

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



**Tese**

**Eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes composições raciais:  
Habilidade materna, reprodução, metabolismo e expressão diferencial de  
genes por meio de sequenciamento de RNA**

**Rodrigo Carneiro de Campos de Azambuja**

**Pelotas, 2017**

**Rodrigo Carneiro de Campos de Azambuja**

**Eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes composições raciais:  
Habilidade materna, reprodução, metabolismo e expressão diferencial de  
genes por meio de sequenciamento de RNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Produção Animal (Melhoramento Genético e Reprodução Animal).

Orientador: Pesq. PhD Fernando Flores Cardoso

Co-orientador: Prof. D. Sc. Augusto Schneider

Prof. D. Sc. Cássio Cassal Brauner

Prof. D. Sc. Marcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A111e Azambuja, Rodrigo Carneiro de Campos de

Eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes composições raciais: Habilidade materna, reprodução, metabolismo e expressão diferencial de genes por meio de sequenciamento de RNA / Rodrigo Carneiro de Campos de Azambuja ; Fernando Flores Cardoso, orientador. — Pelotas, 2017.

148 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. IG636F-I. 2. Inteligência computacional. 3. Produção de leite. 4. Reconcepção. 5. RNA-seq. I. Cardoso, Fernando Flores, orient. II. Título.

CDD : 636.2

**Rodrigo Carneiro de Campos de Azambuja**

**Eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes composições raciais:  
Habilidade materna, reprodução, metabolismo e expressão diferencial de  
genes por meio de sequenciamento de RNA**

**Tese apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Produção Animal), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.**

**Data defesa: 23/02/2017**

**Banca Examinadora**

---

**Pesq. PhD. Fernando Flores Cardoso (Orientador)  
Doutor em Animal Science pela Michigan State University**

---

**Dr. Leandro Lunardini Cardoso  
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

---

**Dr. Nelson José Laurino Dionello  
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas**

---

**Dr. Ricardo Zambarda Vaz  
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

---

**Dr. Sandro da Silva Camargo  
Doutor em Ciência da Computação pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

*Dedico este trabalho a minha família.*

## Agradecimentos

Aos meus pais Julio César e Cláudia, que conduziram a formação do meu caráter pelos caminhos da honestidade, respeito, amor e dignidade. Por sempre mostrarem que o melhor caminho para conquistar meus objetivos é o trabalho. Por terem me dado força e coragem para permanecer e conseguir vencer as barreiras e dificuldades que a vida me proporcionou durante este período, por estarem sempre ao meu lado nos momentos difíceis e por serem grandes pessoas e servirem como grande **EXEMPLO** para mim.

A minha irmã Fernanda pelo amor, carinho e muitas vezes incompreensível compreensão.

Aos meus avós Herculano e Carmen por serem eles mesmos sempre, pelo incentivo a cultura e ao questionamento, na busca por respostas e crescimento pessoal e profissional.

Ao meu avô José Antônio, pelas lições de vida e por me chamar a ouvir seus ensinamentos buscando a volta dos poteiros. A minha avó Maria, por ser exemplo de força.

Ao meu orientador pesquisador Dr. Fernando Flores Cardoso, por confiar em meu trabalho, pela orientação, profissionalismo, amizade, ensinamentos e imprescindível ajuda em todos os momentos.

Aos colegas de Laboratório de Bioinformática e Estatística Genômica da Embrapa Pecuária Sul pela amizade, companheirismo, alegria e os ótimos momentos de trabalho e confraternização.

Aos meus amigos! Meus verdadeiros amigos! Obrigado por entenderem a ausência. Sem vocês a vida não teria sentido! Gracias.

Ao Sr. Ricardo Franco e demais colaboradores da Embrapa Pecuária Sul pelo empenho e apoio fundamental na condução do rebanho experimental.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFPel, pela alegria do convívio durante estes anos de estudo e trabalho.

A todas as pessoas especiais que passaram até este momento por minha vida e que, de alguma forma me apoiaram na conquista deste sonho. Cheguei ao fim de mais uma etapa da grande jornada, obrigado a todos.

Ao “Homem velho lá de cima”! Pela vida, saúde e iluminação do dia a dia.

A Universidade Federal de Pelotas, mais uma vez, pela oportunidade de realização dos estudos.

A CAPES pela bolsa de estudos. Ao CNPq pelo fornecimento dos recursos para o projeto de pesquisa "Avaliação da eficiência produtiva de vacas de corte puras e oriundas de cruzamentos envolvendo as raças Angus, Hereford, Caracu e Nelore no sul do Brasil" (Processo 478699/2010-7).

À Embrapa Pecuária Sul, pela oportunidade oferecida, disponibilização de recursos físicos, humanos e financeiros, por meio do projeto Bifequali - Estratégias genéticas para melhoria da eficiência de produção e da qualidade da carne bovina no Brasil.

## Resumo

AZAMBUJA, Rodrigo Carneiro de Campos. **Eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes composições raciais: Habilidade materna, reprodução, metabolismo e expressão diferencial de genes por meio de sequenciamento de RNA.** 2017. 148f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2017.

O objetivo deste estudo foi determinar as características metabólicas do período de transição e a eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes grupos genéticos criadas no Sul do Brasil, e, a partir destes dados, identificar genes de importância relacionados. Para tal, foram avaliados em vacas de corte de diferentes composições raciais: Produção de leite, constituintes do leite, peso ao desmame dos bezerros, taxa de prenhez, peso e condição corporal em diferentes fases do ciclo produtivo; Concentrações séricas de Beta hidróxi-burirato (BHB), insulina e IGF-I durante o período de transição de gestante a lactante; Aplicadas técnicas de inteligência computacional para identificar padrões sobre o comportamento de hormônios e metabólitos e sua relação com o status reprodutivo; Expressão diferencial de genes no tecido hepático por meio de RNA-seq. Foram utilizados registros de vacas de oito composições raciais: Angus (ANAN), Hereford (HHHH), Nelore (NENE), cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Hereford (ANHH), cruzamento  $\frac{1}{2}$  Hereford  $\frac{1}{2}$  Angus (HHAN), cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Nelore (ANNE), cruzamento  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Angus (NEAN) e cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Caracu (ANCR). Com relação à produção total de leite na lactação (PT210), vacas ANNE foram as mais produtivas, mas não diferiram das NEAN, HHAN e ANCR. Vacas NENE apresentaram as produções mais baixas, apesar de não diferir significativamente das vacas HHHH, ANAN e ANHH. Vacas HHAN e ANCR tiveram produções no pico de lactação (PP) superiores às vacas ANAN, ANHH e NENE, enquanto vacas ANNE e NEAN tiveram PP superior as ANAN e NENE, no entanto não diferindo das demais composições raciais. Vacas ANCR apresentaram menor persistência de lactação (PERS) quando comparadas a vacas ANAN. Bezerros filhos de vacas ANCR, ANNE e NEAN apresentaram-se mais pesados que os filhos de vacas ANAN, ANHH, HHHH e NENE ao desmame, não diferindo dos de vacas HHAN, que por sua vez, também apresentaram bezerros mais pesados que os de vacas HHHH. Vacas ANNE, NEAN, ANCR e HHHH apresentaram teores de gordura superiores que vacas ANAN. Com relação aos dados de proteína, vacas NENE e HHHH, demonstraram superioridade em relação às vacas ANAN, ANHH, HHAN, ANNE. Já para os teores de lactose, vacas ANNE e NEAN mostraram níveis superiores a todos os demais genótipos. Por fim, para sólidos totais, vacas ANNE, NEAN, HHHH e NENE mostraram concentrações superiores ANAN e HHAN. Foram construídas árvores de decisão a partir dos métodos de inteligência computacional com os seguintes graus de precisão para Peso, ECC, Beta-hidroxiburirato, insulina e IGF-I: 59,38%, 59,38%, 71,38%, 78,38% e 90%, respectivamente. O hormônio IGF-I teve o padrão de comportamento mais preditivo do status reprodutivo prenha no ano seguinte, com níveis séricos de IGF-I superiores a 77,03 ng/ml no dia 42 e 50 ng/ml no dia 28 pós-parto. Genes relacionados a proteínas inflamatórias como a haptoglobina e o fator de necrose tumoral estiveram entre os transcritos mais expressos em vacas prenhas no ano



seguinte, enquanto enzimas catabólicas estiveram entre os transcritos mais expressos em vacas vazias. Genes relacionados a enzimas lipolíticas foram detectados como transcritos exclusivos em vacas vazias. Vias metabólicas relativas ao ciclo celular, secreção pancreática, fosforilação oxidativa e digestão e absorção de proteínas apresentaram-se significativamente ativadas (up-regulation) em vacas vazias com relação a vacas prenhas. Processos biológicos relacionados ao ciclo celular, catabolismo de lipídios e respostas imune e inflamatória estiveram significativamente ativados em vacas vazias com relação a vacas prenhas. Processos biológicos relacionados à morfogênese e a resposta ao estímulo de gonadotropinas/ ciclo de ovulação estiveram significativamente inibidos em vacas vazias com relação a vacas prenhas. Concluiu-se que a utilização do cruzamento entre raças com maior distanciamento genético se mostrou um boa alternativa para incrementar os parâmetros relacionados à produção leiteira em vacas de corte, bem como, o peso dos terneiros ao desmame; o hormônio Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-I) pode ser utilizado para predizer a propensão da vaca a ter um diagnóstico de prenhez positivo no ano seguinte; a expressão diferencial de transcritos relacionados a mobilização de reservas teciduais e digestão de nutrientes da dieta em vacas vazias indica que a condição metabólica no pós-parto recente é determinante no status reprodutivo futuro.

Palavras-chave: IGF-I, inteligência computacional, produção de leite, reconcepção, RNA-seq.

## Abstract

AZAMBUJA, Rodrigo Carneiro de Campos. **Production efficiency of beef cows from different racial compositions: Maternal ability, reproduction, metabolism and differential expression of genes by RNA-seq.** 2017. 148f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2017.

The objective of this study was to determine the metabolic traits of the transitional period and the productive efficiency of beef cows from different racial compositions raised in southern Brazil, and from these data to identify related genes of importance. For this purpose, they were evaluated in beef cows of different racial composition: Milk yield, milk constituents, calf weaning weight, pregnancy rate, weight and body condition at different stages of the production cycle; Beta-hydroxybutyrate (BHB), insulin and IGF-I serum concentrations during the transition period from pregnant to lactating; Applied computational intelligence techniques to identify patterns on the hormones and metabolites and their relation with reproductive status; Differential expression of genes in hepatic tissue by RNA-seq. Cows from eight racial compositions were used: Angus (ANAN), Hereford (HHHH), Nelore (NENE),  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Hereford (ANHH),  $\frac{1}{2}$  Hereford  $\frac{1}{2}$  Angus (HHAN),  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Nelore (ANNE),  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Angus (NEAN) and  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Caracu (ANCR). Regarding the total milk production in lactation (PT210), ANNE cows were the most productive but did not differ from NEAN, HHAN and ANCR. NENE cows presented the lowest yields, although they did not differ significantly from HHHH, ANAN and ANHH cows. HHAN and ANCR cows had higher peak lactation (PP) yields than ANAN, ANHH and NENE cows, while ANNE and NEAN cows had PP superior to ANAN and NENE, but did not differ from other breed compositions. ANCR cows presented lower persistence of lactation (PERS) when compared to ANAN cows. Calves from ANCR, ANNE and NEAN cows were heavier than ANAN, ANHH, HHHH and NENE cows at weaning, not differing from HHAN cows, which in turn also had heavier calves than cows HHHH. Angus x Nelore, NEAN, ANCR and HHHH cows presented higher fat contents than ANAN cows. Regarding protein data, NENE and HHHH cows showed superiority in relation to ANAN, ANHH, HHAN, ANNE cows. As for lactose contents, ANNE and NEAN cows showed higher levels than all other genotypes. Finally, for total solids, ANNE, NEAN, HHHH and NENE cows showed higher ANAN and HHAN concentrations. Decision trees were constructed from the computational intelligence methods with the following degrees of accuracy for Weight, ECC, Betahydroxybutyrate, Insulin and IGF-I: 59.38%, 59.38%, 71.38%, 78% 38% and 90%, respectively. The IGF-I hormone had the most predictive pattern of pregnant reproductive status, with serum IGF-I levels above 77.03 ng / ml on day 42 and 50 ng / ml on day 28 postpartum. Genes related to inflammatory proteins such as haptoglobin and tumor necrosis factor were among the most expressed transcripts in pregnant cows, while catabolic enzymes were among the most expressed transcripts in unpregnant cows. Genes related to lipolytic enzymes were detected as exclusive transcripts in unpregnant cows. Metabolic pathways related to cell cycle, pancreatic secretion, oxidative phosphorylation and protein digestion and absorption were significantly up-regulated in unpregnant cows in relation to pregnant cows. Biological

processes related to the cell cycle, lipid catabolism and immune and inflammatory responses were significantly activated in unpregnant cows in relation to pregnant cows. Biological processes related to morphogenesis and responses to gonadotropin/ ovulation cycle were significantly inhibited in unpregnant cows compared to pregnant cows. It was concluded that the use of crosses between breeds with greater genetic distancing proved to be a good alternative to increase the parameters related to milk yield in beef cows, as well as the weight of calves to weaning; The hormone insulin-like growth factor 1 (IGF-I) can be used to predict the propensity of the cow to have a positive pregnancy diagnosis; The differential expression of transcripts related to mobilization of tissue reserves and digestion of dietary nutrients in unpregnant cows indicates that the metabolic condition in the recent postpartum is determinant in the future reproductive status.

Keywords: Computational intelligence, IGF-I, milk production, reconception, RNA-seq.

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Revisão de literatura.....</b>	<b>17</b>
3.1 Cruzamentos e eficiência produtiva de vacas de corte .....	17
3.2 Produção leiteira de vacas de corte .....	19
3.3 Reestabelecimento da função reprodutiva pós-parto .....	22
3.4 Características metabólicas do período de transição e sua repercussão reprodutiva .....	24
3.5 Utilização de inteligência computacional em sistemas biológicos .....	26
3.6 Sequenciamento de RNA e transcriptômica.....	28
<b>4. Artigo 1 – Produção e constituintes do leite de vacas de corte de diferentes composições raciais .....</b>	<b>31</b>
Resumo.....	31
Introdução .....	33
Material e métodos.....	34
Resultados e discussão .....	39
Conclusão .....	46
Referências bibliográficas .....	46
Figuras .....	54
Tabelas .....	56
<b>5. Artigo 2 – Modelagem computacional de indicadores metabólicos para estudo de eficiência reprodutiva em vacas de corte.....</b>	<b>62</b>
Resumo.....	62
Introdução .....	63
Materiais e Métodos .....	66
Resultados e Discussão.....	70
Conclusão .....	79
Referências bibliográficas .....	79
<b>6. Artigo 3 – Análise transcriptômica por meio de RNA-seq do tecido hepático de vacas de corte no pós-parto recente divergentes quanto a re-concepção futura: Prenhas e vazias .....</b>	<b>86</b>

Resumo .....	86
Introdução .....	88
Material e métodos .....	91
Resultados e discussão .....	98
Conclusão .....	124
Agradecimentos .....	125
Referências bibliográficas .....	125
<b>7. Considerações finais .....</b>	<b>135</b>
<b>8. Referências bibliográficas .....</b>	<b>136</b>

## 1. Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, totalizando em torno de 215,2 milhões de cabeças, das quais, aproximadamente, 160 milhões são destinadas à produção de carne (IBGE, 2016). A aptidão do país para a pecuária é favorecida, principalmente, pela disponibilidade de grandes áreas de pastagens, pelo clima favorável e, mais recentemente, pela profissionalização da cadeia produtiva da carne.

Para que o Brasil se mantenha competitivo no mercado de carne bovina e possa buscar nichos de melhor remuneração é necessário atender às crescentes exigências dos clientes internos e externos, fazendo-se necessária a busca por animais que apresentem alto potencial produtivo, precocidade e eficiência reprodutiva, aliadas a uma alta capacidade de adaptação ao ambiente. O desafio é aumentar a produtividade do rebanho, com o inevitável aumento do número de cabeças do rebanho, mas buscando equilíbrio entre preservação ambiental e lucratividade do sistema.

