de imunoglobulina pelas células B (Ingvarsen & Moyes, 2013). As causas são multifatoriais, mas parecem ligadas à partição de nutrientes em favor da produção de leite no início da lactação, comprometendo a função imunológica (Horst et al., 2021).

Todos estes trabalhos, portanto, corroboram nossos resultados, mostrando que a eficiência alimentar está intimamente relacionada com o funcionamento do sistema imunológico.

Os genes FBLN1, FBLN2, e FBLN7 foram menos expressos no grupo BE. Eles codificam as proteínas de matriz extracelular (MEC) do tipo fibulina. As fibulinas são uma família de glicoproteínas secretadas, que desempenham um papel importante na regulação de múltiplas funções celulares, como adesão, crescimento, motilidade e sobrevivência. Até o momento, foram identificadas oito fibulinas (fibulina 1 a 8), com todas compartilhando um domínio C-terminal conservado do tipo fibulina (Chakraborty, Dash, & Sarangi, 2020). O gene FBLN1 foi menos expresso no rúmen, em um grupo de novilhos de raças de corte de baixo ganho de peso, quando comparado ao grupo de alto ganho (Kern et al., 2016). Um estudo de Hong *et al.* (2019), por associação genômica ampla (GWAS), realizado para investigar marcadores genéticos associados às características da carcaça do novilho Hanwoo (*gado nativo coreano*), com *Bovine SNP50K BeadChip*, analisou cinco características específicas de carcaça e foram identificados dois genes candidatos para a características espessura de gordura dorsal, sendo FBLN2 um dos genes. No trabalho semelhante ao nosso, que avaliou o transcriptoma hepático por RNA-seq de novilhos

de corte, encontrou que nas raças Charolês e Kinsella Composite o gene FBLN-2 foi diferencialmente expresso entre os grupos contrastantes para a característica de peso corporal metabólico (Mukiibi et al., 2019). Além das interações célula-célula e célula-matriz em processos fisiológicos, a FBLN7 também inibe o processo de angiogênese ou a formação de novos vasos sanguíneos (De Vega et al., 2014). Na revisão de Chakraborty, Dash, & Sarangi (2020) foi relatado o papel da fibulina 7 no controle da angiogênese, na formação dentária, na resposta imune, inibindo as propriedades inflamatórias de monócito e macrófago e em algumas patologias como o glaucoma e o câncer, especialmente em gliomas. A administração intravenosa de FBLN7-C em um modelo de endotoxemia de inflamação sistêmica inibiu a infiltração de macrófagos e neutrófilos e reduziu a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) nos macrófagos isolados do peritônio de camundongos injetados com lipopolissacarídeo (Sarangi et al., 2018).

DPT, outro gene ligado a formação de MEC, também se apresentou regulado negativamente no grupo de BE. Este gene codifica a dermatopontina, uma proteína de matriz não colágena, conhecida por sua impressionante capacidade de promover a adesão celular. A dermatopontina, proteína de matriz ácida rica em tirosina, purificada pela primeira vez na derme bovina, é conhecida por interagir com o fator de crescimento beta 1 (TGF β 1), fibronectina e decorina, assumindo assim um papel importante no processo de cicatrização de feridas. Além disso, a dermatopontina regula ainda a arquitetura da MEC através da aceleração da fibrinogênese do colágeno e da fibronectina. (Krishnaswamy & Korrapati, 2014).

Além dos genes FBLN1, FBLN2, FBLN7 e DPT, outros genes que codificam proteínas de MEC foram menos expressos no grupo de baixa eficiência, como LUM, LAMC2, COL1A2 e COL16A1. Na análise funcional GO, muitos processos envolvendo a MEC foram enriquecidos, como a “regulação negativa da motilidade celular”, “regulação negativa da migração celular”, “organização da matriz extracelular”, “adesão celular” etc. Já em relação ao componente celular, na análise de ontologia gênica, foram enriquecidos cinco termos: “trímero de colágeno fibrilar”, “trímero de colágeno”, “matriz extracelular contendo colágeno”, “matriz extracelular” e “espaço extracelular” (Tabela 7). Esses cinco termos estão relacionados entre si, uma vez que o colágeno está presente na MEC, que é a estrutura de suporte que envolve as células hepáticas (hepatócitos) e outros componentes do tecido hepático. No fígado normal, a MEC presente no espaço de Disse é composta por glicoproteínas como fibronectina,

