

6. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 12: 953-64. 2005.
7. Kato EE, Pimenta LA, Pereira JF, Almeida MES, Santos MF, Sampaio SC. Crotoxin, a toxin from rattlesnake venom, inhibits endothelial cells function stimulated by tumor cell conditioned medium: in vitro assay. XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/VIII International Symposium on Extracellular Matrix. p.44, 2013.
8. Mantovani, A.; Sazzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 11: 549-55, 2002.
9. Oliveira RBB, Lima TS, Cirillo MC, Sampaio SC. Secretory activity of neutrophils is mediated by macrophages pretreated with crotoxin in co-culture model. *Memórias do Instituto Butantan*, Vol 69 December 2012. XIV Annual Scientific Meeting São Paulo, SP – Brazil. ISSN 1982-3045
- Sampaio, S.C.; Hyslop, S.; Fontes, M.R.; Prado-Franceschi, J.; Zambelli, V.O.; Magro, A.J.; Brigatte, P.; Gutierrez, V.P.; Cury, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicol.* 1: 55(6), 1045-60, 2010, Review.
10. Wang X, Deavers M, Patenia R, Bassett RL Jr, Mueller P, Ma Q, Wang E, Freedman RS. Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of patients with ovarian cancer or benign pelvic disease. *J Transl Med*. 6:4:30, 2006.
11. Wang X, Zhao X, Wang K, Wu L, Duan T. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. *Cancer Sci*. 104(4):516-23, 2013.

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

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

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

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

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

<sup>4</sup>Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Brasil.

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

A seleção para EA é um grande desafio, pois envolve uma combinação de diferentes processos biológicos [4]. Abordagens de biologia de sistemas para análise de dados transcriptômicos podem propiciar a compreensão das complexas funções e interações de genes que trabalham coordenadamente para a expressão dessa característica, tornando possível, no futuro, a sua modulação pela dieta, meio ambiente ou mesmo pela identificação de marcadores moleculares responsáveis pela alteração fenotípica [5].

O presente trabalho, identificou novos genes, funções biológicas e genes reguladores associados a expressão gênica global hepática de animais com alta e baixa eficiência alimentar. **Materiais e métodos:** Noventa e oito animais machos inteiros da raça Nelore foram avaliados quanto à sua EA pela medida de consumo e ganho residual (CGR) [3]. Baseado nos valores extremos

de CGR foram formados dois grupos, um com oito animais de alta eficiência alimentar e outro com oito animais de baixa eficiência alimentar. Amostras de fígado desses animais foram coletadas por biopsia, o seu mRNA foi extraído e posteriormente sequenciado no equipamento Illumina HiSeq 2500. As leituras resultantes do sequenciamento foram avaliadas pelo software FastQC e adaptadores, cauda poliA e bases com baixa qualidade foram removidas pelo software Seqclean. O alinhamento das sequências e a análise de expressão diferencial foram realizados utilizando-se TopHat2/Bowtie2 e Cufflinks2 [4]. A análise de co-expressão gênica foi executada com o pacote WGCNA do R para identificar módulos de genes altamente conectados, [8]. A correlação entre o perfil de expressão gênica desses módulos e o valor de CGR por animal foi calculado para identificar módulos associados à EA. Para a determinação dos genes reguladores dos módulos de interesse, foi utilizado o software Lemon-tree [9], [10]. Finalmente, a co-expressão diferencial entre os grupos de alta e baixa EA foi determinada pela diferença no valor de conectividade dos genes em cada grupo, [8]. Para os genes encontrados em cada abordagem, foi executada uma análise de enriquecimento funcional utilizando-se a ferramenta *on line* GeneCoDis. **Resultados:** Foram identificados 43 transcritos diferencialmente expressos entre os grupos de alta e baixa eficiência alimentar, 23 deles correspondem a genes conhecidos, quatro codificam proteínas não caracterizadas ou pseudogenes recentemente descobertos e 16 são novos transcritos, ou seja, não constam no genoma de referência utilizado (*Bos taurus* UMD 3.1 – ENSEMBL V67). Dentre os transcritos diferencialmente expressos, 17 deles correspondem a apenas uma das diferentes isoformas expressas pelo respectivo gene. Um exemplo é o gene *LDB3* que apresenta 6 isoformas diferentes, mas apenas a isoforma TCONS\_00049442 é diferencialmente expressa (Figura 1). A análise modular de enriquecimento funcional mostrou que os genes diferencialmente expressos estão enriquecidos para ligação de grupo heme, região extracelular, citocromo P450, classe E, grupos I e IV, ligação de íons de metal e atividade de homodimerização de proteína (P-valor corrigido para taxa de falso positivo < 0,05).