Vislumbrando estes animais mais produtivos e “competitivos”, foram introduzidos na pecuária vários programas de melhoramento animal, que são principalmente baseados na seleção e/ou cruzamentos. A utilização destes métodos resulta em melhor desempenho nas características de importância econômica, sendo possível produzir animais eficientes nos mais diferentes ambientes (ROSO e FRIES, 2000).

A fim de se atingir um maior sucesso econômico na produção de bovinos de corte, um dos fatores que tem sido aperfeiçoado é o melhor aproveitamento da capacidade reprodutiva das vacas (YAVAS e WALTON, 2000). Neste contexto, como regra, características com menor herdabilidade, como aquelas relacionadas com a adaptação e o complexo reprodutivo, respondem melhor ao cruzamento (ROSO e FRIES, 2000).

A habilidade materna envolve dois aspectos primordiais: as relações materno-filiais, que são críticas nas primeiras horas após o parto para a sobrevivência do recém-nascido; e principalmente, a produção de leite adequada ao crescimento do bezerro (CROMBERG e PARANHOS DA COSTA, 1997). Neste sentido, podemos afirmar que além do potencial genético, dos fatores ambientais, sem dúvida, o mais

importante para o crescimento dos bezerros é a alimentação fornecida pela vaca na forma de leite (LIU et al. 2015). Rutledge et al. (1971), destacam que aproximadamente 60% da variação no peso do bezerro aos 205 dias de idade pode ser atribuída à produção de leite materno.

Todavia, a lactação é um estado dominante sobre outras atividades fisiológicas, fazendo com que a vaca priorize a produção de leite para o bezerro em relação à atividade reprodutiva (BAUMAN, 2000). Períodos prolongados de aciclicidade em vacas de corte foram atribuídos aos efeitos da amamentação dos bezerros (LUCY, 2003; WETTEMANN et al., 2003). Neste contexto, vacas de corte pós-parto experimentam infertilidade quando as necessidades de nutrientes para manutenção e lactação excederem a ingestão de nutrientes, caracterizando balanço energético negativo (BEN) (LUCY, 2003). Este BEN do período de transição do final da gestação para o início da lactação é o fator determinante para o prolongamento do anestro pós-parto (BUTLER, 2003). A severidade do BEN pode estar relacionada à adaptabilidade da raça ao bioma, desta forma, possivelmente grupos genéticos mais adaptados às condições ambientais podem apresentar melhor desempenho produtivo.

Outros fatores também contribuem para a ocorrência de BEN pós-parto como a alta demanda de glicose pelo feto e pela glândula mamária e a diminuição da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos no terço final da gestação (HOLTENIUS, 1993). A priorização da produção de leite imediatamente após o parto pode induzir à ocorrência de hipoglicemia pós-parto, o que pode variar em função do grupo genético (PORETSKY et al., 1999). Hormônios metabólicos, tais como hormônio do crescimento (GH), insulina, leptina e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) são importantes mediadores dos efeitos do balanço energético e estão diretamente relacionados com o restabelecimento da ciclicidade pós-parto (PORETSKY et al., 1999).

Tal como acontece com a maioria dos estados metabólicos, alterações na expressão de genes no fígado são centrais no BEN. A redução de receptores para GH no fígado (GHR) leva ao desacoplamento do eixo somatotrópico, onde o fígado permanece sem resposta ao GH e os processos dependentes do GH não são iniciados (FENWICK et al., 2008). Isso predispõe a vaca ao aparecimento do fígado gorduroso, cetose e baixo nível de glicose no sangue (LUCY, 2003). Também

impede os mecanismos hepáticos normais para a partição dos nutrientes durante a fase inicial da lactação (BUTLER, 2003). A falha no aumento de GHR no pós-parto leva a níveis relativamente baixos de IGF-I, pois este último é produzido em resposta à ativação do GHR pelo GH, conseqüentemente temos níveis circulantes mais altos de GH (LUCY, 2003). O GH alto mantém a vaca em estado catabólico. Além disso, IGF-I e insulina atuam sinergicamente como reguladores da esteroidogênese e do crescimento folicular ovariano (BUTLER, 2003). Variações no perfil pós-parto desses hormônios podem ser indicativas para diferenças de adaptação entre indivíduos e grupos genéticos.

Dentro deste escopo, a complexidade inerente a todos estes processos biológicos dificulta sua plena compreensão, principalmente se for utilizada uma abordagem baseada na análise de grandes quantidades de dados, seja por especialistas de domínio humanos, seja por técnicas estatísticas convencionais (CAMARGO et al., 2015). Por outro lado, nos dias atuais, um dos grandes impulsos para o desenvolvimento da computação é o desenvolvimento de modelos algorítmicos com a finalidade de tratar problemas de análise de dados complexos (ENGELBRECHT, 2007). Como consequência deste desenvolvimento, a literatura tem relatado muitos casos de sucesso através da modelagem de inteligência biológica e natural, nas mais variadas áreas de conhecimento, resultando no que se convencionou chamar de "Sistemas Inteligentes" (CAMARGO et al., 2015).

Como exemplos bem sucedidos da aplicação de sistemas inteligentes em problemas da área biológica, para análise de grandes quantidades de dados, podem ser citados a aplicação de redes neurais para detectar padrões de alterações metabólicas envolvidas na ocorrência de mastite (CAMPOS, 2006). Outro exemplo é a utilização técnicas de clustering para identificar os genes diferencialmente expressos em laranjas infectadas por duas bactérias diferentes (BRETON e t al., 2014). Abordagens inteligentes baseadas em regras de associação também foram utilizadas com sucesso para modelar a especificidade da protease do Vírus HIV-1 (CAMARGO e ENGEL, 2006). Desta forma, a utilização de sistemas inteligentes de modelagem computacional aparece como nova alternativa para análise de dados complexos de metabólitos e hormônios no pós-parto recente, e ainda, suas relações com a eficiência reprodutiva de vacas.



Em sentido semelhante, RNA-seq é a nova metodologia de excelência para estudos de determinação da expressão de genes. No entanto, são escassos e iniciais os estudos para sua aplicação na análise da expressão gênica do tecido hepático de bovinos, especialmente no pós-parto recente, fase fundamental para o retorno a atividade reprodutiva em vacas de corte. McCabe et al. (2012), utilizou RNA-seq para estudar diferenças no perfil de expressão de genes hepáticos e suas associações, em vacas leiteiras classificadas como em moderado e severo balanço energético negativo, classificando-as por meio de seu perfil metabólico sanguíneo e eficiência produtiva. O estudo identificou a expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo de gorduras em vacas leiteiras em severo balanço energético negativo, que ainda não haviam sido relatados. Estudos semelhantes em vacas de corte no período de transição ainda não foram relatados, e possíveis interações entre genótipo, condição metabólica e eficiência produtiva devem ser detectadas.

A complexidade de fatores ambientais e genéticos envolvidos na eficiência produtiva de vacas de corte demanda que os estudos nessa linha de pesquisa sejam de longo prazo reunindo a expertise e os recursos de diversas áreas da pesquisa. O presente estudo visa desenvolver conhecimento que permita identificar composições raciais mais adaptadas às condições de criação no sul do Brasil e caracterizar os aspectos maternos, metabólicos, reprodutivos e genéticos determinantes para desempenhos superiores em vacas de corte.

## 2. Objetivos

O objetivo geral desta tese é determinar aspectos da eficiência produtiva e características metabólicas do período de transição de vacas de corte de diferentes grupos genéticos criadas no Sul do Brasil, e a partir destes dados, identificar genes de importância relacionados.

Os objetivos específicos da tese foram:

1. Avaliar a produção e a composição nutricional do leite, e o peso ao desmame dos seus bezerros, de vacas de corte de oito composições raciais (Angus, Hereford, Nelore, Angus x Hereford, Hereford x Angus, Angus x Nelore, Nelore x Angus e Angus x Caracu).
2. Aplicar técnicas de inteligência computacional para modelar o comportamento de indicadores metabólicos durante o período de transição gestante/lactante e suas relações com a eficiência reprodutiva em vacas de corte.
3. Por meio de sequenciamento de RNA, determinar a expressão diferencial de genes no tecido hepático no pós-parto recente de vacas de corte divergentes quanto à re-concepção futura: prenhas e vazias.

### 3. Revisão de literatura

#### 3.1 Cruzamentos e eficiência produtiva de vacas de corte

O cruzamento é amplamente utilizado para melhorar a produtividade de bovinos de corte. Os efeitos desejáveis do cruzamento são oriundos da heterose e da utilização de diferenças entre raças para aperfeiçoar o mérito genético de características produtivas nos mais variados ambientes de produção (GREGORY e CUNDIFF, 1980).

A eficiência produtiva de vacas de corte está diretamente relacionada com precocidade sexual, fertilidade, intervalo de partos, habilidade materna e rusticidade. Como regra, tais características, por possuírem menor herdabilidade, são as que respondem melhor aos cruzamentos, por meio do incremento de desempenho que a heterose e a complementariedade entre raças proporciona (ROSO e FRIES, 2000).

Neste sentido, heterose e complementariedade, fenômenos associados aos cruzamentos, podem ser explorados facilmente. Isto depende apenas da caracterização das raças e de seus cruzamentos, a fim de se encontrar combinações raciais que melhor se ajustem às necessidades do sistema produtivo em questão, bem como às condições ambientais e exigências de mercado de cada região (GREGORY e CUNDIFF, 1980). O grau de heterose obtido nos cruzamentos depende do nível de heterozigose materna e individual, do distanciamento genético entre as raças envolvidas, das frequências gênicas na população, da característica em questão e das interações com o ambiente. Os cruzamentos *Bos indicus* x *Bos taurus* resultam em maior heterose, comparativamente aos cruzamentos *Bos taurus* x *Bos taurus* (ROSO e FRIES, 2000).

A utilização do cruzamento entre raças zebuínas e taurinas tem apresentado resultados positivos por unir a adaptação ambiental do gado zebu, a produtividade do *Bos taurus* e o alto nível de heterozigose produzido (BARCELLOS et al., 1996; CUBAS et al., 2001; GREGORY e CUNDIFF, 1980; OLIVEIRA et al., 2007; PEROTTO et al., 2006; VAZ et al., 2014). Vacas zebuínas (*Bos indicus*) tendem a ser menos férteis e terem níveis mais baixos de produção de leite do que vacas das raças taurinas, mas a sua melhor adaptação às condições ambientais as tornam mais propensas a reproduzir com sucesso nos trópicos (RANDEL, 2005). Neste

contexto, animais cruzados, oriundos do cruzamento entre zebuínos e taurinos, unem a adaptação ambiental do gado zebu e a produtividade do *Bos taurus*.

O peso dos bezerros ao desmame constitui um critério consagrado para julgar a habilidade materna das vacas, uma vez que o mesmo é, em parte, reflexo direto da produção de leite das mesmas (MENDONÇA et al., 2002). Trabalhos como o de Oliveira et al. (2007) estudando o desempenho de bezerros de vacas Nelore e cruzas com Simental e Limousin, perceberam um desempenho superior dos bezerros cruzas no peso ao desmame aos 210 dias com médias de 138,8, 187,1, 175,5 Kg respectivamente. Estes resultados demonstram o ganho obtido com a heterose no desempenho das matrizes para a característica habilidade materna. Da mesma forma, diferentes proporções raciais em cruzamentos envolvendo as mesmas raças tem influência no desempenho das matrizes. Estudando duas composições raciais de vacas de corte, Fagundes et al. (2004), observaram que a composição racial da mãe influencia significativamente o ganho diário médio e peso à desmama dos bezerros, uma vez que bezerros filhos de vacas  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Hereford e  $\frac{1}{4}$  Nelore  $\frac{3}{4}$  Hereford tiveram um GDM de 799 gramas e 727 gramas respectivamente, e um peso a desmama de 211,5 Kg e 193,12 Kg.

Ao utilizar matrizes com maior potencial genético para produção de leite, é necessário considerar as condições nutricionais locais para não prejudicar características relacionadas à eficiência reprodutiva (OLIVEIRA et al., 2007). A produção leiteira está relacionada aos eventos metabólicos do BEN no pós-parto recente, com impacto negativo na reprodução, de acordo com a intensidade do desbalanço energético (LUCY, 2000; 2003). Daley et al. (1987) verificaram que vacas cruzas produziam mais leite, o que ocasionou um maior desgaste destas no pós-parto, por consequência um maior período de anestro pós-parto. Alencar (1987), estudando vacas Canchim (Nelore x Charolês) e Nelore também encontraram tendências de efeito negativo da produção de leite sobre a eficiência reprodutiva pós-parto. Perotto et al. (2006), trabalhando com primíparas, relataram que cada quilograma de aumento no peso do bezerro à desmama aumentou em  $1,49 \pm 0,88$  dias ( $P=0,09$ ) o intervalo de partos que se sucedeu ao nascimento do respectivo bezerro. Pode-se conjecturar que bezerros que ganharam mais peso no período pré-desmama impuseram maior desgaste energético às mães, influenciando negativamente a retomada de sua atividade reprodutiva após o parto.

Por outro lado, vários estudos apontam melhores desempenhos reprodutivos de vacas e novilhas cruzadas, quando comparadas a matrizes de raças puras (GREGORY e CUNDIFF, 1980; NEGUSSIE et al., 1999; RESTLE et al., 1999; ROSO e FRIES, 2000), ou ainda, melhores desempenhos leiteiros e reprodutivos em conjunto (AZAMBUJA, 2013; CERDÓTES et al., 2004). Tal afirmação pode estar relacionada aos benefícios do vigor híbrido para características reprodutivas (ROSO e FRIES, 2000). A diversidade de resultados pode estar relacionada a interações genótipo ambiente, uma vez que determinados cruzamentos apresentam melhores desempenhos reprodutivos em alguns ambientes, enquanto em outros, existem incrementos significativos da heterose na produção leiteira, com prejuízos a reprodução. Um terceiro cenário também pode ser identificado, onde vacas cruzadas apresentam melhores desempenhos tanto na habilidade materna, quanto na reprodução. Tais eventos podem ser explicados por adaptação metabólica e BEN menos severo, em função de maior adequação de um determinado genótipo a determinado ambiente de criação.

### **3.2. Produção leiteira de vacas de corte**

A produção leiteira das matrizes é considerada de grande importância no sistema de produção de bovinos de corte devido à correlação positiva existente com o peso ao desmame do bezerro. O crescimento dos bezerros e a lucratividade dos sistemas de cria estão altamente correlacionados com a produção de leite da vaca de corte, especialmente em ambientes nutricionais não limitativos (BEAL e NOTTER, 1990; MILLER e WILTON., 1999). Estudos demonstram que até 40% das variações no peso do bezerro ao desmame são atribuídos à produção de leite da mãe (ALBUQUERQUE et al., 1993; ROBISON et al. 1978) e aos constituintes do leite produzido (BROWN et al. 2001).

Em relação à curva de lactação, estudos citam a presença de um pico de lactação também em vacas de corte. Jenkins e Ferrell (1992) constataram a ocorrência de pico de lactação entre 8 e 11 semanas pós parto em vacas de corte pertencentes a nove diferentes raças, inclusive Angus e Hereford. O NRC (1996), com base na revisão de trabalhos dirigidos ao estudo da produção de leite de vacas

de corte de diferentes grupos genéticos, estabeleceu que o pico de produção em vacas de corte ocorre ao redor de 8,5 semanas de lactação. Por outro lado, Alencar et al. (1988) observaram redução linear da produção de leite de acordo com o período de lactação e não constatando existência de pico de lactação.

Neste contexto, com relação à influência do genótipo das vacas na produção leiteira no pico de lactação, Albertini et al. (2007), estudando dois genótipos cruzados, relataram produção superior de vacas cruzadas  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Nelore a vacas cruzadas  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Caracu. Já no estudo de Oliveira et al. (2007), em vacas Nelore, cruzadas  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Simental e cruzadas  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Limousin, encontrando produção no pico de lactação de 5,0, 8,7 e 6,68 Kg respectivamente, verificamos a superioridade de produção no pico de lactação de vacas cruzadas em relação a vacas puras, indicando possíveis graus e benefícios da heterose dos cruzamentos para esta característica (ROSO e FRIES, 2000).