fibulina e laminina, colágeno tipo IV (não fibrogênico) e proteoglicanos. Esses componentes formam uma matriz semelhante a uma treliça, essencial para fornecer suporte mecânico e também sinais moleculares para o bom arranjo e funcionamento das células do fígado. Quando há lesão hepática, a composição e a densidade da MEC mudam. Há um aumento de quase seis a oito vezes na produção de componentes de MEC e o colágeno tipo IV não fibrogênico é substituído por colágeno tipo I e II fibrogênico (Acharya et al., 2021).

Estes resultados demonstraram que existe uma forte associação do papel da MEC do fígado com a característica eficiência alimentar. É provável que a composição e estruturação da MEC hepática interfira no trânsito de moléculas, e na comunicação celular, podendo assim interferir nas funções hepáticas. Mais estudos precisam ser realizados nesta área.

Entre os DEGs encontrados neste trabalho, muitos tem a nomenclatura inicial "LOC". Os códigos "LOC" geralmente são usados para designar locais não identificados ou loci genômicos específicos, mas sem atribuição direta de um gene conhecido. Quando o código "LOC" é seguido por números, isso indica uma localização específica no genoma, mas sem uma designação específica para um gene identificado. Há poucas informações sobre estes na literatura e é preciso avançar o conhecimento sobre a função destas regiões do genoma bovino. Foi mostrado que LOC112448801 e LOC112444174, menos expressos no grupo BE e baixo valor de *p-value*, são RNAs longos não codificantes (lncRNA) pouco estudados, localizados nos cromossomos bovinos 11 e 24 respectivamente. Os lncRNAs são definidos como transcritos de RNA com mais de 200 nucleotídeos que não codificam proteínas, sendo eles próprios são as unidades funcionais, tornando sua localização subcelular crítica para sua função. A descoberta de dezenas de milhares de lncRNAs e as evidências cumulativas envolvendo-os em quase todas as atividades celulares tornam a avaliação de sua localização essencial para a compreensão completa de sua função. A grande maioria dos lncRNAs passa por extenso splicing alternativo, aumentando dramaticamente seu número potencial de isoformas (Deveson et al., 2018). Chen et al. (2020) encontraram em seu trabalho de estudo de associação de SNPs com a característica temperamento para leite, a região onde está localizado o LOC112448801 como um possível gene candidato. Mais estudos precisam ser feitos para entender a verdadeira função destes lncRNAs na eficiência alimentar.

Mais estudos são necessários para o completo entendimento da característica EA em gado de leite, uma vez que ela é multifatorial e relacionada ao organismo como um todo. Embora o tecido hepático seja relevante para processos metabólicos e fisiológicos relacionados à eficiência alimentar, outros tecidos ou sistemas biológicos também podem desempenhar papéis importantes nesse fenótipo, como o tecido adiposo, o sistema digestivo, sistema endócrino, glândula mamária e sistema imunológico. Portanto, a análise exclusiva do tecido hepático pode não capturar completamente a complexidade da eficiência alimentar.

Embora o RNA-seq seja uma técnica valiosa para identificar genes diferencialmente expressos, não é uma medida direta da expressão de proteínas. A expressão gênica e a expressão de proteínas nem sempre são correlacionadas de forma direta e linear devido a vários fatores, como a regulação pós-transcricional, a estabilidade do mRNA, a eficiência de tradução e a presença de *splicing* alternativos. Portanto, para uma compreensão mais abrangente dos mecanismos subjacentes à eficiência alimentar, estudos complementares de análises de expressão de proteínas poderiam ser realizados, como *Western blotting*, imuno-histoquímica, dentre outros. Isso poderia fornecer uma visão mais completa e robusta das alterações moleculares associadas à eficiência alimentar em bovinos leiteiros.