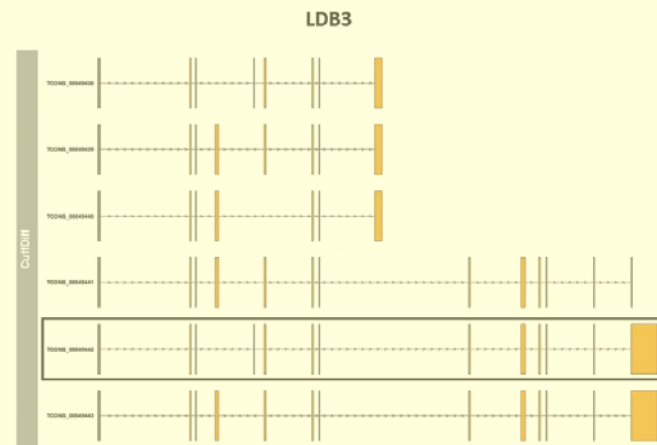


Figura 1 – Isoformas expressas do gene *LDB3*, em destaque a isoforma TCONS\_00049442 expressa diferencialmente entre os grupos de alta e baixa EA.

As análises seguiram no sentido de identificar grupos de genes que apresentam perfil de expressão correlacionados e que, trabalham cooperativamente para uma dada função biológica ou estão sob o controle do mesmo conjunto de fatores de transcrição. A análise de co-expressão identificou 35 módulos de genes co-expressos e altamente conectados, mas apenas dois deles apresentaram correlação com eficiência alimentar e foram chamados de módulo Marrom e módulo Cinza (Figura 2). O módulo Marrom é composto por 155 genes e a análise modular de enriquecimento funcional mostrou que eles são, em sua maioria, constituintes estruturais de ribossomo e estão envolvidos na tradução de proteínas (P-valor corrigido para taxa de falso positivo < 0,05). Já o módulo

Cinza é formado por 34 genes com funções diversas que mostraram estar associadas às vias metabólicas spliceossoma, fagossoma, digestão e absorção de proteínas, degradação de lisina e adesão focal (P-valor corrigido para taxa de falso positivo  $< 0,05$ ). Genes centrais em ambos os módulos, que estão altamente conectados aos demais e apresentam alta correlação com a medida de CGR são considerados genes candidatos para a EA.