No mesmo sentido, produções médias diárias e totais de leite ao longo da lactação, também sofrem influência de composições raciais e cruzamentos. Daley et al. (1987) estudando vacas das raças Hereford, Angus, Red Poll, Charolês, Brahman e suas cruzas, obtiveram maior produção para as cruzadas  $\frac{1}{2}$  Brahman  $\frac{1}{2}$  Angus com média de 8,97 Kg/dia, enquanto a menor produção média verificada foi das vacas Hereford com 5,81 Kg/dia, durante 150 dias de lactação observados. Brown et al. (2001) analisando a produção de leite de matrizes das raças Angus, Brahman e sua cruzas, encontrou uma média de 5,6 Kg/dia, 7,8 Kg/dia e 9,1 Kg/dia respectivamente; em estudo semelhante Restle et al. (2005) analisando os primeiros 90 dias de lactação, de vacas das raças Charôles e Nelore e sua cruzas, observaram que vacas cruzadas F1 produziram em média 5,5 litros enquanto as puras Charôles e Nelore produziram 3,98 e 3,72 litros, respectivamente. Finalmente, em estudo recente, Albertini et al., (2015), encontraram produção leiteira total ao longo da lactação em vacas Angus x Nelore, Caracu x Nelore e Nelore, 1.001, 870 e 673 kg respectivamente, destacando os efeitos da heterose para esta característica. Além disso, a composição racial do bezerro também pode ter influência, Mendonça et al. (2002), encontrou diferença na produção de leite de vacas Hereford com bezerros de grupos genéticos diferentes, onde vacas bezerros filhos de touros da raça Nelore apresentaram produção de leite inferior aquelas que amamentavam bezerros filhos de touros Angus.

Outro parâmetro importante da lactação de vacas de corte, é sua persistência. Persistência de lactação é definida como o decréscimo linear diário na produção de leite entre o pico de lactação e produção no dia da desmama (JENKINS et al., 2000), ou seja quanto maior a persistência de lactação menor a redução da produção. Daley et al. (1987) relatam que vacas de origem *Bos indicus* tem maior persistência da lactação do que vacas *Bos taurus*. No mesmo sentido, Oliveira et al. (2007) também encontrou uma persistência superior para vacas Nelore em relação a vacas F1 Limousin-Nelore. E, finalmente, Albertini et al., (2015) verificaram que a curva de lactação de vacas Nelore demonstrou uma taxa muito mais lenta de diminuição na secreção de leite em comparação com vacas cruzadas Angus x Nelore e Caracu x Nelore.

Além da quantidade de leite produzida, sua composição também é importante. Os constituintes do leite devem estar contidos em proporções adequadas para um completo desenvolvimento inicial do bezerro (RESTLE et al., 2003). A qualidade do leite é influenciada por fatores ambientais (principalmente alimentação) (SENNÁ, 1996), período da lactação (início, meio e fim) (RESTLE et al., 2003), além dos fatores genéticos (ALBUQUERQUE et al., 1993; RIBEIRO et al., 1991; SENNA, 1996). Brown et al. (2001) avaliando vacas Angus, Brahman, Angus x Brahman e Brahman x Angus cruzadas com reprodutores da raça Hereford, encontraram resultados que demonstraram que a melhora no desempenho de produção e teor de proteína e gordura no leite estão associados com o melhor desempenho pré-desmama dos bezerros nas raças de corte.

De maneira geral, existe uma correlação negativa da produção leiteira com a concentração dos componentes do leite (MELTON et al., 1967). Com relação a influência da composição racial das vacas nos percentuais de gordura, Restle et al. (2003) verificaram que vacas Charolês apresentaram leite com teor de gordura superior a vacas Nelore; destacando a menor produção leiteira das primeiras. Enquanto Cerdótes et al. (2004) não observaram influência significativa das raças Charolês e Nelore, sendo o valor médio observado de 3,47%, de acordo com os dados do NRC (1996) (entre 2,79 e 5,27%).

Com relação aos demais componentes, Daley et al. (1987) analisaram a composição do leite de vacas Hereford, Angus x Hereford, Red-Poll x Hereford, Brahman x Hereford e Brahman x Angus, não encontraram diferença significativa no

teor de proteína, que variou entre 3 e 3,3%, e também para teor de lactose que variou entre 5 e 5,1%. Cerdótes et al. (2004) não verificaram diferença significativa no teor de lactose no leite de vacas das raças Nelore, Charolês e cruzas entre si, teores que situaram-se dentro dos limites do NRC (1996). Enquanto McMorris e Wilton (1986), trabalhando com vacas Hereford e Simental, encontraram diferença significativa para este componente do leite entre as vacas destas raças, encontrando 5,47% e 4,94%, respectivamente.

### **3.3 Restabelecimento da função reprodutiva pós-parto**

A fim de se atingir um maior sucesso na produção de bovinos de corte, um dos fatores que tem sido aperfeiçoado é o melhor aproveitamento da capacidade reprodutiva das vacas (YAVAS E WALTON, 2000).

Neste sentido, a ocorrência do primeiro cio até os 45 dias pós-parto é um passo importante para o sucesso reprodutivo das fêmeas no ciclo reprodutivo que se inicia. Mecanismos associados à obtenção e, posterior, manutenção da competência reprodutiva em vacas de corte no pós-parto resultam da integração funcional do eixo hipotálamo-hipófise-ovários (eixo reprodutivo) (HESS, 2005).

Desta forma, a parte cerebral do eixo reprodutivo é organizada de tal forma que o hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no sistema sanguíneo porta-hipofisiário, que transporta o GnRH para a glândula pituitária anterior, onde a síntese e a secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) é estimulada (SHORT et al., 1990; WEBB et al., 2004). O crescimento e o desenvolvimento folicular inicial são estimulados pelo FSH. A secreção tônica de LH liberado em picos, em função da liberação pulsátil de GnRH, atua na maturação final do folículo dominante. A produção de estradiol pelos folículos ovarianos acaba atingindo um limiar que faz com que ocorra um pico de GnRH e conseqüentemente, um pico de LH de grande amplitude, levando à ovulação (LUCY et al., 1992; SHORT et al., 1990; WEBB et al., 2004).

Na sequência, o corpo lúteo se forma logo após a ovulação, começando a produzir progesterona (P4), que suprime a liberação de GnRH pelo hipotálamo. A regressão do corpo lúteo mediada pela liberação de prostaglandina (PGF2a) e o



declínio das concentrações sanguíneas de P4 permitem que o processo se repita; caso haja reconhecimento da prenhez, ocorre inibição contínua deste ciclo durante toda a prenhez, com a manutenção do corpo lúteo (INSKEEP, 2004; SCHILLO, 1992). Também atuando neste sentido, a produção de grandes quantidades de esteroides pela placenta, principalmente estradiol e P4, durante o final da prenhez, exerce forte ação inibitória sobre o hipotálamo, resultando em liberação diminuída de GnRH (SHORT et al., 1990).

Por outro lado, a secreção de esteroides durante a prenhez também diminui as reservas hipofisiárias de LH (WETTEMANN et al., 2003). Na sequência, após o parto, as reservas pituitárias e os pulsos de liberação de LH são restabelecidos de forma relativamente rápida (WILLIAMS, 1990). Entretanto a hipersensibilidade a inibição do estradiol parece contribuir para a continuação do anestro pós-parto. E, neste sentido, vacas com comprometimento nutricional parecem permanecer mais sensíveis ao efeito inibitório do estradiol (SHORT et al., 1990), podendo permanecer acíclicas por tempo indeterminado devido a amplitude e frequência reduzidas dos pulsos de secreção de LH.

Neste sentido, períodos mais longos de aciclicidade em vacas de corte são atribuídos à lactação, a presença do bezerro e ao baixo escore de condição corporal (MORAES, 2005; SHORT et al., 1990; WILLIAMS, 1990). Estes fatores envolvidos na retomada da ciclicidade pós-parto ainda não estão totalmente esclarecidos e, neste contexto, o típico balanço energético negativo pós-parto está associado a um intervalo prolongado do parto a primeira ovulação (STAGG et al., 1998).

Corroborando esta afirmativa, a causa subjacente de anestro pós-parto prolongado não é a falta de desenvolvimento do folículo dominante (folículos reiniciam o crescimento durante os primeiros dez dias após o parto), mas sim uma falha de ovulação (DISKIN et al., 2003), devido à reduzida concentração de metabólitos e hormônios que atuam diretamente sobre o crescimento e maturação folicular (BEAM e BUTLER, 1998).

O eixo somatotrófico (GH/ IGF-I) tem papel central no estado metabólico e forte conotação reprodutiva. As concentrações séricas de IGF-I aumentaram entre a 2ª e 10ª semana em vacas de corte que apresentaram estro no início do pós-parto, mas não em vacas que permaneceram em anestro (ROBERTS et al., 1997). Desta forma, esforços vêm sendo feitos para o estudo das características metabólicas do

início do pós-parto em vacas de corte e suas relações com os eventos do eixo hipotálamo-hipófise-ovários no restabelecimento da função reprodutiva.

### **3.4 Características metabólicas do período de transição e sua repercussão reprodutiva**

O retorno à atividade ovariana e a concepção em menos de 100 dias após o parto são essenciais para a lucratividade de um sistema pecuário, seja de corte ou leite. Em vacas no terço final da gestação e início da lactação as demandas energéticas aumentam muito, e ultrapassam a capacidade e/ou disponibilidade de alimento, fazendo com que a mesma entre em balanço energético negativo (BEN) (BAUMAN e CURRIE, 1980).

Neste contexto, durante o período de transição de gestante a lactante, vacas apresentam hormônios e metabólitos alterados (WATHES et al., 2007). Concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e beta-hidróxibutirato (BHB) aumentam, enquanto as de IGF-I e insulina estão baixas (BELL, 1995; BUTLER, 2003; DOUGLAS et al., 2006). Apesar de todos estes metabólitos e hormônios terem importância para a relação entre metabolismo e reprodução, as alterações ligadas ao eixo somatotrófico (GH e IGF-I), tem grande repercussão metabólica e parecem ter um papel central nos eventos do período de transição e posterior retorno a atividade reprodutiva (BEAM e BUTLER, 1998; BUTLER, 1998; 2003; LUCY, 2000; 2003; WEBB et al., 1999).

Desta forma, logo após o parto, devido ao início da lactação, vacas tem uma redução drástica no nível sanguíneo de insulina, devido à drenagem de glicose pela glândula mamária para a síntese de lactose (BUTLER, 2003). Esta redução no nível de insulina leva a uma redução na expressão hepática do receptor do GH (GHR), especialmente GHR 1A (BUTLER, 2003). O GHR modula a síntese de IGF-I sob controle de GH (JONES e CLEMMONS, 1995), e é presente em maior abundância no fígado (BORNFELDT et al., 1989). Como o IGF-I é produzido em resposta à ativação do GHR pelo GH, nesta situação há uma dissociação do eixo somatotrófico, pois com a redução do GHR há uma redução na expressão hepática e nível circulante de IGF-I (FENWICK et al., 2008). Como consequência da redução do nível

de IGF-I, a inibição realizada pelo IGF-I na secreção de GH é diminuído também (MULLER et al., 1999) e há um aumento no nível circulante de GH (BUTLER, 2003). Esta elevação do nível de GH associada à resistência do tecido adiposo à ação antilipolítica da insulina é benéfica para a produção de leite, pois estimula a lipólise e aumenta a disponibilidade de nutrientes para a síntese de leite pela glândula mamária (BELL, 1995). Por outro lado, devido ao aumento da lipólise, neste período logo após o parto há um aumento nos níveis de AGNEs e perda do escore de condição corporal (DOUGLAS et al., 2006).

O IGF-I circulante tem papel fundamental na reprodução. O nível sanguíneo de IGF-I está relacionado à idade ao primeiro parto (YIMAZ et al., 2006), retorno a atividade ovariana pós-parto (BUTLER et al., 2006) e sobrevivência embrionária (VELAZQUEZ et al., 2005). Além disso, atua no crescimento e diferenciação de folículos antrais (RIVERA e FORTUNE, 2003). Neste sentido a queda do nível de IGF-I no período pós-parto leva a um atraso no desenvolvimento de folículos antrais e, conseqüentemente, da ovulação. Vários trabalhos demonstram que vacas que ovulam o folículo dominante da primeira onda pós-parto tem maiores níveis sanguíneos de IGF-I do que vacas anovulatórias (BUTLER et al., 2006, KAWASHIMA et al., 2007). O IGF-I funciona como um modulador da ação de gonadotrofinas, na teca e na granulosa, como estimulante da proliferação e diferenciação celular (ARMSTRONG e WEBB, 1997) e reduzindo a atresia folicular (EL-ROEIY et al., 1994).

No mesmo sentido, a insulina, também tem funções importantes na reprodução, sendo responsável por mediar o transporte da glicose para dentro das células (SALES, 2011). Dessa forma, semelhante à glicose, a insulina tem papel importante no metabolismo energético celular (LAWRENCE et al., 2007). Além disso, a insulina apresenta efeitos anti-cetogênicos que podem interferir positivamente na eficiência reprodutiva durante o BEN. A insulina reduz a oxidação de AGNEs pelo fígado, inibe a lipólise, aumenta a utilização de corpos cetônicos em tecidos periféricos e diminui tanto a disponibilidade de substrato como a atividade de enzimas hepáticas responsáveis pela cetogênese (BROCKMAN e LAARVELD, 1986). Neste contexto, a insulina tem influência sobre, além dos níveis de GH e IGF-I, os níveis dos metabólitos glicose, AGNE e BHB, os quais estão correlacionados com o desempenho reprodutivo.

Por outro lado, a grande mobilização das reservas corporais de tecido adiposo requer a oxidação de AGNE no fígado (CHILLIARD et al., 1998). Em consequência a isto, quando a produção de AGNE supera a capacidade hepática de oxidá-los, ocorre a formação de corpos cetônicos, dentre os quais se destaca o beta-Hidroxibutirato (SMITH et al., 1997). Leroy et al. (2004) verificaram que a composição do fluido folicular de vacas leiteiras está diretamente relacionada aos níveis séricos dos metabólitos durante o pós-parto. Desta forma, o aumento de BHB e AGNE séricos durante o início do pós-parto pode interferir negativamente na qualidade do ovócito, induzindo apoptose e necrose das células da granulosa (LEROY et al., 2004; LEROY et al., 2005), contribuindo também, como um dos fatores que prejudicam a fertilidade de vacas durante o início de lactação (LEROY et al., 2008).

### **3.5 Utilização de Inteligência computacional em sistemas biológicos**

A Inteligência Computacional (IC) pode ser conceituada como o ramo da ciência da computação que se preocupa com a automatização do comportamento inteligente. Atualmente, a área de IC engloba uma ampla variedade de sub-campos, dentre eles, uma das mais férteis áreas de pesquisa é a que se preocupa com a construção de sistemas de alto desempenho, capazes de aprender através da experiência e obter conhecimento a partir de bancos de dados (CAMARGO, 2010).

Neste contexto, a complexidade inerente a todos os processos biológicos dificulta sua plena compreensão, principalmente se for utilizada uma abordagem holística baseada na análise de grandes quantidades de dados, seja por especialistas de domínio humanos, seja por técnicas estatísticas convencionais. Por outro lado, nos dias atuais, um dos grandes impulsos para o desenvolvimento da computação é o projeto de modelos algorítmicos com a finalidade de tratar problemas de análise de dados complexos (ENGELBRECHT, 2007). Como consequência deste desenvolvimento, a literatura tem relatado muitos casos de sucesso através da modelagem de inteligência biológica e natural, nas mais variadas áreas de conhecimento, resultando no que se convencionou chamar de "Sistemas Inteligentes".