7. CONCLUSÕES

A comparação entre os grupos de alta e baixa eficiência alimentar revelou 149 genes diferencialmente expressos, sendo 41 regulados positivamente e 109 negativamente no grupo de baixa eficiência. Dentre esses DEGs, destacaram-se alguns como potenciais genes candidatos, tais como DLK1, CACNG4, SCL2A12, SCL26A4, DUOX2, DUOX2 e COLEC12.

As análises de enriquecimento funcional evidenciaram que os DEGs participam de vias específicas, possivelmente influenciando a EA, como a regulação negativa da migração de leucócitos, a regulação da atividade do canal de cálcio, a regulação negativa da migração e adesão celular, organização da matriz extracelular (MEC) e síntese de hormônio tireoidiano. Logo, foi demonstrada a importância do transporte de solutos, da composição da MEC e do sistema imunológico na EA, mas é necessária a realização de estudos mais aprofundados nesses genes e vias para uma elucidação mais precisa de seu papel na EA.

Deste modo, novas descobertas e perspectivas sobre a base genética da eficiência alimentar em bovinos leiteiros foram relatadas. Alguns genes previamente identificados foram apoiados e novas vias de controle da eficiência alimentar em bovinos Girolando F1 foram descobertas. Esses resultados ampliam nossa compreensão dos mecanismos relacionados à EA em bovinos de leite, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias de seleção visando o melhoramento da característica EA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, P., CHOUHAN, K., WEISKIRCHEN, S. & WEISKIRCHEN, R. Cellular mechanisms of liver fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 671640, 2021.
- AFRC, 1993. Energy and protein requirements of ruminants. An Advisory Manual Prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. CAB International, 1993.
- ALBRECHT, E., KUZINSKI, J., KOMOLKA, K., GOTOH, T., & MAAK, S. Localization and abundance of early markers of fat cell differentiation in the skeletal muscle of cattle during growth-Are DLK1-positive cells the origin of marbling flecks? **Meat science**, v. 100, p. 237-245, 2015.
- ALEXANDRATOS, N., & BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. **ESA Working paper** No. 12-03. FAO, Rome, Italy 2012.
- ANDERS, S., PYL, P. T., & HUBER, W. HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, 31(2), 166-169, 2015.
- ANDREWS, S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. 2010.
- ARTHUR, P. F., J. A. ARCHER, D. J. JOHNSTON, R. M. HERD, et al. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2805–2811, 2001.
- AYCAN, Z., CANGUL, H., MUZZA, M., BAS, V. N., FUGAZZOLA, L., CHATTERJEE, V. K., PERSANI, L. & SCHOENMAKERS, N. Digenic DUOX1 and DUOX2 mutations in cases with congenital hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 9, p. 3085-3090, 2017.
- BERRY, D. P., CROWLEY, J. J. Cell biology symposium: genetics of feed efficiency in dairy and beef cattle. **Journal of animal science**, v. 91, n. 4, p. 1594-1613, 2013.
- BIONAZ, M. Nutrigenomics approaches to fine-tune metabolism and milk production: Is this the future of ruminant nutrition? **Advances in Dairy Research**, p. 1-2, 2014.
- BOLGER, A. M., LOHSE, M. & USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- CHAKRABORTY, P., DASH, S. P., & SARANGI, P. P. The role of adhesion protein Fibulin7 in development and diseases. **Molecular Medicine**, v. 26, p. 1-7, 2020.
- CHEN, S. Y., OLIVEIRA, H. R., SCHENKEL, F. S., PEDROSA, V. B., MELKA, M. G., & BRITO, L. F. Using imputed whole-genome sequence variants to uncover candidate mutations and genes affecting milking speed and temperament in Holstein cattle. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 11, p. 10383-10398, 2020.
- CHEN, S., ZHOU, Y., CHEN, Y. & GU, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884-i890, 2018.
- CHENG, Z., MCLAUGHLIN, D. L., LITTLE, M. W., FERRIS, C., SALAVATI, M., INGVARSEN, K. L., CROWE, M.A., WATHES D. C. & GPLUSE CONSORTIUM. Proportion of concentrate in the diet of early lactation dairy cows has contrasting effects on circulating leukocyte global transcriptomic profiles, health and fertility according to parity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 39, 2022.