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

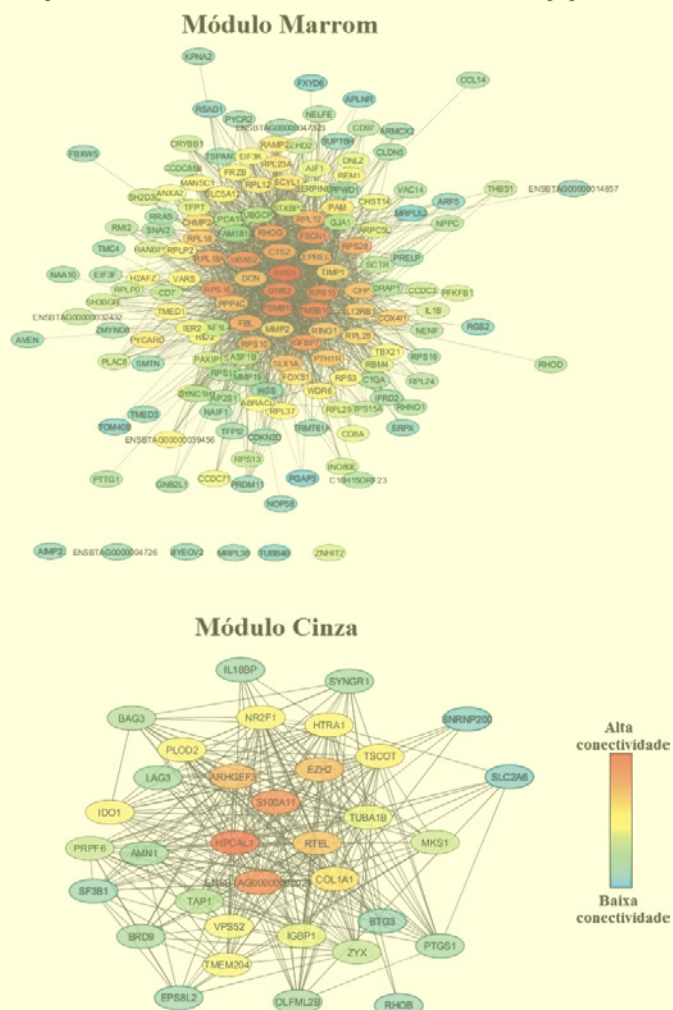


Figura 2 – Módulos Marrom e Cinza. Os nós representam os genes e os vértices o valor de correlação entre genes. Para facilitar a visualização, valores baixos de correlação não foram representados na figura.

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

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

Vários são os mecanismos fisiológicos que provavelmente contribuem para a EA em bovinos [11] [12]. Neste trabalho, diferentes abordagens resultaram indicações de processos biológicos que podem ser importantes na determinação desse fenótipo, como por exemplo, o *splicing* alternativo, que leva a isoformas com implicações diferentes para a característica. Outros termos enriquecidos nas análises como fagocitose, ligação de heme e de íons de metal como o ferro, indicam participação importante da reciclagem tecidual. O grupamento heme também é parte importante do citocromo P450, uma hemoproteína responsável pela metabolização de uma série de enzimas imunológicas do organismo bem como metabolismo de xenobióticos. A função de síntese de proteínas identificada para o módulo Marrom e o metabolismo energético representado pelo enriquecimento de vias como glicólise, frutose, manose e pentoses fosfato, corrobora resultados encontrados anteriormente [13]. **Conclusão:** As diferentes abordagens utilizadas para analisar expressão gênica de amostras de fígado de animais com alta e baixa eficiência alimentar apontaram reciclagem tecidual, metabolismo energético e de xenobióticos, controle de expressão gênica e síntese de proteínas como algumas das diferentes funções biológicas relacionadas a este fenótipo, que é sabidamente complexo e está sob o controle de diversos genes. Abordagens sistêmicas para análise de características complexas nos ajudam a entender melhor os processos fisiológicos relacionados a elas e nos guiam para continuar as investigações no sentido de identificar polimorfismos genéticos causais que nos ajudem na seleção de animais superiores, ou na adequação de técnicas de manejo e nutrição que aumentem a produtividade ao mesmo tempo em que contribuam para a sustentabilidade da criação de gado de corte. **Agradecimentos:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Proc. 2012/14792-3) e de estágio de pesquisa no exterior (Proc. 2014/00307-1) da aluna Pâmela A. Alexandre.

#### Referências Bibliográficas

- Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falucci, A., Tempio, G., 2013. Tackling Climate Change Through Livestock – A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities. Food and Agriculture Organization, Rome.
- Arthur, P.F., Archer, J.A., Herd, R.M., 2004. Feed intake and efficiency in beef cattle: overview of recent Australian research and challenges for the future. Australian Journal of Experimental Agriculture, vol. 44, no. 5, p. 361.
- Nkrumah, J.D., Okine, E.J., Mathison, G.W., Schmid, K., Li, C., Basarab, J.A., Price, M.A., Wang, Z., Moore, S.S., 2006. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. Journal of animal science, vol. 84, no. 1, pp. 145–53.
- Herd, R.M., Arthur, P.F., 2009. Physiological basis for residual feed intake. Journal of Animal Science, vol. 87, no. 14 Suppl, pp. E64–71.
- Fuller, T.F., Ghazalpour, A., Aten, J.E., Drake, T., Lusis, A.J., Horvath, S., 2007. Weighted gene coexpression network analysis strategies applied to mouse weight. Mammalian Genome, vol. 18, no. 6–7, pp. 463–72.
- Berry, D.P., Crowley, J.J., 2012. Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. Journal of Animal Science, vol. 90, no. 1, pp. 109–15.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., Pachter, L., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nature Protocols, vol. 7, no. 3, pp. 562–78.
- Langfelder, P., Horvath, S., 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics, vol. 9, p. 559.

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

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

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

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

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

## CATEGORIA DOUTORADO MEDICINA VETERINÁRIA

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS CENTROS GERMINAIS ESPLÊNICOS DE FRANGOS DE CORTES SUBMETIDOS A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TIPO A

CALEFI, A.S.; NAMAZU, L.B.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; HONDA, B.T.B.; QUINTEIRO-FILHO, W.M.; FONSECA, J.G.S.; FERREIRA, A.J.P.; PALERMO-NETO, J.