Como exemplo bem sucedido da aplicação de sistemas inteligentes em problemas da área biológica, para análise de grandes quantidades de dados, pode ser citada a aplicação de redes neurais para detectar padrões de alterações metabólicas envolvidas na ocorrência de mastite (CAMPOS, 2006). Outro exemplo é a utilização técnicas de clustering para identificar os genes diferencialmente expressos em laranjas infectadas por duas bactérias diferentes (BRETON et al., 2014). As mesmas técnicas foram utilizadas com sucesso para identificar genes com níveis de expressão similares em diferentes espécies de eucalipto, sob diferentes condições ambientais (OLIVEIRA et al., 2011). No mesmo sentido, abordagens inteligentes baseadas em regras de associação também foram utilizadas com sucesso para modelar a especificidade da protease do Vírus HIV-1 (CAMARGO e ENGEL, 2006; KECMAN, 2001; KONAR 2000).

Segundo Konar (2000), há quatro diferentes classes de aprendizado de máquina: aprendizado supervisionado, aprendizado não supervisionado, aprendizado por reforço e aprendizado por programação em lógica indutiva. Dependendo do valor a ser predito o aprendizado supervisionado pode ser de dois tipos: regressão quando os valores de saída são contínuos, e classificação quando os valores de saída são discretos (KECMAN, 2001). Durante o processo de treinamento, as amostras são sucessivamente submetidas ao algoritmo de aprendizado. Para cada amostra de entrada, o algoritmo tenta prever a saída. A saída predita pelo algoritmo é comparada com a saída real, a diferença entre elas é utilizada para reajustar os parâmetros do modelo. Desta forma, o algoritmo iterativamente ajusta seus parâmetros para criar um modelo que faça um mapeamento das entradas para a saída (CAMARGO et al., 2015). Após o processo de aprendizado supervisionado, é criado um modelo que pode ser utilizado para simular o conhecimento do especialista do domínio.

Neste contexto, quando da utilização de técnicas de classificação, que estão inseridas no escopo do aprendizado supervisionado, podem ser priorizadas a construção de modelos do tipo caixa branca, onde se enquadram os algoritmos de geração de regras ou árvores de decisão (CAMARGO et al., 2015). Apesar de estes modelos serem lineares e, tipicamente, terem uma capacidade preditiva menor que modelos não lineares, sua maior vantagem é a geração de modelos interpretáveis (CAMARGO, 2002).

Para avaliação dos modelos construídos, podem ser utilizadas técnicas como *10-fold cross validation* para assegurar a correta mensuração da capacidade preditiva dos modelos. Esta técnica é particularmente útil quando o conjunto de dados de treinamento é pequeno, ou quando a quantidade de parâmetros do modelo é grande (KOHAVI, 1995).

A partir destas premissas, para geração de árvores de decisão, podem ser utilizados algoritmos como J48 (QUINLAN, 1993). Este algoritmo classifica instâncias ordenando-as da raiz da árvore em direção a suas folhas. As características mais relevantes posicionam-se mais perto da raiz da árvore. À medida que a relevância da característica diminui, esta característica é posicionada mais longe da raiz e mais próxima às folhas (MITCHELL, 1997). Para qualquer problema de classificação, podem ser geradas diversas árvores de decisão que o explicam. Cada árvore possui um nível de complexidade, diretamente proporcional à sua quantidade de nodos, e um nível de precisão, diretamente proporcional à quantidade de instâncias que são corretamente classificadas (CAMARGO et al., 2015).

De acordo com o princípio científico do reducionismo (SCOTT, 2004), havendo diversas explicações aceitas para um determinado fenômeno, aquelas mais complexas devem ser preteridas em favor das mais simples, que são mais facilmente verificáveis. Este princípio também é conhecido por lei da parcimônia ou navalha de Occam (Oreskes et al., 1994).

### **3.6 Sequenciamento de RNA e transcriptômica**

RNA-seq é uma técnica relativamente nova que pode ser utilizada para analisar as alterações na expressão dos genes em todo o transcriptoma (MORTAZAVI et al., 2008; WANG et al., 2009) e vem sendo aplicado em um crescente número de organismos (HUANG E KHATIB, 2010).

A tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS – Next Generation Sequencing) trouxe grandes mudanças na genômica. Caracterizada por produzir milhões de pequenas sequências com custo reduzido por base sequenciada, o sequenciamento de próxima geração é um dos principais responsáveis pela grande

quantidade de informações geradas e utilizadas atualmente em pesquisas e diagnósticos (BAI et al., 2012; NAGAI, 2014).

Neste contexto, o NGS emergiu como uma importante ferramenta para estudos de transcriptômica, dada sua precisão na quantificação de transcritos (WANG et al., 2009). Dentre as técnicas que utilizam NGS, o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) demonstra vantagens em comparação com as análises de microarranjos, ferramentas amplamente utilizadas até então (MORTAZAVI et al., 2008).

Análises de microarranjos dependem de anotações de genomas existentes e requerem uma variedade especializada de sondas com base na informação obtida a partir de outros métodos, tais como sequenciamento, a fim de detectar os mecanismos mais complexos na expressão de genes, como, por exemplo, splicing alternativo (HUANG E KHATIB, 2010). Além disso, foram determinados graus de insensibilidade de plataformas de microarranjos na detecção de expressão diferencial de certos genes metabolicamente importantes (McCARTHY et al., 2010). Foi atribuído ao PCR em tempo real a capacidade de detectar alterações na expressão de genes hepáticos que a análise de microarranjos não conseguiu detectar em vacas em BEN (MCCARTHY et al., 2010). Isto enfatiza a necessidade de uma técnica mais sensível para análise de todo transcriptoma.

Por outro lado, RNA-Seq possibilita a obtenção do perfil de expressão dos genes a partir de uma amostra de RNA e a identificação de novos transcritos e regiões regulatórias com considerável sensibilidade e precisão (NOOKAEW et al., 2012; OSHLACK et al., 2010). Esta tecnologia tem vantagens distintas sobre microarranjos, incluindo a detecção sensível de todos os genes expressos, sem a necessidade de se gerar uma matriz de sondas com base na sequência conhecida, praticamente nenhum ruído de fundo e uma gama dinâmica muito mais elevada. Além disso, levou à descoberta de transcritos anteriormente não identificados, tais como a recente descoberta do RNA potenciador, uma nova espécie de RNA (KIM et al., 2010), splicing alternativo (SULTAN et al., 2008), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (CÁNOVAS et al., 2010), fusões transcricionais e transcritos quiméricos (MAHER et al., 2009), podendo serem detectados sem a necessidade de construir uma matriz de sondas.

Compreender o processo de transcrição dos genes é essencial para interpretação dos elementos funcionais do genoma (WANG et al., 2009). Porém, a maior dificuldade atualmente em lidar com uma grande quantidade de dados é extrair o significado biológico (ROBINSON et al., 2010). Ao contrário dos microarranjos, as ferramentas de bioinformática para os dados de RNA-seq são medianamente recentes (OSHLACK et al., 2010; GARBER et al., 2011). Em parte por esta razão, há poucos relatos sobre o uso de RNA-seq para identificação de genes diferencialmente expressos entre grupos de animais de diferentes condições fisiológicas e/ou metabólicas, e até o momento, escassos trabalhos em bovinos.



#### 4. Artigo 1

### **Produção e Constituintes do Leite de Vacas de Corte de Diferentes Composições Raciais**

Azambuja, R. C. C. <sup>(1)</sup>, Rodrigues, P. F. <sup>(1)</sup>; Menezes, L. M. <sup>(1)</sup>; Teixeira, B. B. M. <sup>(1)</sup>;  
Mendonça, F. S. <sup>(1)</sup>; Costa. R. F. <sup>(1)</sup>; Suñé, R. W. <sup>(2)</sup>; Barbosa Silveira, I. D. B. <sup>(1)</sup>;  
Cardoso, F. F. <sup>(2)</sup>

(1)Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,  
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil.

e-mail: azambage@yahoo.com.br

(2) Embrapa Pecuária Sul, Bagé/RS, Brasil. e-mail: fcardoso@cppsul.embrapa.br

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar a produção e a composição leiteira de vacas de corte de diferentes composições raciais, e o peso ajustado aos 210 dias dos bezerros até o desmame. Foram utilizados 320 registros de vacas com idade entre 3 e 6 anos, de oito composições raciais, sendo 45 da raça Angus (ANAN), 26 da raça Hereford (HHHH), 16 da raça Nelore (NENE), 57 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Hereford (ANHH), 27 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Hereford  $\frac{1}{2}$  Angus (HHAN), 53 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Nelore (ANNE), 30 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Angus (NEAN) e 66 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Caracu (ANCR). Estas vacas foram acasaladas com touros Brangus (BN) ou Braford (BO) e criadas em condições de pastejo extensivo no sul do Brasil. As produções de leite foram obtidas através da utilização de dois métodos, diferença dos pesos dos bezerros antes e após a amamentação (indireto) (PMP) e, realizado por meio de ordenha mecânica (OM)

(direto). Curvas de lactação foram estimadas e utilizadas para obter as seguintes características: Produção no pico de lactação (PP), semana do pico (PS), produção total em 210 dias de lactação (PT210) e persistência de lactação (PERS), que foram correlacionadas com o peso ao desmame dos bezerros ajustado para 210 dias (PD210). A técnica de OM foi considerada mais precisa em função do menor erro padrão das médias estimadas, maior poder estatístico e maior correlação de PT210 com PD210 ( $r = 0,45$ ) em relação ao PMP (0,23). Com relação a PT210, vacas ANNE foram as mais produtivas, mas não diferiram das NEAN, HHAN e ANCR. Vacas NENE apresentaram as produções mais baixas, apesar de não diferir significativamente das vacas HHHH, ANAN e ANHH. Vacas HHAN e ANCR tiveram PP superiores às vacas ANAN, ANHH e NENE, enquanto vacas ANNE e NEAN tiveram PP superior as ANAN e NENE, no entanto não diferindo das demais composições raciais. Vacas ANCR apresentaram menor PERS quando comparadas a vacas ANAN. Bezerros filhos de vacas ANCR, ANNE e NEAN apresentaram-se mais pesados que os filhos de vacas ANAN, ANHH, HHHH e NENE ao desmame, não diferindo dos de vacas HHAN, que por sua vez, também apresentaram bezerros mais pesados que os de vacas HHHH. Vacas ANNE, NEAN, ANCR e HHHH apresentaram teores de gordura superiores que vacas ANAN. Com relação aos dados de proteína, vacas NENE e HHHH, demonstraram superioridade em relação às vacas ANAN, ANHH, HHAN, ANNE. Já para os teores de lactose, vacas ANNE e NEAN mostraram níveis superiores a todos os demais genótipos. Por fim, para sólidos totais, vacas ANNE, NEAN, HHHH e NENE mostraram concentrações superiores ANAN e HHAN. A utilização do cruzamento entre raças com maior distanciamento genético se mostrou um boa alternativa para incrementar os parâmetros relacionados à produção leiteira em vacas de corte, bem como, o peso dos terneiros ao desmame.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bovinos de corte, cruzamentos, curva de lactação, peso à desmama, produção de leite.

## Introdução

A produção leiteira das matrizes tem grande importância no sistema de produção de bovinos de corte devido à correlação positiva existente com o peso ao desmame do bezerro. Estudos demonstram que até 40% das variações no peso do bezerro ao desmame são atribuídos à produção de leite da mãe (ROBISON et al. 1978; ALBUQUERQUE et al., 1993) e aos constituintes do leite produzido (BROWN et al. 2001).

Existem duas classes de fatores que afetam a produção de leite das matrizes e, como consequência, o desempenho do bezerro: fatores ambientais e genéticos. Quanto aos fatores ambientais, os mais importantes são: a idade da vaca ao parto, o ano, o momento do parto na estação de parição e principalmente o nível nutricional aos quais os animais são submetidos (BROWN et al., 2001; RIBEIRO et al. 1991). Entre os fatores não ambientais ou genéticos, destaca-se a composição racial das vacas, geralmente expressa em termos de grau de sangue ou grupo genético.

Na busca por matrizes mais produtivas e eficientes, alguns estudos utilizaram o cruzamento entre raças, visando obter os benefícios da heterose e complementaridade, obtendo resultados satisfatórios em relação à produção leiteira de vacas de corte. Verificou-se que a heterose influenciou a produção de leite (CUNDIFF et al., 1974, BROWN et al., 2001; RESTLE et al., 2005) e que os bezerros filhos de vacas cruzadas são normalmente mais pesados ao desmame (RIBEIRO et al., 2001, CALEGARE et al., 2007).

Brown et al. (2001) ressaltam que não apenas a quantidade de leite produzida é importante, mas também a qualidade deste leite, ou seja, se os nutrientes que compõe este alimento estão em proporções adequadas para um completo desenvolvimento inicial do bezerro. A composição do leite pode ser influenciada pela composição racial da vaca, estágio da lactação e nível alimentar ao qual a vaca está submetida (HOLLOWAY et al., 1985; BROWN et al., 2001).

Tendo em vista a importância que possui a produção de leite de bovinos de corte, faz-se essencial mensurar a produção leiteira destas vacas, contudo, esta estimativa apresenta algumas dificuldades, principalmente quando criadas exclusivamente em regime de pastejo. Neste contexto, duas técnicas são as mais

utilizadas: a diferença do peso dos bezerros antes e após a amamentação (ROVIRA, 1974) ou a mensuração direta por meio de ordenha mecânica ou manual. Visto a importância de uma estimativa mais acurada possível da produção individual de cada vaca, faz-se necessária a comparação das estimativas obtidas com cada método.

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a produção e a composição nutricional do leite de vacas de corte de oito composições raciais (Angus, Hereford, Nelore, Angus x Hereford, Hereford x Angus, Angus x Nelore, Nelore x Angus e Angus x Caracu), sob pastoreio contínuo em campo natural, além de avaliar o peso ajustado aos 210 dias dos bezerros até ao desmame.

## **Material e Métodos**

A pesquisa foi realizada no Centro de Pesquisa de Pecuária dos campos sul-brasileiros (CPPSul), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), situada no município de Bagé, Região da Campanha, RS.

Foram utilizados 320 registros de vacas com idade entre 3 e 6 anos, de oito composições raciais, sendo 45 da raça Angus (ANAN), 26 da raça Hereford (HHHH), 16 da raça Nelore (NENE), 57 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Hereford (ANHH), 27 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Hereford  $\frac{1}{2}$  Angus (HHAN), 53 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Nelore (ANNE), 30 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Nelore  $\frac{1}{2}$  Angus (NEAN) e 66 do cruzamento  $\frac{1}{2}$  Angus  $\frac{1}{2}$  Caracu (ANCR).

Em relação à ordem do parto as vacas foram divididas em oito classes, onde: 3.1 são vacas de 3 anos com a primeira cria, 4.1 são vacas de 4 anos com a primeira cria, 4.2 são vacas de 4 anos com a segunda cria e 4.18 são vacas de 4 anos com a segunda cria, mas tiveram a primeira cria aos dezoito meses, 5.2 são vacas de 5 anos com a segunda cria, 5.3 são vacas de 5 anos com a terceira cria, 6.3 são vacas de 6 anos com a terceira cria e 6.4 são vacas de 6 anos com a quarta cria.

Estas vacas foram divididas ao acaso dentro apenas de composição racial em dois lotes e acasaladas com touros das raças Brangus (BN) e Braford (BO) em

dezembro de 2009/2010/2011. Foi inicialmente realizada inseminação artificial em tempo fixo, utilizando-se sêmen de seis touros Brangus e cinco touros Braford e, em seguida, um repasse de monta natural que durou 75 dias com dois touros Braford e dois Brangus em cada lote. O período de parição foi entre os meses de setembro e dezembro de 2010, 2011 e 2012, ocorrendo o desmame de todos os bezerros em maio de 2011, 2012 e 2013 respectivamente.

As produções de leite foram obtidas através da utilização de dois métodos, diferença dos pesos dos bezerros antes e após a amamentação (indireto) (PMP) (ROVIRA, 1974) e realizado através de ordenha mecânica (OM) (direto).