COMERFORD, I., HARATA-LEE, Y., BUNTING, M. D., GREGOR, C., KARA, E. E. & MCCOLL, S. R. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 24, n. 3, p. 269-283, 2013.

CONNOR, E. E. Invited review: Improving feed efficiency in dairy production: Challenges and possibilities. **Animal**, v.9, p.395-408, 2015.

CORCHETE, L. A., ROJAS, E. A., ALONSO-LÓPEZ, D., DE LAS RIVAS, J., GUTIÉRREZ, N. C. & BURGUILLO, F. J. Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, 19737, 2020.

COSTA-SILVA, J., DOMINGUES, D. & LOPES, F. M. RNA-seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0190152, 2017.

DE HAAS, Y., WINDIG, J. J., CALUS, M. P. L., DIJKSTRA, J., DE HAAN, M., BANNINK, A. & VEERKAMP, R. F. Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 12, p. 6122-6134, 2011.

DE VEGA, S., SUZUKI, N., NONAKA, R., SASAKI, T., FORCINITO, P., ARIKAWA-HIRASAWA, E. & YAMADA, Y. A C-terminal fragment of fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 545, p. 148-153, 2014.

DELGADO, P. A. M., CALDERÓN, L. G. R., ALDANA, A. M., & PENAGOS, C. E. L. Desempeño productivo y reproductivo de vacas F1 Gyr x Holstein en clima cálido colombiano. **Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)**, v. 6, n. 1, p. 17-23, 2012.

DEVESON, I. W., BRUNCK, M. E., BLACKBURN, J., TSENG, E., HON, T., CLARK, T. A., CLARK, M. B., CRAWFORD, J., DINGER, M. E., NIELSEN, L. K., MATTICK, J. S. & MERCER, T. R. Universal alternative splicing of noncoding exons. **Cell Systems**, v. 6, n. 2, p. 245-255. e5, 2018.

DONKIN, S. S. The role of liver metabolism during transition on postpartum health and performance. Florida Ruminant Nutrition Symposium Proceedings 23rd Meeting, p. 97-106, 2012.

DRACKLEY, J. K., DANN, H. M., DOUGLAS, N., GURETZKY, N. A. J., LITHERLAND, N. B., UNDERWOOD, J. P., & LOOR, J. J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. **Italian Journal of Animal Science**, v. 4, n. 4, p. 323-344, 2005

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Anuário Leite 2022: pecuária leiteira de precisão**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 114, 2022.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO publications catalogue 2023**. Rome, 148 p. 2023

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food Outlook: Biannual Report On Global Food Markets**. Trade and Market Division of FAO. Rome, Italy, 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb9427en/cb9427en.pdf>>. Acesso em: março de 2023.

FERREIRA, J. A.; ZWINDERMAN, A. H. On the benjamini-hochberg method. **The Annals of Statistics**, v. 34, n. 4, p. 1827-1849, 2006.