Grupo de Neuroimunomodulação – Departamento de Patologia, FMVZ/USP

**Introdução:** A enterite necrótica aviária (NE) é uma doença que acomete aves de produção de duas a seis semanas de vida [1]. O seu agente etiológico primário é o *Clostridium perfringens*, uma bactéria de crescimento em anaerobiose, gram positiva, toxigênica, formadora de esporos [2]. A patogênese da NE é complexa e envolve a associação de diversos fatores, como a co-infecção com espécies de coccidia, imunossupressão e estresse. O estresse é um dos principais fatores limitantes na produção de aves. Dessa forma, é preocupação não somente na NE, mas em toda cadeia de produção animal, visto que foi comprovada a sua relação com uma queda nos parâmetros zootécnicos e modulação do sistema imune [3]. Embora os efeitos do estresse sobre os níveis de imunoglobulinas sejam amplamente enfatizados, poucos são os trabalhos que se dedicam ao estudo dos centros germinais (GC). Os GCs são microambientes especializados, responsáveis pela geração de células imunes com anticorpos de alta afinidade e linfócitos B de memória [4,5]. Sendo assim, este compartimento torna-se importante alvo para elucidar os efeitos do estresse associado com doenças como a NE. O presente trabalho avaliou os efeitos do estresse por calor com e sem a associação da ingestão de caldo tioglicolato e *Clostridium perfringens*, sobre o desenvolvimento dos centros germinais no baço de frangos de corte. **Materiais e métodos:** Para realização dos experimentos foram utilizados 30 frangos de corte, Linhagem Cobb®, machos, adquiridos de incubatório comercial com um dia de vida. Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: 1 – Grupo Controle; 2 – Grupo Controle Estressado (C/Stress); 3 – Grupo Tioglicolato (T); 4 – Grupo Tioglicolato Estressado (T/Stress); 5 – Grupo Infectado (I); 6 – Grupo Infectado Estressado (I/Stress). A infecção experimental com *Clostridium perfringens* tipo A foi efetuada pela via oral, do 15º ao 21º dia de vida nos grupos I e I/HS35. O estresse por calor (35±1°C) foi realizado por aumento da temperatura ambiente do 14º ao último dia experimental (21º dia de vida). Os

animais do grupo Tioglicolato receberam o meio de cultura caldo tioglicolato sem bactérias. As medições dos perfis dos baços foram realizadas pelo método de contagem de pontos. As fotos utilizadas para determinação da área do perfil do baço (Asp) foram tiradas em estereoscópio (Olympus SZX7 e câmera D71) O número de centros germinais por perfil do baço (Ngc) e a área dos centros germinais (Agc) foram estabelecidas com o sistema de contagem de pontos em fotografias microscópicas no aumento de 300x (Nikon Eclipse Ni-U e Nikon câmera DsRi1-U3). As mensurações foram empregadas para a determinação dos parâmetros morfométricos: Número de perfis de GCs por 1 mm<sup>2</sup> de secção do baço (Nagc); Área dos perfis de GCs nas seções do baço (Agc); A densidade de volume dos GCs no baço (Vvgc); Densidade numérica dos GCs no baço (Nvgc); Número total dos GCs no baço (Ngcsp); O diâmetro médio dos GCs (D); A distância do centro germinal mais próximo no plano de corte ( $\Delta_2$ ); A distância do centro germinal mais próximo no espaço ( $\Delta_3$ ) [6]. Os dados foram analisados por teste de análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. A análise de correlação entre todos os parâmetros morfométricos e peso do baço foi determinada pelo produto-momento de Pearson. A correlação pode ser classificada como de intensidade elevada (0,7-1,0), intensidade média (0,5 a 0,7), e de intensidade baixa (0,1 – 0,5). **Resultados:** Os resultados da avaliação morfométrica estão resumidos na tabela 1. A média de Nagc dos animais do grupo I/Stress foi 60% inferior à do grupo I (P < 0,05). De forma semelhante a média de Vvgc no grupo I/Stress é 47% inferior à do grupo I (P > 0,05). Os resultados são comparáveis quando é observada a redução das médias do Nvgc e Ngcsp dos animais estressados e infectados (I/Stress) em comparação aos dos animais do grupo infectado (I; P > 0,05). O estresse por calor *per se* não foi capaz de produzir as diferenças significativas encontradas nos parâmetros Nagc, Vvgc, Nvgc, Ngcsp, D,  $\Delta_2$  e  $\Delta_3$  entre os animais dos diferentes grupos sem considerar os desafios (tioglicolato e bactéria). No entanto foi constatada interação entre os fatores estresse por calor e tratamentos (tioglicolato e infecção) em relação ao Nagc (P < 0,01), Ngcsp (P < 0,05) e Nvgc (P < 0,05). As diferenças dos parâmetros morfométricos entre os animais com diferentes desafios empregados, foram estatisticamente significantes sem considerar o estresse por calor. Os resultados do produto-momento de Pearson dos fatores Nagc, Vvgc, Nvgc, Ngcsp, D,  $\Delta_2$  e  $\Delta_3$  em relação ao peso total do baço apresentaram resultados inferiores a 0,2.