Na realização do método da diferença de pesos do bezerro antes e após amamentação, foram feitas 10 medições realizadas em intervalos de 21 dias, culminando no desmame. No dia anterior à avaliação, às 13h, os bezerros foram separados das vacas e às 19h, foram reunidos com as mães durante 45 minutos para mamar e esgotar o leite das glândulas mamárias. Em seguida as vacas foram separadas dos bezerros até a manhã seguinte, sendo colocadas em um potreiro com água e pasto. Na manhã seguinte às 7h, os bezerros foram pesados em jejum, colocados para mamar por 45 min e posteriormente pesados novamente. A diferença entre os pesos dos bezerros antes e após a amamentação foi considerada a produção de leite em 12h, que multiplicada por dois foi utilizada como a estimativa para o período de 24h. Para as pesagens foi utilizada balança eletrônica da marca Tru-test®, com capacidade máxima de 1500 Kg e precisão de 100g e, para minimizar erros decorrentes da excreção de fezes e de urina entre as duas pesagens, se realizaram as pesagens no menor tempo possível.

A técnica de avaliação direta realizada pelo método de ordenha mecânica foi realizada em três diferentes períodos da lactação início (40-60 dias), meio (90-110 dias) e fim (180-210). No dia anterior à ordenha, foi realizado o mesmo manejo de quando se fez a análise através da diferença de peso pré e pós-mamada. No dia seguinte, às 7h, iniciava-se a ordenha no tronco de contenção com aplicação de 3ml de ocitocina via intravenosa, a fim de facilitar a liberação do leite. Após o úbere ser lavado e massageado, realizava-se a ordenha até que ocorresse o esgotamento do úbere, processo que durava em torno de sete minutos, realizado por ordenhadeira móvel AT BVF 200 da Fockink®. As vacas foram subdivididas de acordo com sua

data de parição em lotes ao redor de 22 animais. A equação utilizada para estimar a produção de leite em 24 horas foi a proposta por Restle et al. (2003).

$$PL = \frac{(POM) * 60 \text{ min} * 24h}{TMO},$$

Onde PL: produção estimada para as 24 horas no dia da ordenha em Kg/dia; POM: é a produção obtida com a ordenha mecânica e TMO: é o tempo em minutos entre a última mamada e a ordenha.

Posteriormente à ordenha, foram coletadas amostras de aproximadamente 100 mL, que foram enviadas ao laboratório para determinação da percentagem de gordura, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado (ESD) do leite e contagem de células somáticas. Alguns trabalhos indicam que o teor de gordura é afetado ainda pela idade da vaca e época do parto, razões pelas quais as produções de leite com porcentagens variáveis de gordura foram ajustadas para o padrão, que é de 4% na maioria dos países. Faz-se esta correção empregando a equação de Gaines-Davidson (1925):

$$PLG = 0,4 * PL + 0,15 * PL * \%G,$$

em que: PLG = produção de leite corrigida para 4% de gordura; PL = produção de leite no dia da ordenha (Kg/dia) e %G = percentagem de gordura do leite.

Para uma maior precisão nas análises de produção de leite, dados de vacas que não realizaram todas as avaliações e vacas que tiveram concentrações de gordura consideradas fora do padrão (<1 ou >7%) foram desprezados, resultando num descarte de cinco vacas ANAN, duas ANCR, nove ANHH, dez ANNE, cinco HHHH, três NENE, três HHAN e três NEAN.

Nas análises referentes à produção de leite, inicialmente, foram ajustadas curvas individuais de lactação para as vacas das oito composições raciais, utilizando-se o modelo proposto por Jenkins e Ferrell (1984):

$$PL_{(S)} = \frac{S}{ae^{kS}}$$

em que  $PL_{(S)}$  = produção de leite em 24 horas na semana  $S$  do pós-parto;  $a$  = parâmetro de escala da curva;  $k$  = parâmetro da forma da curva, que indica persistência de lactação;  $S$  = tempo de lactação em semanas.

As estimativas dos parâmetros  $a$  e  $k$  foram utilizadas, conforme Jenkins e Ferrell (1984), para calcular três valores descritivos característicos da curva de lactação:

$$SP = \left(\frac{1}{k}\right);$$

$$PP = \left(\frac{1}{ake}\right);$$

$$PT210 = \frac{-7}{ak} * \left(Se^{-kS} + \frac{1}{ke^{-kS}} - \frac{1}{k}\right),$$

em que:  $SP$  = semana do pico de lactação;  $PP$  = produção no momento do pico de lactação;  $PT210$  = produção total em 210 dias de lactação.

A persistência de lactação ( $PERS$ ) foi definida como o decréscimo linear diário na produção de leite entre as épocas do pico de lactação ( $PP$ ) e da desmama (JENKINS et al., 2000):

$$PERS = \frac{(PP - PF)}{D} * 1000,$$

onde,  $PP$  = produção no momento do pico de lactação;  $PF$  = produção no último dia de lactação e  $D$  = número de dias entre o pico de lactação e o final da lactação.

Os parâmetros  $a$  e  $k$ , bem como as demais variáveis derivadas da curva de lactação, para cada vaca foram considerados variáveis dependentes, sendo analisadas pelo delineamento completamente casualizado utilizando-se o PROC

GLM do SAS (2008). O modelo estatístico utilizado para representar uma observação foi:

$$Y_{ijkmn} = m + G_i + S_j + M_k + OP_m + RT_n + e_{ijkmn}$$

em que:  $Y_{ijkmn}$  = uma variável resposta derivada da curva de lactação;  $m$  = média geral;  $G_i$  = efeito da composição racial da vaca (ANAN, ANCR, ANHH, ANNE, HHAN, NEAN, NENE, HHHH);  $S_j$  = efeito sexo do bezerro (M,F);  $M_k$  = efeito época de parição (Início/ fim);  $OP_m$  = efeito da classe da ordem do parto (3.1,4.1,4.18,4.2,5.2,5.3,6.3,6.4);  $RT_n$  = efeito raça do touro (BO,BN);  $e_{ijkmn}$  = erro experimental.

Os constituintes nutritivos do leite foram analisados pelo delineamento de medidas repetidas, utilizando-se o PROC MIXED do SAS (2008). O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijkmnop} = m + G_i + S_j + M_k + OP_m + RT_n + P_o + GP_{io} + V_p(G_i) + e_{ijkmnop}$$

em que:  $Y_{ijkmnop}$  = uma variável resposta da composição nutritiva do leite;  $m$  = média geral;  $G_i$  = efeito da composição racial da vaca (ANAN,ANCR,ANHH,ANNE,HHHH,HHAN,NENE,NEAN);  $S_j$  = efeito sexo do bezerro (M,F);  $M_k$  = efeito época de parição (Início/ fim);  $OP_m$  = efeito da classe da ordem do parto (3.1,4.1,4.18,4.2,5.2,5.3,6.3,6.4);  $RT_n$  = efeito raça do touro (BO,BN);  $P_o$  = efeito do período de lactação (INÍCIO,MEIO,FIM);  $GP_{io}$  = efeito da interação entre composição racial e período de lactação;  $V_p(G_i)$  = efeito aleatório da vaca dentro da composição racial;  $e_{ijkmnop}$  = erro experimental.

Para a comparação de médias, foi utilizado o teste de Tukey, em nível de significância de 0,05.

Correlações parciais entre as medidas livres dos efeitos no modelo (composição racial, ordem de parto, sexo do bezerro, etc.), foram obtidas por meio de análise de variância multivariada (MANOVA), utilizando o Procedimento GLM (SAS, 2008).



## Resultados e discussão

### *Curva de lactação e produção leiteira*

Os parâmetros da curva de lactação foram afetados significativamente ( $P < 0,05$ ) pela composição racial das vacas (Tabela 1). Neste trabalho a curva de lactação obtida através da metodologia de OM (Figura 1) ressalta maior diferença entre os genótipos analisados, diferentemente da curva de lactação da PMP (Figura 2) onde apesar de não haver contradições, não são tão evidentes as diferenças entre composições raciais.

Produções totais em 210 dias de lactação estimada com dados da OM sofreram influência significativa ( $P < 0,05$ ) do genótipo da vaca lactante (Tabela 1), onde vacas ANNE foram as mais produtivas, mas não diferiram das NEAN, HHAN e ANCR com produções médias estimadas de 6,2, 5,97, 5,93 e 5,86 Kg/dia, respectivamente, durante todo o período de lactação. Vacas NENE apresentaram as produções mais baixas durante os 210 dias de lactação com média diária de 4,61 Kg, apesar de não diferir significativamente das vacas HHHH, ANAN e ANHH que produziram em média 4,67, 4,79 e 4,84 Kg/dia, respectivamente.

Albertini et al. (2007) verificaram diferença significativa entre as médias de vacas ANNE e F1 Nelore Caracu (NECR) obtidas pela análise da OM, encontrando produção total de leite corrigido para 4% de gordura (PLG) de 1563 Kg e 1375 Kg respectivamente, resultados bem superiores aos relatados neste trabalho. Por outro lado, Ribeiro et al. (2001) também utilizando avaliação direta, mas através de ordenha manual em vacas ANAN e NEAN não encontraram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na PLG dos dois genótipos, obtendo médias de 2,9 e 2,1 Kg/dia respectivamente.

Já Jenkins e Ferrell (1992) utilizando o método da PMP encontraram diferenças significativas nos resultados influenciadas pelo genótipo da vaca, relatando desempenho superior das vacas Angus em relação a vacas Hereford, para o parâmetro de produção total aos 210 dias, com produções de 1423 e 1191 Kg e com médias de 6,78 Kg/dia e 5,67 Kg/dia, respectivamente. Rovira (1996) cita uma média de 3,8 Kg/ dia para vacas Hereford em campo natural, num período de 212

dias, com produção total de 807 Kg, abaixo do encontrado por Mendonça et al. (2002) que relatam uma média diária de 4,8 Kg para a mesma raça.

As diferenças entre produções totais nos diferentes estudos refletem a grande influência das condições ambientais e genéticas a que essa característica está sujeita em vacas de corte. Isto permite delinear estratégias de manejo e melhoramento animal para maximizar o benefício da habilidade materna no sistema de cria.

As curvas de lactação nas duas situações analisadas, OM e PMP (Figura 1 e 2), apresentaram pico entre a oitava e décima primeira semanas de lactação. Estes dados concordam com o NRC (1996), o qual, com base na revisão de trabalhos dirigidos ao estudo da produção de leite de vacas de corte de diferentes grupos genéticos, estabeleceu que o pico de produção ocorre ao redor de 8,5 semanas de lactação.

A composição racial da vaca lactante apresentou influência ( $P < 0,05$ ) quando relacionada à produção no pico de lactação. Vacas HHAN e ANCR tiveram produções superiores às ANAN, ANHH e NENE (Tabela 1). Vacas ANNE e NEAN tiveram produção no pico superior as ANAN e NENE, no entanto não superiores às demais composições raciais, quando utilizado o método OM. Quando observamos os resultados produzidos pelo método PMP, apenas as vacas ANCR demonstraram superioridade em relação as vacas NENE.

Albertini et al. (2007) também encontraram diferença ( $P < 0,05$ ) na produção no pico de lactação de acordo com o genótipo da lactante, percebendo produção superior de vacas ANNE em relação a vacas NECR, que apresentaram médias respectivas de 7,8 e 6,3 Kg, com resultados semelhantes aos deste estudo, apesar de uma base de comparação um pouco diferente. Jenkins e Ferrell (1984) citam uma produção no pico de 9,7 Kg para vacas ANHH, mantidas em pastagem nativa enquanto Oliveira et al. (2007) realizando PMP em vacas Nelore, F1 Nelore-Simental e F1 Nelore-Limousin, encontraram produção do pico de lactação de 5,0, 8,7 e 6,68 Kg respectivamente.

Vacas ANCR apresentaram menor persistência de lactação quando comparadas a vacas ANAN ( $P < 0,05$ ), pelo método de OM (Tabela 1). Estes resultados estão associados provavelmente a produção leiteira superior das vacas ANCR em relação às vacas ANAN. Minick et al. (2001), trabalhando com animais

cruzados, e Johnson et al. (2003) com animais Brangus, verificaram que vacas mais produtivas tendem a apresentar decréscimos mais expressivos na produção de leite.

A raça do touro apresentou influência ( $P < 0,05$ ) somente, quando analisado pelo método PMP, na produção total aos 210 dias (Tabela 1). Foi encontrada uma PT210 10% superior em vacas acasaladas com touros da raça Brangus em relação àquelas acasaladas com touros da raça Braford.

Por meio da estimação de produção pela ordenha manual, Restle et al. (2003), não verificaram diferenças significativas entre produções de leite de vacas da raça Nelore e Charolês cruzadas com touros Nelore e Charolês, apesar das vacas cruzadas com touros Nelore produzirem 8,3% a mais do que as cruzadas com touros Charolês. Similarmente, Mendonça et al. (2002) utilizando a técnica da PMP não verificaram diferenças significativas na produção de leite de vacas Hereford, que amamentavam bezerros de raça paterna Red Angus e Nelore.

A maior produção de leite de vacas amamentando bezerros cruzados pode ter ocorrido em função do maior número de mamadas por período de tempo do que os puros; fato associado à determinação genética para o temperamento e conduta do bezerro, que, mamando mais frequentemente, estimularia maior produção de leite de suas mães (CARTWRIGHT; CARPENTER 1961; ROVIRA 1974). Reynolds et al. (1978) encontraram efeito significativo do genótipo do bezerro, onde vacas com bezerros cruzados produziram 16% a mais de leite. Neste contexto, os resultados do presente estudo levam a crer que a avaliação pelo método PMP não estima somente a capacidade de produção de leite da vaca, mas também o comportamento do bezerro que influencia a produção das vacas por meio de maior consumo de leite e, possivelmente, os bezerros filhos de touros Brangus tenham uma conduta mais ativa de amamentação comparada aos filhos de touros Braford.

Foi verificada também influência do período da estação de parição na produção total de leite quando analisada pelo método de OM (Tabela 2). Vacas que pariram no final da estação de parição apresentaram produções totais inferiores ( $P < 0,05$ ). Além disso, produções mais altas foram verificadas no pico de lactação das vacas que pariram na primeira metade do período de parição. Alencar et al. (1988) ressaltam que as diferenças em produção devido ao efeito de mês estão relacionadas com modificações de clima, tais como temperatura, umidade,

precipitação pluviométrica e luminosidade, que afetam diretamente a disponibilidade das forrageiras. Neste estudo, vacas paridas no início da primavera foram favorecidas porque este período correspondeu a melhor produtividade e qualidade das gramíneas naturais regionais, devido ao clima favorável (CARVALHO et al., 2006).

Em relação à ordem do parto, pelo método OM, vacas 3.1 apresentaram produções leiteiras no pico de lactação inferiores a quase todas as demais categorias, exceto vacas 4.18 e 4.2. No mesmo sentido, vacas 3.1 também apresentaram produções totais inferiores a quase todos os demais grupos, por idade e ordem do parto, não diferindo apenas das vacas 4.18 (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com NRC (2001), o qual estimou a produção de leite 26 e 12% mais baixa em vacas que pariram, respectivamente, com dois e três anos de idade, em relação a vacas mais velhas. Esta produção de leite maior de vacas adultas era esperada devido ao maior saldo líquido de energia para a produção de leite, uma vez que suas necessidades nutricionais são apenas para manutenção e produção, diferentemente de vacas mais jovens que ainda precisam cumprir os requisitos de crescimento. A produção de leite aumenta até cinco ou seis anos de idade, ocorrendo nivelamento depois disso e, em seguida, começando a diminuir após oito ou nove anos de idade (RUTLEDGE et al, 1971;. ROVIRA, 1974; SOUZA et al 1996;. JOHNSON et ai, 2003;.. PIMENTEL et al, 2006).

Notter et al. (1978), trabalhando com diferentes raças de bovinos de corte também observaram menor produção de leite em vacas de 3 anos, em relação a animais com 4 anos de idade, sendo esta diferença de 19%. No entanto, atrasar o primeiro parto para os 4 anos de idade, apenas considerando a maior produção de leite não é economicamente viável porque estas matrizes teriam um período improdutivo muito longo, aumentando os custos e diminuindo a produtividade e rentabilidade do sistema (POTTER et al., 2000 ).

Parâmetros da curva de lactação obtidos por ambos os métodos, OM e PMP não foram influenciados pelo sexo do bezerro e ano de avaliação neste estudo ( $P > 0,05$ ). Estes resultados divergem dos relatados por outros autores, que encontraram efeitos do sexo sobre a produção de leite (MELTON et al., 1967;. ROBISON et al., 1978;. ALENCAR, 1987; ALENCAR et al., 1988;.. ALBUQUERQUE et al, 1993;. PIMENTEL et al, 2006), alternância entre os sexos de acordo com o ano de

avaliação (JEFFERY et al., 1971) e produções mais elevadas de vacas mães de bezerros machos (McCUSKEY et al., 1986).