- FINOTELLO, F. & DI CAMILLO, B. Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. **Briefings in functional genomics**, v. 14, n. 2, p. 130-142, 2015.
- FONSECA, L. D., ELER, J. P., PEREIRA, M. A., ROSA, A. F., ALEXANDRE, P. A., MONCAU, C. T., SALVATO, F., ROSA-FERNANDES, L., PALMISANO, G. FERRAZ, J. B. S. & FUKUMASU, H. Liver proteomics unravel the metabolic pathways related to feed efficiency in beef cattle. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 5364, 2019.
- FREDRIKSSON, R., NORDSTRÖM, K. J., STEPHANSSON, O., HÄGGLUND, M. G. & SCHIÖTH, H. B. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. **FEBS letters**, v. 582, n. 27, p. 3811-3816, 2008.
- GEISLER, C. E., HEPLER, C., HIGGINS, M. R., & RENQUIST, B. J. Hepatic adaptations to maintain metabolic homeostasis in response to fasting and refeeding in mice. **Nutrition & metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2016.
- HÄGGLUND, M. G., HELLSTEN, S. V., BAGCHI, S., PHILIPPOT, G., LÖFQVIST, E., NILSSON, V. C., ALMKVIST, I., KARLSSON, E., SREEDHARAN S., TAFRESHIHA A. & FREDRIKSSON, R. Transport of L-glutamine, L-alanine, L-arginine and L-histidine by the neuron-specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. **Journal of molecular biology**, v. 427, n. 6, p. 1495-1512, 2015.
- HEINONEN, M. T., KANDURI, K., LÄHDESMÄKI, H. J., LAHESMAA, R. & HENTTINEN, T. A. Tubulin-and actin-associating GIMAP4 is required for IFN- γ secretion during Th cell differentiation. **Immunology and cell biology**, v. 93, n. 2, p. 158-166, 2015.
- HERD, R. M. & ARTHUR, P. F. Physiological basis for residual feed intake. **Journal of animal science**, v. 87, n. suppl_14, p. E64-E71, 2009.
- HERRERO, M., HENDERSON, B., HAVLÍK, P., THORNTON, P. K., CONANT, R. T., SMITH, P., WIRSENIUS, S., HRISTOV, A. N., GERBER, P., GILL, M., BUTTERBACH-BAHL, K., VALIN, H., GARNETT, T. & STEHFEST, E. Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. **Nature Climate Change**, v. 6, n. 5, p. 452-461, 2016.
- HONG, M., CHOI, S., SINGH, N. K., KIM, H., YANG, S., KWAK, K., KIM J. & LEE, S. Genome-wide association analysis to identify QTL for carcass traits in Hanwoo (Korean native cattle). **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 89, n. 1, p. 57-62, 2019.
- HORST, E.A., KVIDERA, S.K., BAUMGARD, L.H. Invited review: The influence of immune activation on transition cow health and performance-A critical evaluation of traditional dogmas. **Journal of Dairy Science**, 104, p. 8380-8410, 2021.
- INGVARTSEN, K.L. & MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, 7 (Suppl. 1), p. 112-122, 2013.
- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). Alimentation des bovins, ovins et caprins: Besoins des animaux-Valeurs des aliments. Tables INRA 2007. Editions Quae, c/o INRA, Versailles, France, 2007.
- JIANG, Q., SHERLOCK, D. N., GUYADER, J., & LOOR, J. J. Abundance of Amino Acid Transporters and mTOR Pathway Components in the Gastrointestinal Tract of Lactating Holstein Cows. **Animals**, v. 13, n. 7, p. 1189, 2023.
- KADARMIDEEN, H. N. Genomics to systems biology in animal and veterinary sciences: progress, lessons and opportunities. **Livestock Science**, v. 166, p. 232-248, 2014.
- KERN, R. J., LINDHOLM-PERRY, A. K., FREETLY, H. C., SNELLING, W. M., KERN, J. W., KEELE, J. W., MILES, J. R., FOOTE, A. P., OLIVER, W. T., KUEHN, L. A. & LUDDEN, P. A.

Transcriptome differences in the rumen of beef steers with variation in feed intake and gain. **Gene**, v. 586, n. 1, p. 12-26, 2016.

KIM, D., LANGMEAD, B. & SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature methods**, v. 12, n. 4, p. 357-360, 2015.

KRISHNASWAMY, V. R. & KORRAPATI, P. S. Role of dermatopontin in re-epithelialization: implications on keratinocyte migration and proliferation. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 7385, 2014.