Tabela 1 – Média ± desvio padrão dos parâmetros morfométricos analisados no baço.

Group	Peso do Baço (mg)	Nagc (mm <sup>-2</sup> )	Vvgc (mm <sup>3</sup> /mm <sup>2</sup> )	Nvgc (mm <sup>-2</sup> )	Ngcsp (mm <sup>2</sup> )	D (mm)	(mm)	(mm)
C	579 <sup>a</sup>	0,626 <sup>a</sup>	0,00225 <sup>a</sup>	11,16 <sup>a</sup>	1298 <sup>ab</sup>	0,075 <sup>a</sup>	0,750 <sup>a</sup>	0,294 <sup>a</sup>
	151	0,393	0,00208	16,22	2092	0,026	0,286	0,082
C/Stress	428 <sup>a</sup>	0,546 <sup>ab</sup>	0,00181 <sup>a</sup>	8,93 <sup>a</sup>	600 <sup>a</sup>	0,082 <sup>a</sup>	0,750 <sup>ab</sup>	0,307 <sup>a</sup>
	129	0,223	0,00104	5,25	397	0,042	0,259	0,114
T	483 <sup>a</sup>	1,056 <sup>ab</sup>	0,00328 <sup>a</sup>	16,98 <sup>a</sup>	1564 <sup>ab</sup>	0,071 <sup>a</sup>	0,513 <sup>b</sup>	0,227 <sup>ab</sup>
	116	0,449	0,00269	8,13	881	0,023	0,092	0,038
T/Stress	479 <sup>a</sup>	1,540 <sup>b</sup>	0,00349 <sup>a</sup>	25,84 <sup>a</sup>	2539 <sup>b</sup>	0,059 <sup>a</sup>	0,610 <sup>ab</sup>	0,231 <sup>ab</sup>
	76	2,563	0,00559	43,05	4355	0,066	0,6187	0,226
I	417 <sup>a</sup>	1,49 <sup>b</sup>	0,00479 <sup>a</sup>	23,00a	1292 <sup>a</sup>	0,064 <sup>a</sup>	0,507 <sup>b</sup>	0,213 <sup>ab</sup>
	194	1,622	0,00609	27,97	1904	0,035	0,377	0,131
I/Stress	445 <sup>a</sup>	0,624 <sup>ab</sup>	0,00254 <sup>a</sup>	10,64 <sup>a</sup>	829 <sup>ab</sup>	0,058 <sup>a</sup>	0,427 <sup>b</sup>	0,186 <sup>b</sup>
	186	0,476	0,00298	10,82	763	0,047	0,278	0,124

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas, em P < 0,05 (ANOVA de duas vias seguido de teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

**Conclusões:** O estresse por calor aplicado de forma isolada não é capaz de desencadear alterações sensíveis nos parâmetros morfométricos analisados. Entretanto a associação dos estresse por calor e a ingestão do caldo tioglicolato e/ou infecção experimental desencadeiam alterações significativas no número de centros germinais, tanto no plano bidimensional (Nagc e Vvgc) quanto nas projeções tridimensionais (Ngcsp e Nvgc). A infecção por *C. perfringens* associada ao estresse por calor reduz a formação dos centros germinais esplênicos de frangos de corte sem interferir no diâmetro dos centros germinais e distância entre os mesmos nas projeções bidimensionais e tridimensionais.