### ***Desempenho do bezerro***

Peso do bezerro ajustado aos 210 dias (PD210) foi influenciado pela composição racial da vaca, por outro lado, não foi influenciado pela raça do touro (Tabela 1). Bezerros filhos de vacas ANCR, ANNE e NEAN apresentaram-se mais pesados que os filhos de vacas ANAN, ANHH, HHHH e NENE ao desmame, não diferindo dos de vacas HHAN, que por sua vez, também apresentaram bezerros mais pesados que os de vacas HHHH. Tais resultados concordam com as produções mais elevadas de leite das vacas, confirmando que o peso ao desmame está intimamente relacionado com a produção de leite de vacas (RUTLEDGE et al., 1971; ALBUQUERQUE et al, 1993 ; MILLER e WILTON, 1999; MACNEIL e MOTT, 2006). Vários estudos também relacionaram o peso a desmama com a produção de leite materno, independentemente dos genótipos envolvidos (ALBUQUERQUE et al., 1993; RESTLE et al., 2004).

A correlação entre PT210 e PD210 foi significativa e positiva ( $P < 0,05$ ) com magnitude de baixa a moderada por ambos os métodos de ordenha, OM ( $r = 0,45$ ) e PMP ( $r = 0,23$ ). Outros estudos brasileiros envolvendo as raças Caracu, Charolês, Gir e Nelore encontraram correlações entre a produção média de leite e peso à desmama variando de 0,63 a 0,73 (ALBUQUERQUE et al, 1993; RESTLE et al, 2004), confirmando associação entre essas características, encontradas em menor magnitude no presente estudo.

Por meio dos resultados acima descritos para ambas as metodologias de avaliação da produção de leite, entende-se que a realizada por meio da OM se mostra mais acurada, devido ao fato dos resultados da PMP apresentarem uma maior dispersão verificada pelos erros padrão (Tabelas 1 e 2), o que dificulta a declaração de diferenças significativas entre as médias. Outro fato constatado é que a técnica de PMP tende a refletir mais efetivamente a capacidade de ingestão do bezerro do que a produção real da vaca, podendo se verificar, não raramente, uma vaca amamentando mais de um bezerro e alguns bezerros mamando em mais de

uma vaca. Além disso, Neidhardt et al. (1979) identificaram que a defecação, urina e incidência de chuva são outros fatores que podem afetar a predição da produção de leite. Outros estudos também sugeriram que a produção de leite estimada pela máquina de ordenha resulta em menor variabilidade que outros métodos (MONDRAGON et al., 1983) e maior repetibilidade (BEAL E NOTTER, 1990).

### ***Constituintes do leite***

Os resultados foram significativamente ( $P < 0,05$ ) superiores das vacas ANNE, NEAN, ANCR e HHHH em relação às vacas ANAN para os teores de gordura (Tabela 4). Com relação aos dados de proteína, as vacas NENE e HHHH, demonstraram superioridade em relação às vacas ANAN, ANHH, HHAN, ANNE. Já para os teores de lactose, vacas ANNE e NEAN mostraram níveis superiores a todos os demais genótipos. Por fim, para sólidos totais, vacas ANNE, NEAN, HHHH e NENE mostraram concentrações superiores ANAN e HHAN. Tais resultados demonstram basicamente dois fenômenos expressos: vacas oriundas de cruzamentos com maior distanciamento genético, neste estudo ANNE, NEAN e ANCR, mesmo com as produções leiteiras entre as maiores, também apresentaram maior concentração de nutrientes; o que já foi demonstrado por Brown et al., (2001), que o mesmo efeito conjunto de heterose sobre a produção e composição leiteira; O outro fenômeno aparentemente expresso associa maiores concentrações de nutrientes no leite de vacas com menor produção leiteira, no presente estudo HHHH e NENE, resultado também já encontrado por Restle et al.,(2003), onde vacas mais produtivas apresentaram menores concentrações dos nutrientes no leite.

Brown et al. (2001) avaliando ganho de peso do bezerro, a produção diária de leite e sua composição (gordura, proteína e células somáticas), de vacas Angus, Brahman e Angus x Brahman em pastagem cultivada, observaram teores de gordura de 3,1%, 3,4% e 4% para os respectivos genótipos, concentrações semelhantes às do presente estudo (Tabela 4) que foi realizado em pastagem natural. Os mesmos autores relatam que produções leiteiras com maiores teores de proteína e gordura estão associadas com maior ganho de peso pré-desmama dos bezerros.

A lactose constitui o principal carboidrato do leite, sintetizado na glândula mamária, apresentando concentrações inferiores no presente estudo (Tabela 4) às citadas por Restle et al. (2003), que encontraram 4,94% e 5,14% em vacas Nelore e Charolês, respectivamente. Fiss e Willton (1992) estudando composição do leite de vacas Hereford puras e Angus cruza, verificando 5,29% e 4,38% de lactose na composição do leite destas vacas. O NRC (1996) cita concentrações que variam entre 3,84% e 5,66%, incluindo, portanto, o padrão encontrado no presente estudo (Tabela 4).

Como os sólidos totais ou extrato seco total englobam todos os componentes do leite exceto a água verificou-se correlações ( $P < 0,05$ ) entre sólidos totais e gordura (0,91) e proteína (0,45). A gordura ainda apresentou correlação positiva com a proteína (0,20) e correlação negativa em relação aos teores de lactose (-0,26).

Em relação ao período da lactação os teores nutritivos também sofreram alterações ao decorrer do tempo (Tabela 5). Teores de proteína e sólidos totais tiveram um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) em cada período analisado. Porcentagem dos teores de gordura apesar de apresentarem diferenças significativas apenas entre as primeiras duas para a última análise sinaliza um aumento gradativo com o decorrer da lactação, diferentemente dos teores de lactose tiveram uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) no final da lactação em relação às duas primeiras semanas.

Entre os componentes do leite, a gordura é o que mais varia no decorrer da lactação. De maneira geral, a percentagem de gordura do leite aumenta gradualmente ao longo do dia de lactação, estando então, negativamente correlacionada com a produção de leite da vaca (RUTLEDGE et al., 1971; RICHARDSON et al., 1977), concordando com os resultados aqui encontrados (Tabela 5). Ribeiro et al. (1991) avaliando 182 dias de lactação verificaram aumento linear diário de 0,0124% no teor de gordura do leite de vacas Charolês. Também concordando com este estudo, Schmidt e Van Vleck (1976) e Maynard et al. (1984), verificaram um decréscimo no teor de lactose até o final da lactação, devido a correlação positiva com a produção de leite, por consequência do equilíbrio osmótico. Restle et al. (2003) verificaram máxima concentração (5,13%) justamente no pico de lactação.

## Conclusão

A utilização do cruzamento entre raças com maior distanciamento genético aumenta a produção leiteira em vacas de corte. Vacas F1 Angus-Nelore, Nelore-Angus e Angus-Caracu demonstraram maior habilidade maternal, com produções de leite superiores a quase todos os demais grupos raciais e também foram os genótipos que produziram o leite mais nutritivo mesmo com produção de leite elevada. Por consequência, produziram também, bezerros mais pesados.

Os cruzamentos podem ser utilizados para aumentar a produtividade da fase de cria na pecuária de corte extensiva sobre pastagem natural no Bioma Pampa.

## Referências Bibliográficas

- Albertini, T.Z.; Medeiros, S.R.; Torres, R.A.A. Características das curvas de lactação de vacas de corte cruzadas obtidas por diferentes métodos. In: 44<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007, **Anais**. Jaboticabal-SP, 2007.
- Albuquerque, L. G., J. P. Eler and M. J. R. P. Costa. 1993. Milk Production and Calf Performance from Birth to Weaning in Three Beef Cattle Breeds. **Rev. Bras. Zootec.** 22:745-754.
- Alencar, M. M. 1987. Heritability and effects of milk production on the reproductive efficiency of Canchim cows. **Rev. Bras. Zootec.**16:163-165.
- Alencar, M. M., F. J. Ruzza and E. J. S. Porto. 1988. Productive performance of Canchim and Nelore females. III. Milk production. **Rev. Bras. Zootec.**17:317-328.



- Beal, W. E., and D. R. Notter. 1990. Techniques for estimation of milk yield in beef cows and relationships of milk yield to calf weight gain and postpartum reproduction. **J. Anim. Sci.** 38:937–943.
- Brown, M. A., A. H. Brown, W. G. Jackson and J. R. Miesner. 2001. Genotype × environment interactions in milk yield and quality in Angus, Brahman, and reciprocal-cross on different forage systems. **J. Anim. Sci.** 79:1643–1649.
- Calegare, L., M. M. Alencar, I. U. Packer, and D. P. D. Lanna. 2007. Energy requirements and cow/calf efficiency of Nellore and Continental and British Bos taurus × Nellore crosses. **J. Anim. Sci.** 85:2413–2422
- Cartwright, T. C. and J. A. Carpenter. 1961. Effect of nursing habits on calf weights. **J. Anim. Sci.** Abstracts 2:904.
- Carvalho, P. C. F. 2006. Animal production in southern grasslands biome. **Brazilian J. Anim. Sci.** 35: 156-202.
- Cerdótes, L., J. Restle, D. C. Alves Filho, M. F. B. L. Nörnberg, J. L. Nörnberg, I. Heck and M. F. Silveira. 2004. Production and Composition of Milk of Cows of Four Genetic Groups Submitted to Two Feeding Managements During the Lactation Period. **Rev. Bras. Zootec.** 33:610-622.
- Cundiff, L. V., K. E. Gregory, F. J. Schwulst and R. M. Koch. 1974. Effects of heterosis on maternal performance and milk production in Hereford, Angus and Shorthorn cattle. **J. Anim. Sci.** 38:728-745.

- Fiss, C. F. and J. W. Wilton. 1992. Contribution of breed, cow weight, and milk yield to the traits of heifers and cows in four beef breeding systems. **J. Anim. Sci.** 70:3686–3696.
- Gaines, W. L. and F. A. Davidson. 1925. The effect of advance in lactation and gestation on mammary activity. **J. Gen. Physiol.** 2:325-332.
- Holloway, J. W., W. T. Butts, J. R. Mccurley, E. E. Beaver, H. L. Peeler and W. L. Backus. 1985. Breed x nutritional environment interactions for beef female weight and fatness, milk production and calf growth. **J. Anim. Sci.** 61:1354–1363.
- Jeffery, N. B., R. T. Berg and R. T. Hardin. 1971. Factors influencing milk yield of beef cattle. **Can. J. Anim. Sci.** 51:551-560.
- Jenkins, T. G. and C. L. Ferrell. 1984. A note on lactation curves of crossbred cows. **Anim. Prod.** 39:479-482.
- Jenkins, T. G. and C. L. Ferrell. 1992. Lactation characteristics of nine breeds of cattle fed various quantities of dietary energy. **J. Anim. Sci.** 57:1652-1660.
- Jenkins, T. G., C. L. Ferrell, and A. J. Roberts. 2000. Lactation and calf weight traits of mature cross bred cows fed varying daily levels of metabolizable energy. **J. Anim. Sci.** 78:7–14.
- Johnson, C.R., D. L. Lalman, M. A. Brown, L. A. Appeddu, D. S. Buchanan and R. P. Wettemann. 2003. Influence of milk production potential on forage dry matter intake by multiparous and primiparous Brangus females. **J. Anim. Sci.** 81:1837-1846.

- MacNeil, M. D. and T. B. Mott. 2006. Genetic analysis of gain from birth to weaning, milk production, and udder conformation in Line 1 Hereford cattle. **J. Anim. Sci.** 84:1639-1645.
- Maynard, L. A., J. K. Loosli, H. F. Hintz, and R. G. Warner. 1984. **Nutrição animal** 3ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos. 736p.
- McCuskey, A., D. R. Daley and C. M. Bailey. 1986. Milk yield of beef – type *Bos taurus* x *Bos indicus* dams. **J. Anim. Sci.** 63:177, .
- Mendonça, G.; Pimentel, M.A.; Cardellino, R.A. Osório, J.C.S. Produção de leite em primíparas de bovinos Hereford e desenvolvimento ponderal de terneiros cruzas taurinos e zebuínos. **Rev. Bras. Zootec.** v.31 p.467-474, 2002.
- Melton, A. A., J. K. Riggs, L. A. Nelson and T. C. Cartwright. 1967. Milk production, composition and calf gains of Angus, Charolais and Hereford cows. **J. Anim. Sci.** 26:804-809.
- Miller, S. P. and J. W. Wilton. 1999. Genetic relationships among direct and maternal components of milk yield and maternal weaning gain in a multibreed beef herd. **J. Anim. Sci.** 77:1155-1161.
- Minick, J. A., D. S. Buchanan and S. D. Rupert. 2001. Milk production of crossbred daughters of high- and low-milk EPD Angus and Hereford bulls. **J. Anim. Sci.** 79:1386-1393.
- Mondragon, I., J. W. Wilton, O. B. Allen, and H. Song. 1983. Stage of lactation effects, repeatabilities and influences on weaning weights of yield and composition of milk in beef cattle. **Can. J. Anim. Sci.** 63:751–761.

National Research Council – NRC. 1996. **Nutrient requirements of beef cattle.**

Washington, D.C. 242p.

National Research Council - NRC. 2001. **Nutrient requirements of dairy cattle.**

Washington, D.C. 381p.

Neidhardt, R., D. Plasse, J. H. Weniger, O. Verde, J. Beltran, and A. Benavides.

1979. Milk yield of Brahman cows in a tropical beef production system. **J.**

**Anim. Sci.** 48:1–6.

Notter, D. R., L. V. Cundiff, G. M. Smith, D. B. Laster and K. E. Gregory. 1978.

Characterization of biological types of cattle. VII. Milk production in young cows and transmitted and maternal effects on preweaning growth of progeny.

**J. Anim. Sci.** 46:908-921.

Oliveira, V.T.; Fontes, C.A.A.; Siqueira, J.G. Produção de leite e desempenho dos

bezerros de vacas Nelore e mestiças. **Rev. Bras. Zootec.** v.36, 2007.

Pimentel, M. A., Moraes, J. C. F., Jaume, C. M., Lemes, J. S., and C. C. Brauner.

2006. Lactation performance of Hereford cows raised in a range system in the state of Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Zootec.** 35: 159-168.

Pötter, L., J. F. P. Lobato and C. G. A. Mielitz Netto. 2000. Economic Analyses of a

Production Model to Primiparous Beef Heifers at Two, Three and Four Years of Age. **Rev. Bras. Zootec.** 29:861-870.

Restle, J., P. Pacheco, L. L. Pascoal, J. T. Padua, J. L. Moletta, A. K. Freitas and D.

T. Leite. 2004. Effect of pasture, milk yield and composition on the

performance of beef calves from different genetic groups. **Rev. Bras. Zootec.** 33: 691-703.

Restle, J., P. S. Pacheco, J. L. Moletta, I. L. Brondani, L. Cerdótes. 2003. Genetic Group and Postpartum Nutritional Level on the Milk Yield and Composition of Beef Cows. **Rev. Bras. Zootec.** 32:585-597.

Restle, J.; Senna, D. B.; Pacheco, P. S. 2005. Grupo genético e heterose na produção de leite de vacas de corte submetidas a diferentes sistemas de alimentação. **Rev. Bras. Zootec.** v.34, p.1329-1338.

Reynolds, W. L., T. M. Derouen and R. A. Bellows. 1978. Relationships of milk yield of dam to early growth rate os straightbred and crossbred calfs. **J. Anim. Sci.** 47:584-594.

Ribeiro, E. L. A., J. Restle and C. C. Pires, C.C. 1991. Milk production and composition in Charolais and Angus cows nursing straightbred or crossbred calves. **Rev. Bras. Pesq. Agr.** 26:1267-1273.

Ribeiro, E. L. A., J. Restle, M. A. Rocha, I. Y. Mizubuti and .L. D. F. Silva. 2001. Productive Efficiency of Angus and Charolais Primiparous Cows. **Rev. Bras. Zootec.** 30:125-132.