KÜHNEN, P., TURAN, S., FRÖHLER, S., GÜRAN, T., ABALI, S., BIEBERMANN, H., BEREKET, A., GRÜTERS, A., CHEN, W. & KRUDE, H. Identification of PENDRIN (SLC26A4) mutations in patients with congenital hypothyroidism and “apparent” thyroid dysgenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 1, p. E169-E176, 2014.

KUMAR, V., ABBAS A. K. & ASTER, J. C. Robbins & Coltran - Patologia: bases patológicas das doenças. 9ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 1421 p. 2016.

LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNELL, T., RUAN, J., HOMER, N., MARTH, G., ABECASIS, G. & DURBIN, R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and samtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009.

LIAO, Y., SMYTH, G. K., & SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v. 30, n. 7, p. 923-930, 2014.

LIINAMO, A. E., MÄNTYSAARI, P., LIDAUER, M. H., & MÄNTYSAARI, E. A. Genetic parameters for residual energy intake and energy conversion efficiency in Nordic Red dairy cattle. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, **Animal Science**, v. 65, n. 2, p. 63-72, 2015.

LIN, E., KUO, P. H., LIU, Y. L., YANG, A. C., & TSAI, S. J. Detection of susceptibility loci on APOA5 and COLEC12 associated with metabolic syndrome using a genome-wide association study in a Taiwanese population. **Oncotarget**, v. 8, n. 55, p. 93349, 2017.

LLANOS, E., ASTIGARRAGA, L. & PICASSO, V. Energy and economic efficiency in grazing dairy systems under alternative intensification strategies. **European Journal of Agronomy**, v. 92, n. August 2016, p. 133-140, 2018.

LOVE, M. I., HUBER, W. & ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 1-21, 2014.

LU, Y., VANDEHAAR, M. J., SPURLOCK, D. M., WEIGEL, K. A., ARMENTANO, L. E., CONNOR, E. E., COFFEY, M., VEERKAMP, R. F., DE HAAS, Y., STAPLES, C. R., WANG, Z. & TEMPELMAN, R. J. Genome-wide association analyses based on a multiple-trait approach for modeling feed efficiency. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 4, p. 3140-3154, 2018.

MCCABE M., WATERS S., MORRIS D., KENNY D., LYNN D. & CREEVEY C. RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2012.

MELLOUK, N., RAME, C., NAQUIN, D., JASZCZYSZYN, Y., TOUZÉ, J. L., BRIANT, E., GUILAUME, D., NTALLARIS, T., HUMBLLOT, P. & DUPONT, J. Impact of the severity of negative energy balance on gene expression in the subcutaneous adipose tissue of periparturient primiparous Holstein dairy cows: Identification of potential novel metabolic signals for the reproductive system. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0222954, 2019.

MOON, Y. S., SMAS, C. M., LEE, K., VILLENA, J. A., KIM, K. H., YUN, E. J., & SUL, H. S. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 15, p. 5585-5592, 2002.

MUKIIBI, R., VINSKY, M., KEOGH, K., FITZSIMMONS, C., STOTHARD, P., WATERS, S. M. & LI, C. Liver transcriptome profiling of beef steers with divergent growth rate, feed intake, or metabolic body weight phenotypes. **Journal of animal science**, v. 97, n. 11, p. 4386-4404, 2019.

NIE, Y., SPEAKMAN, J. R., WU, Q., ZHANG, C., HU, Y., XIA, M., YAN, L., HAMBLY, C., WANG, L. WEI, W., ZHANG, J. G. & WEI, F. Exceptionally low daily energy expenditure in the bamboo-eating giant panda. **Science**, v. 349, n. 6244, p. 171-174, 2015.

NRC, 2001. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC, 2001.

ORIÁ, R. B. & BRITO, G. D. C. Sistema digestório: integração básico-clínica. Editora Edgard Blucher Ltda, 2016.

OSTROWSKA, M., JARCZAK, J. & ZWIERZCHOWSKI, L. Glucose transporters in cattle-A review. **Animal Science Papers and Reports**. Rep, v. 33, n. 3, p. 191-212, 2015.

PAREDES-SÁNCHEZ, F. A., SIFUENTES-RINCÓN, A. M., CASAS, E., ARELLANO-VERA, W., PARRA-BRACAMONTE, G. M., RILEY, D. G., WELSH JR, T. H. & RANDEL, R. D. Novel genes involved in the genetic architecture of temperament in Brahman cattle. **PLoS One**, v. 15, n. 8, p. e0237825, 2020.

PARK, K. J., PARK, H. K., KIM, Y. J., LEE, K. R., PARK, J. H., PARK, J. H., PARK, H. D., LEE, S. Y. & KIM, J. W. DUOX2 mutations are frequently associated with congenital hypothyroidism in the Korean population. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 36, n. 2, p. 145, 2016.

PISABARRO, M. T., LEUNG, B., KWONG, M., CORPUZ, R., FRANTZ, G. D., CHIANG, N., VANDLEN R., DIEHL L. J., SKELTON N., KIM H. S., EATON D. & SCHMIDT, K. N. Cutting edge: novel human dendritic cell-and monocyte-attracting chemokine-like protein identified by fold recognition methods. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 4, p. 2069-2073, 2006.

R CORE TEAM. _R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. <<https://www.R-project.org/>>.

RANGANATHAN, J., VENNARD D., WAITE R., DUMAS P., LIPINSKI B., SEARCHINGER T. AND GLOBAGRI-WRR MODEL AUTHORS. Shifting diets: Toward a sustainable food future. In: 2016 Global Food Policy Report. IFPRI. Washington, v. 11, p. 1-90, 2016.

REBEH, I. B., YOSHIMI, N., HADJ-KACEM, H., YANOHCO, S., HAMMAMI, B., MNIF, M., ARAKI, M., GHORBEL, A., AYADI, H., MASMOUDI, S. & MIYAZAKI, H. Two missense mutations in SLC26A4 gene: a molecular and functional study. **Clinical genetics**, v. 78, n. 1, p. 74-80, 2010.

RITZEL, M. W. L., NG, A. M. L., YAO, S. Y. M., GRAHAM, K., LOEWEN, S. K., SMITH, K. M., RITZEL, R. G., MOWLES, D. A., CARPENTER, P., CHEN, X.-Z., KARPINSKI, E., HYDE, R. J., BALDWIN, S. A., CASS, C. E., YOUNG, J. D. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na(+)-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2914-2927, 2001.

ROBINSON, M. W., HARMON, C. & O'FARRELLY, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. **Cellular & molecular immunology**, v. 13, n. 3, p. 267-276, 2016.

RUIZ-DE-LA-CRUZ, G., SIFUENTES-RINCÓN, A. M., PAREDES-SÁNCHEZ, F. A., PARRA-BRACAMONTE, G. M., CASAS, E., WELSH JR, T. H., RILEY, D. G., PERRY, G. & RANDEL, R. D. Characterization of intronic SNP located in candidate genes influencing cattle temperament. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 52, p. e20220057, 2023.

SALLEH, M. S., MAZZONI, G., HÖGLUND, J. K., OLIJHOEK, D. W., LUND, P., LØVENDAHL, P. & KADARMIDEEN, H. N. RNA-seq transcriptomics and pathway analyses reveal potential regulatory genes and molecular mechanisms in high-and low-residual feed intake in Nordic dairy cattle. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2017.

SALLEH, S. M., MAZZONI, G., LØVENDAHL, P. & KADARMIDEEN, H. N. Gene co-expression networks from RNA sequencing of dairy cattle identifies genes and pathways affecting feed efficiency. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2018.

SALLEH, S. M., MAZZONI, G., NIELSEN, M. O., LØVENDAHL, P. & KADARMIDEEN, H. N. Identification of expression QTLs targeting candidate genes for residual feed intake in dairy cattle using systems genomics. **Journal of Genetics and Genome Research**, v. 5, n. 1, 2018.