Richardson, F. D., J. Oliver, and G. P. Y. Clarke. 1977. Analisis of some factors wich affect the productivity of beef cows and of their calfs in a marginal rainfall area of Rhodesia. 2. The yield and composition of milk of suckling cows. **Anim. Prod.** 25:359-372.

- Robison, O. W., M. K. M. Youseff, and E. U. Dillard. 1978. Milk production in Hereford cows. I – Means and correlations. **J. Anim. Sci.** 47:131-136.
- Roso, V. M. and L. A. Fries. 2000. Evaluation of Maternal and Individual Heterosis on Prewaning Gain of Angus x Nellore Calves **Rev. Bras. Zootec.** 29:732-737.
- Rovira, J. Reproduccion y manejo de los rodeos de cria. Montevideo: Ed. Hemisferio Sur, 296p, 1974.
- Rovira, J. M. 1996. **Manejo nutritivo de los rodeos de cría em pastoreo.** Montevideo: Hemisferio Sur, 288p.
- Rutledge, J. J., O. W. Robison, W. T. Ahlschwede, and J. E. Legates. 1971. Milk yield and its influence on 205-day weight of beef calfs. **J. Anim. Sci.** 33:563-567.
- Schmidt, G. H. and L. D. Van Vleck. 1976. **Bases científicas de la producción lechera.** Zaragoza: Acríbia. 583p.
- Souza, E. M., J. C. Milagres, A. J. Regazzi, M. L. Martinez and M. A. Silva. 1996. Effects of Genetic and Environmental Factors on Milk Production of Dairy Gir Cattle in Brazil. **Rev. Bras. Zootec.** 25:889-901.
- Statistical Analyses Systems. **SAS Institute - user's guide.** Version 9.2, Cary: 2008.

## Figuras

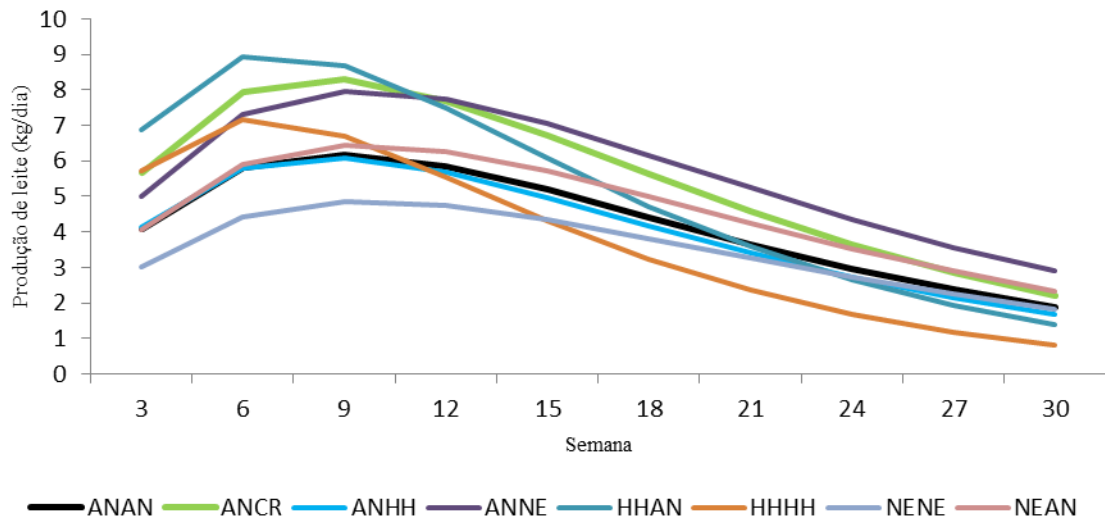


Figura 1. Curvas de lactação estimadas por ordenha mecânica (OM), de vacas Angus (ANAN), Nelore (NENE), Hereford (HHHH), F1 Angus-Caracu (ANCR), F1 Angus-Hereford (ANHH, HHAN) e F1 Angus-Nelore (ANNE, NEAN) ajustadas conforme modelo proposto por Jenkins e Ferrell (1984).

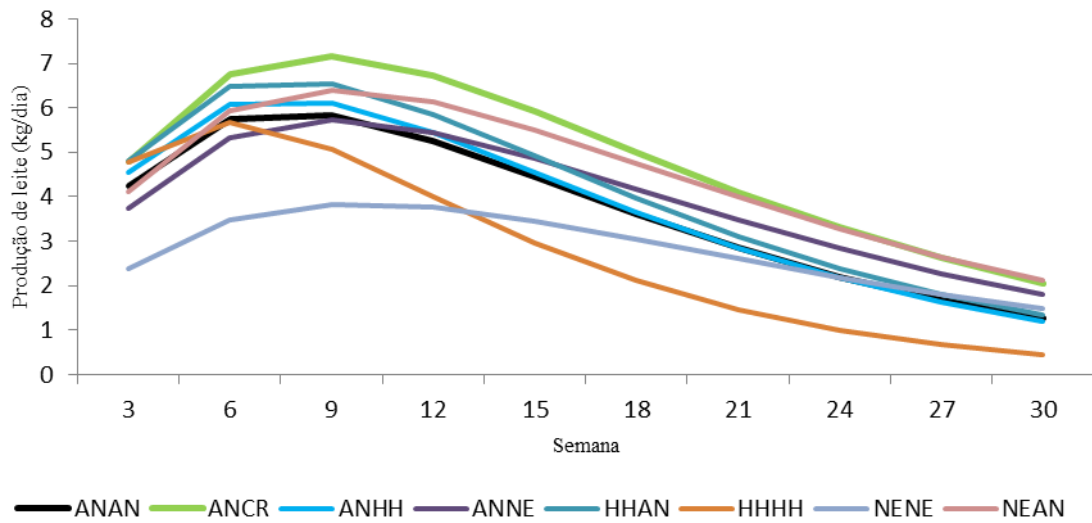


Figura 2. Curvas de lactação estimadas pela diferença de peso do bezerro pré e pós-mamada (PMP), de vacas de vacas Angus (ANAN), Nelore (NENE), Hereford (HHHH), F1 Angus-Caracu (ANCR), F1 Angus-Hereford (ANHH, HHAN) e F1 Angus-Nelore (ANNE, NEAN) ajustadas conforme modelo proposto por Jenkins e Ferrell (1984).



Tabela 1. Médias e erros padrão encontrados pelos métodos ordenha mecânica (OM) e de diferença de peso do bezerro pré e pós-mamada (PMP), para os parâmetros 'a' e 'k' da curva de lactação, produção no pico de lactação (PP), semana do pico de lactação (PS), produção total aos 210 dias de lactação (PT210) e persistência de lactação (PERS), de acordo com a composição racial.

	Composição Racial							
	ANAN	ANCR	ANHH	ANNE	HHHH	HHAN	NENE	NEAN
<b>OM</b>								
A	0,521 <sup>ab</sup> (0,057)	0,368 <sup>b</sup> (0,043)	0,507 <sup>ab</sup> (0,049)	0,436 <sup>ab</sup> (0,053)	0,326 <sup>b</sup> (0,072)	0,282 <sup>b</sup> (0,074)	0,727 <sup>a</sup> (0,090)	0,539 <sup>ab</sup> (0,063)
K	0,114 <sup>bc</sup> (0,007)	0,120 <sup>bc</sup> (0,007)	0,119 <sup>bc</sup> (0,006)	0,106 <sup>c</sup> (0,007)	0,158 <sup>a</sup> (0,009)	0,144 <sup>ab</sup> (0,009)	0,104 <sup>c</sup> (0,011)	0,106 <sup>c</sup> (0,008)
PP <sub>(Kg)</sub>	7,69 <sup>c</sup> (0,50)	10,31 <sup>a</sup> (0,38)	8,49 <sup>bc</sup> (0,43)	9,77 <sup>ab</sup> (0,47)	8,62 <sup>abc</sup> (0,63)	10,97 <sup>a</sup> (0,65)	7,31 <sup>c</sup> (0,79)	9,56 <sup>ab</sup> (0,56)
PS	9,08 <sup>bc</sup> (0,48)	8,72 <sup>ab</sup> (0,36)	8,94 <sup>bc</sup> (0,41)	9,83 <sup>c</sup> (0,44)	6,79 <sup>a</sup> (0,61)	7,32 <sup>ab</sup> (0,62)	9,39 <sup>bc</sup> (0,76)	10,60 <sup>c</sup> (0,53)
PT210 <sub>(Kg)</sub>	1007,7 <sup>b</sup> (50,00)	1231,6 <sup>a</sup> (43,73)	1018,9 <sup>b</sup> (47,33)	1300,2 <sup>a</sup> (51,32)	981,2 <sup>b</sup> (62,04)	1246,1 <sup>a</sup> (65,70)	969,6 <sup>b</sup> (76,41)	1253,9 <sup>a</sup> (59,07)
PERS <sub>(g/dia)</sub>	-26,7 <sup>b</sup> (2,76)	-35,13 <sup>a</sup> (2,20)	-30,0 <sup>ab</sup> (2,72)	-29,4 <sup>ab</sup> (2,75)	-34,9 <sup>ab</sup> (3,53)	-34,3 <sup>ab</sup> (3,74)	-24,4 <sup>ab</sup> (4,09)	-30,7 <sup>ab</sup> (2,99)
<b>PMP</b>								
A	0,479 <sup>b</sup> (0,05)	0,441 <sup>b</sup> (0,04)	0,440 <sup>b</sup> (0,05)	0,574 <sup>b</sup> (0,05)	0,373 <sup>b</sup> (0,08)	0,419 <sup>b</sup> (0,09)	0,931 <sup>a</sup> (0,08)	0,523 <sup>a</sup> (0,07)
K	0,130 <sup>ab</sup> (0,010)	0,117 <sup>b</sup> (0,008)	0,134 <sup>ab</sup> (0,009)	0,112 <sup>b</sup> (0,010)	0,174 <sup>a</sup> (0,015)	0,132 <sup>ab</sup> (0,018)	0,103 <sup>b</sup> (0,017)	0,110 <sup>b</sup> (0,014)
PP <sub>(Kg)</sub>	6,9 <sup>ab</sup> (0,411)	7,8 <sup>a</sup> (0,333)	7,3 <sup>ab</sup> (0,354)	6,8 <sup>ab</sup> (0,372)	7,4 <sup>ab</sup> (0,553)	7,7 <sup>ab</sup> (0,661)	5,2 <sup>b</sup> (0,628)	7,4 <sup>ab</sup> (0,514)
PS	8,28 <sup>ab</sup> (0,581)	9,01 <sup>ab</sup> (0,467)	8,18 <sup>ab</sup> (0,497)	9,66 <sup>a</sup> (0,522)	6,92 <sup>b</sup> (0,783)	8,37 <sup>ab</sup> (0,934)	11,18 <sup>a</sup> (0,887)	9,45 <sup>ab</sup> (0,720)
PT210 <sub>(Kg)</sub>	925,31 <sup>ab</sup> (59,58)	1104,1 <sup>a</sup> (48,90)	944,6 <sup>ab</sup> (51,90)	988,1 <sup>ab</sup> (54,54)	848,4 <sup>ab</sup> (80,19)	1017,6 <sup>ab</sup> (95,94)	774,4 <sup>b</sup> (91,10)	1053,5 <sup>ab</sup> (75,57)
PERS <sub>(g/dia)</sub>	-32,2 <sup>a</sup> (3,93)	-41,5 <sup>a</sup> (3,16)	-42,5 <sup>a</sup> (3,35)	-32,8 <sup>a</sup> (3,79)	-42,7 <sup>a</sup> (5,29)	-40,9 <sup>a</sup> (6,31)	-31,7 <sup>a</sup> (6,57)	-34,7 <sup>a</sup> (5,00)
PD210 <sub>(Kg)</sub>	193,61 <sup>bc</sup> (5,14)	220,45 <sup>a</sup> (4,10)	192,8 <sup>bc</sup> (4,51)	221,3 <sup>a</sup> (5,02)	183,67 <sup>c</sup> (6,61)	213,07 <sup>ab</sup> (6,73)	189,9 <sup>bc</sup> (8,12)	223,34 <sup>a</sup> (6,00)

Letras diferentes na linha, dentro de fatores, indicam médias diferentes (P<0,05).

Tabela 2. Médias e erros padrão encontrados pelos métodos ordenha mecânica (OM) e de diferença de peso do bezerro pré e pós-mamada (PMP), para os parâmetros 'a' e 'k' da curva de lactação, produção no pico de lactação (PP), semana do pico de lactação (PS), produção total aos 210 dias de lactação (PT210) e persistência de lactação (PERS), de acordo com o período de parição, sexo do bezerro e raça do touro (RT).

	PERÍODO		SEXO		RT	
	INÍCIO	FINAL	M	F	BN	BO
<b>OM</b>						
A	0,424 <sup>a</sup> (0,043)	0,502 <sup>a</sup> (0,039)	0,477 <sup>a</sup> (0,038)	0,449 <sup>a</sup> (0,040)	0,459 <sup>a</sup> (0,038)	0,467 <sup>a</sup> (0,040)
K	0,117 <sup>a</sup> (0,005)	0,125 <sup>a</sup> (0,005)	0,119 <sup>a</sup> (0,004)	0,123 <sup>a</sup> (0,005)	0,123 <sup>a</sup> (0,005)	0,119 <sup>a</sup> (0,005)
PP <sub>(kg)</sub>	9,61 <sup>a</sup> (0,38)	8,57 <sup>b</sup> (0,34)	9,00 <sup>a</sup> (0,340)	9,18 <sup>a</sup> (0,350)	9,10 <sup>a</sup> (0,33)	9,09 <sup>a</sup> (0,36)
OS	8,98 <sup>a</sup> (0,36)	8,68 <sup>a</sup> (0,33)	8,84 <sup>a</sup> (0,327)	8,82 <sup>a</sup> (0,338)	8,65 <sup>a</sup> (0,32)	9,02 <sup>a</sup> (0,34)
PT210 <sub>(kg)</sub>	1219,04 <sup>a</sup> (41,8)	1033,3 <sup>b</sup> (37,9)	1116,6 <sup>a</sup> (38,4)	1135,1 <sup>a</sup> (38,3)	1131 <sup>a</sup> (35,95)	1120 <sup>a</sup> (40,67)
PERS <sub>(g/dia)</sub>	-32,05 <sup>a</sup> (2,34)	-29,38 <sup>a</sup> (2,37)	-30,72 <sup>a</sup> (2,23)	-30,71 <sup>a</sup> (2,21)	-30,32 <sup>a</sup> (2,16)	-31,1 <sup>a</sup> (2,26)
<b>PMP</b>						
A	0,564 <sup>a</sup> (0,042)	0,482 <sup>a</sup> (0,039)	0,528 <sup>a</sup> (0,04)	0,516 <sup>a</sup> (0,04)	0,50 <sup>a</sup> (0,04)	0,54 <sup>a</sup> (0,04)
K	0,106 <sup>a</sup> (0,008)	0,100 <sup>b</sup> (0,007)	0,126 <sup>a</sup> (0,007)	0,126 <sup>a</sup> (0,007)	0,13 <sup>a</sup> (0,01)	0,13 <sup>a</sup> (0,01)
PP <sub>(kg)</sub>	7,7 <sup>a</sup> (0,310)	6,9 <sup>a</sup> (0,291)	7,13 <sup>a</sup> (0,286)	7,0 <sup>a</sup> (0,283)	7,4 <sup>a</sup> (0,27)	6,8 <sup>a</sup> (0,30)
OS	9,8 <sup>a</sup> (0,44)	7,9 <sup>b</sup> (0,41)	8,7 <sup>a</sup> (0,403)	9,1 <sup>a</sup> (0,400)	9,04 <sup>a</sup> (0,38)	8,72 <sup>a</sup> (0,42)
PT210 <sub>(kg)</sub>	1053,9 <sup>a</sup> (44,65)	860,12 <sup>b</sup> (42,24)	955,86 <sup>a</sup> (41,39)	958,21 <sup>a</sup> (41,23)	1008,8 <sup>a</sup> (39,7)	905,3 <sup>b</sup> (43,3)
PERS <sub>(g/dia)</sub>	-37,07 <sup>a</sup> (3,03)	-38,49 <sup>a</sup> (2,87)	-39,0 <sup>a</sup> (2,80)	-36,5 <sup>a</sup> (2,77)	-39,6 <sup>a</sup> (2,6)	-35,9 <sup>a</sup> (2,9)
PD210	213,46 <sup>a</sup> (3,94)	196,11 <sup>b</sup> (3,59)	207,0 <sup>a</sup> (3,54)	202,6 <sup>a</sup> (3,62)	203,9 <sup>a</sup> (3,45)	205,7 <sup>a</sup> (3,71)

Letras diferentes na linha, dentro de fatores, indicam médias diferentes ( $P < 0,05$ ).