SARANGI, P. P., CHAKRABORTY, P., DASH, S. P., IKEUCHI, T., DE VEGA, S., AMBATIPUDI, K. Cell adhesion protein fibulin-7 and its C-terminal fragment negatively regulate monocyte and macrophage migration and functions in vitro and *in vivo*. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 9, p. 4889, 2018.

SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M., RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v.31, 2006.

SEAL, C. J. & REYNOLDS, C. K. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants. **Nutrition research reviews**, v. 6, n. 1, p. 185-208, 1993.

SILVA, M. V. G. B., FERREIRA JUNIOR, E., PANETTO, J. C. do C., PAIVA, L. de C., MACHADO, M. A., REIS, D. R. de L., DALTRO, D. dos S., NEGRI, R., KLUSKA, S., MARTINS, M. F., BORGES, C. A. V. Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando. Sumário de Touros. Resultado do Teste de Progenie (Avaliação Genética/Genômica). Junho 2022. EMBRAPA, 2022.

SIVAPRAKASAM, S., SIKDER, M. O., RAMALINGAM, L., KAUR, G., DUFOUR, J. M., MOUSTAID-MOUSSA, N., WACHTEL, M. S. & GANAPATHY, V. SLC6A14 deficiency is linked to obesity, fatty liver, and metabolic syndrome but only under conditions of a high-fat diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 5, p. 166087, 2021.

SOLLERO, B. P., GRYNBERG, P. Tutorial para análise funcional a partir de estudos de associação genômica ampla e transcriptômicos utilizando o banco de dados MeSH (Medical Subject Headings) no programa R. EMBRAPA, 2020.

SZKLARCZYK, D., KIRSCH, R., KOUTROULI, M., NASTOU, K., MEHRYARY, F., HACHILIF, R., GABLE, A. L., FANG, T., DONCHEVA, N. T., PYYSALO, S. BORK, P. JENSEN, L. J. & VON MERING, C. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D638-D646, 2023.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D506-D515, 2019.

USDA-NASS (USDA National Agricultural Statistics Service). 2011 Organic Production Survey: Wisconsin, 2012.

VANDEHARR, M. J. Opportunities to improving feed efficiency. In: **Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference**. p. 133-144, 2014.

VANDEHAAR, M. J., ARMENTANO, L. E., WEIGEL, K., SPURLOCK, D. M., TEMPELMAN, R. J. & VEERKAMP, R. Harnessing the genetics of the modern dairy cow to continue improvements in feed efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4941-4954, 2016.

WANG, M., JIANG, P., YU, X., MI, J., BAI, Z., ZHANG, X., LIU Y., FANG X., YANG R. & ZHAO, Z. Analysis of the bovine DLK1 gene polymorphism and its relation to lipid metabolism in Chinese simmental. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 923, 2020.

WANG, Z., GERSTEIN, M. & SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

XIAO, S., XIE, W. & ZHOU, L. Mucosal chemokine CXCL17: What is known and not known. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, n. 2, p. e12965, 2021.

YAN, T., MAYNE C. S., GORDON F. G., PORTER M. G., AGNEW R. E., PATTERSON D. C., FERRIS C. P. & KILPATRICK D. J. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2630-2638, 2010.

YIN, K., BAILLIE, G. J., & VETTER, I. Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. **Molecular pain**, v. 12, p. 1744806916646111, 2016.

ZAMPRONI, I., GRASBERGER, H., CORTINOVIS, F., VIGONE, M. C., CHIUMELLO, G., MORA, S., ONIGATA, K., FUGAZZOLA, L., REFETOFF, S., PERSANI, L. & WEBER, G. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 2, p. 605-610, 2008.

ZWIERZCHOWSKI, L., OSTROWSKA, M., ŻELAZOWSKA, B. & BAGNICKA, E. Single nucleotide polymorphisms in the bovine SLC2A12 and SLC5A1 glucose transporter genes-the effect on gene expression and milk traits of Holstein Friesian cows. **Animal Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 225-235, 2023.