Tabela 3. Médias e erros padrão encontrados pelos métodos ordenha mecânica (OM) e de diferença de peso do bezerro pré e pós-mamada (PMP), para os parâmetros 'a' e 'k' da curva de lactação, Produção no Pico de Lactação (PP), Semana do Pico de Lactação (PS), Produção Total aos 210 dias de lactação (PT210) e Persistência de Lactação (PERS), de acordo com a Ordem do Parto (OP).

	OP								
	3.1	4.1	4.18	4.2	5.2	5.3	6.2	6.3	6.4
<b>OM</b>									
A	0,563 <sup>ab</sup> (0,028)	0,365 <sup>ab</sup> (0,091)	0,603 <sup>ab</sup> (0,090)	0,604 <sup>a</sup> (0,039)	0,414 <sup>ab</sup> (0,073)	0,387 <sup>b</sup> (0,063)	0,446 <sup>ab</sup> (0,160)	0,356 <sup>ab</sup> (0,090)	0,432 <sup>ab</sup> (0,106)
K	0,127 <sup>a</sup> (0,003)	0,130 <sup>a</sup> (0,011)	0,113 <sup>a</sup> (0,011)	0,110 <sup>a</sup> (0,004)	0,121 <sup>a</sup> (0,009)	0,124 <sup>a</sup> (0,008)	0,118 <sup>a</sup> (0,020)	0,135 <sup>a</sup> (0,011)	0,114 <sup>a</sup> (0,013)
PP <sub>(kg)</sub>	6,69 <sup>c</sup> (0,244)	9,39 <sup>ab</sup> (0,784)	7,39 <sup>bc</sup> (0,764)	7,48 <sup>bc</sup> (0,338)	9,57 <sup>ab</sup> (0,624)	9,17 <sup>ab</sup> (0,540)	9,40 <sup>ab</sup> (1,37)	11,74 <sup>a</sup> (0,780)	11,02 <sup>a</sup> (0,909)
OS	8,54 <sup>b</sup> (0,243)	8,09 <sup>ab</sup> (0,780)	9,57 <sup>ab</sup> (0,767)	9,91 <sup>a</sup> (0,337)	8,59 <sup>ab</sup> (0,618)	8,41 <sup>ab</sup> (0,535)	8,61 <sup>ab</sup> (1,367)	7,93 <sup>ab</sup> (0,772)	9,85 <sup>a</sup> (0,906)
PT210 <sub>(kg)</sub>	879,9 <sup>c</sup> (22,3)	1241,6 <sup>ab</sup> (80,1)	908,5 <sup>bc</sup> (74,4)	1028 <sup>ab</sup> (31,35)	1097,9 <sup>ab</sup> (69,8)	1147,8 <sup>ab</sup> (53,8)	1279,1 <sup>ab</sup> (145,1)	1325,4 <sup>a</sup> (97,1)	1227,3 <sup>ab</sup> (143,3)
PERS <sub>(g/dia)</sub>	-27,3 <sup>a</sup> (1,25)	-38,7 <sup>a</sup> (4,46)	-22,7 <sup>a</sup> (3,88)	-26,8 <sup>a</sup> (1,79)	-36,7 <sup>a</sup> (3,33)	-33,3 <sup>a</sup> (2,95)	-18,2 <sup>a</sup> (11,9)	-43,1 <sup>a</sup> (8,43)	-29,4 <sup>a</sup> (5,24)
<b>PMP</b>									
A	0,536 <sup>a</sup> (0,03)	0,462 <sup>a</sup> (0,10)	0,566 <sup>a</sup> (0,07)	0,502 <sup>a</sup> (0,05)	0,487 <sup>a</sup> (0,09)	0,579 <sup>a</sup> (0,07)	-	-	-
K	0,138 <sup>a</sup> (0,005)	0,126 <sup>a</sup> (0,019)	0,114 <sup>a</sup> (0,013)	0,124 <sup>a</sup> (0,008)	0,137 <sup>a</sup> (0,017)	0,119 <sup>a</sup> (0,014)	-	-	-
PP <sub>(kg)</sub>	6,5 <sup>a</sup> (0,206)	7,8 <sup>a</sup> (0,745)	6,9 <sup>a</sup> (0,530)	7,0 <sup>a</sup> (0,337)	7,3 <sup>a</sup> (0,672)	6,9 <sup>a</sup> (0,530)	-	-	-
OS	8,4 <sup>a</sup> (0,294)	9,1 <sup>a</sup> (1,063)	9,3 <sup>a</sup> (0,759)	8,6 <sup>a</sup> (0,480)	8,5 <sup>a</sup> (0,959)	9,4 <sup>a</sup> (0,756)	-	-	-
PT210 <sub>(kg)</sub>	840,7 <sup>a</sup> (29,18)	1070,6 <sup>a</sup> (106,19)	965,8 <sup>a</sup> (74,95)	959,5 <sup>a</sup> (48,03)	945,6 <sup>a</sup> (96,03)	960,0 <sup>a</sup> (75,32)	-	-	-
PERS <sub>(g/dia)</sub>	-34,9 <sup>a</sup> (2,02)	-51,5 <sup>a</sup> (7,12)	-33,3 <sup>a</sup> (5,10)	-36,3 <sup>a</sup> (3,24)	-34,9 <sup>a</sup> (6,87)	-35,8 <sup>a</sup> (5,32)	-	-	-
PD210	186,52 <sup>bc</sup> (2,44)	214,13 <sup>a</sup> (7,80)	194,54 <sup>ab</sup> (7,38)	192,60 <sup>bc</sup> (3,34)	203,70 <sup>ab</sup> (6,24)	206,84 <sup>ab</sup> (5,37)	213,84 <sup>ab</sup> (13,51)	218,11 <sup>a</sup> (7,75)	212,82 <sup>ab</sup> (8,90)

Letras diferentes na linha, dentro de fatores, indicam médias diferentes ( $P < 0,05$ ).

Tabela 4. Médias estimadas para os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de acordo com a composição racial da vaca.

Comp. do Leite (%)	Composição Racial							
	ANAN	ANCR	ANHH	ANNE	HHHH	HHAN	NENE	NEAN
Gordura	3,33 <sup>b</sup> (0,09)	3,91 <sup>a</sup> (0,08)	3,66 <sup>ab</sup> (0,09)	4,05 <sup>a</sup> (0,10)	3,88 <sup>a</sup> (0,13)	3,59 <sup>ab</sup> (0,13)	3,81 <sup>ab</sup> (0,16)	4,02 <sup>a</sup> (0,13)
Proteína	2,91 <sup>b</sup> (0,04)	3,13 <sup>ab</sup> (0,03)	3,03 <sup>b</sup> (0,03)	3,10 <sup>ab</sup> (0,04)	3,28 <sup>a</sup> (0,05)	2,98 <sup>b</sup> (0,05)	3,30 <sup>a</sup> (0,06)	3,13 <sup>ab</sup> (0,05)
Lactose	4,65 <sup>b</sup> (0,03)	4,64 <sup>b</sup> (0,02)	4,61 <sup>b</sup> (0,02)	4,86 <sup>a</sup> (0,03)	4,59 <sup>b</sup> (0,03)	4,59 <sup>b</sup> (0,03)	4,67 <sup>b</sup> (0,04)	4,80 <sup>a</sup> (0,03)
Sól. Totais	11,7 <sup>b</sup> (0,12)	12,5 <sup>ab</sup> (0,11)	12,2 <sup>ab</sup> (0,12)	12,9 <sup>a</sup> (0,13)	12,7 <sup>a</sup> (0,17)	12,0 <sup>b</sup> (0,16)	12,8 <sup>a</sup> (0,21)	12,9 <sup>a</sup> (0,16)

Médias na *mesma* coluna com *letras diferentes* diferem entre si.

Tabela 5. Médias e erros padrão estimadas para os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de acordo com o período de lactação.

Componentes do Leite (%)	Período de Lactação		
	Início (40-60 dias)	Meio (90-110 dias)	Fim (180-210 dias)
Gordura	3,39 <sup>a</sup> (0,06)	3,56 <sup>a</sup> (0,06)	4,39 <sup>b</sup> (0,06)
Proteína	2,86 <sup>a</sup> (0,02)	3,07 <sup>b</sup> (0,02)	3,40 <sup>c</sup> (0,02)
Lactose	4,77 <sup>a</sup> (0,02)	4,80 <sup>a</sup> (0,01)	4,50 <sup>b</sup> (0,02)
Sól. Totais	11,9 <sup>a</sup> (0,149)	12,3 <sup>b</sup> (0,140)	13,3 <sup>c</sup> (0,145)

Médias na *mesma* coluna com *letras diferentes* diferem entre si.

## 5. Artigo 2

### **Sistemas Inteligentes Aplicados a Indicadores Metabólicos para Estudo de Eficiência Reprodutiva em Vacas de Corte**

Rodrigo Carneiro Campos de Azambuja<sup>1</sup>, Sandro da Silva Camargo<sup>2</sup>, Josiane de Oliveira Feijó<sup>1</sup>, Pedro Faraco Rodrigues<sup>1</sup>, Leonardo de Melo Menezes<sup>1</sup>, Marcio Nunes Corrêa<sup>1</sup>, Augusto Schneider<sup>1</sup>, Fernando Flores Cardoso<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Pelotas, RS

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) – Bagé, RS

<sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Bagé, RS

#### **Resumo**

A fim de se atingir um maior sucesso na produção de bovinos de corte um dos fatores que tem sido aperfeiçoado é o melhor aproveitamento da capacidade reprodutiva das vacas. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi aplicar técnicas de inteligência computacional para modelar o comportamento de indicadores metabólicos durante o período de transição gestante/lactante e suas relações com a eficiência reprodutiva em vacas de corte. Para tal foram utilizados dados de 32 vacas de primeira, segunda e terceira crias, com idades entre três e cinco anos, sob pastoreio contínuo em pastagens naturais no sul bioma Pampa. Foram coletados os seguintes dados: Quatro leituras nos dias zero (data do parto), 14, 28 e 42 (dias pós-parto) para os hormônios IGF-I e INS. Para os demais indicadores, as leituras foram realizadas nos dias -30 (30 dias pré-parto), zero (data do parto), 7, 14, 21, 28, 35 e

42. No presente trabalho, foram aplicadas técnicas de aprendizado supervisionado, com a utilização de classificação. Foi priorizada a construção de modelos do tipo caixa branca, onde se enquadram os algoritmos de geração de regras ou árvores de decisão. O algoritmo de geração de árvores utilizado foi o J48 e na fase de avaliação dos modelos foi utilizada a técnica 10-fold cross validation para assegurar a correta mensuração da capacidade preditiva dos modelos. De acordo com o princípio da lei da parcimônia, os modelos mais complexos foram preteridos em favor dos mais simples. Foram construídas árvores de decisão a partir do algoritmo *J48* com os seguintes graus de precisão para Peso, ECC, Beta-hidróxibutirato, insulina e IGF-I: 59,38%, 59,38%, 71,38%, 78,38% e 90%, respectivamente. Os modelos computacionais criados, mostraram que o hormônio Fator de Crescimento similar à Insulina tipo 1 (IGF-I) pode ser utilizado para prever a propensão da vaca a ter um diagnóstico positivo de prenhez no ano seguinte.

Palavras-chave: Árvores de decisão; inteligência computacional; período de transição; predição de prenhez; vacas de corte.

### **Introdução**

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, totalizando em torno de 215 milhões de cabeças, das quais, aproximadamente, 160 milhões são destinadas à produção de carne (IBGE, 2016). A aptidão do país para a pecuária é favorecida, principalmente, pela disponibilidade de grandes áreas de pastagens, pelo clima favorável e, mais recentemente, pela profissionalização da cadeia produtiva da carne.

Para que o Brasil se mantenha competitivo no mercado de carne bovina e possa buscar nichos de melhor remuneração é necessário atender às crescentes exigências dos clientes internos e externos, fazendo-se necessária a busca por animais que apresentem alto potencial produtivo, precocidade e eficiência reprodutiva, aliadas a uma alta capacidade de adaptação ao ambiente. O desafio é aumentar a produtividade do rebanho e atender as exigências do mercado consumidor de carne bovina, com produto de qualidade, com o inevitável aumento do número de cabeças do rebanho, mas buscando equilíbrio entre preservação ambiental e lucratividade do sistema. A fim de se atingir um maior sucesso na produção de bovinos de corte um dos fatores que tem sido aperfeiçoado é o melhor aproveitamento da capacidade reprodutiva das vacas (YAVAS E WALTON, 2000).

Todavia, a lactação é um estado dominante sobre outras atividades fisiológicas, fazendo com que a vaca priorize a produção de leite para o bezerro em relação à atividade reprodutiva (BAUMAN, 2000). Este padrão metabólico é clássico em vacas leiteiras, onde a alta produção de leite, em parte, só é possível de ser obtida através da utilização de parte da reserva de gordura corporal para obtenção de energia e gordura para a síntese de leite na glândula mamária. Este evento homeorrético resulta em um Balanço Energético Negativo (BEN), típico da fase inicial de lactação (BUTLER, 2003). No mesmo sentido, períodos prolongados de aciclicidade em vacas de corte são atribuídos aos efeitos da amamentação dos bezerros (LUCY, 2003; WETTEMANN et al., 2003).

Existem indicativos metabólicos e hormonais de BEN, como elevação dos níveis sanguíneos de Beta-hidroxibutirato e queda nos níveis de IGF-I, em vacas de corte criadas em pastagens naturais no sul do Brasil (AZAMBUJA, 2013). A severidade do BEN pode estar relacionada à adaptabilidade das matrizes ao meio



ambiente e, desta forma, vacas mais adaptadas às condições do ambiente podem apresentar um melhor desempenho produtivo. Apesar da importância destes processos na eficiência reprodutiva das vacas de corte, eles ainda não são entendidos em sua plenitude.

Dentro deste escopo, a complexidade inerente a todos estes processos biológicos dificulta sua plena compreensão, principalmente se for utilizada uma abordagem holística baseada na análise de grandes quantidades de dados, seja por especialistas de domínio humanos, seja por técnicas estatísticas convencionais (CAMARGO et al., 2015). Por outro lado, nos dias atuais, um dos grandes impulsos para o desenvolvimento da computação é o projeto de modelos algorítmicos com a finalidade de tratar problemas de análise de dados complexos (ENGELBRECHT, 2007). Como consequência deste desenvolvimento, a literatura tem relatado muitos casos de sucesso através da modelagem de inteligência biológica e natural, nas mais variadas áreas de conhecimento, resultando no que se convencionou chamar de "Sistemas Inteligentes".

Como exemplos bem sucedidos da aplicação de sistemas inteligentes em problemas da área biológica, para análise de grandes quantidades de dados, pode ser citada a aplicação de redes neurais para detectar padrões de alterações metabólicas envolvidas na ocorrência de mastite (CAMPOS, 2006). Outro exemplo é a utilização técnicas de *clustering* para identificar os genes diferencialmente expressos em laranjas infectadas por duas bactérias diferentes (BRETON e t al., 2014). Abordagens inteligentes baseadas em regras de associação também foram utilizadas com sucesso para modelar a especificidade da protease do Vírus HIV-1 (CAMARGO E ENGEL, 2006). Desta forma, a utilização de sistemas inteligentes de modelagem computacional aparece como nova alternativa para análise de dados

complexos de metabólitos e hormônios no pós-parto recente, e suas relações com a eficiência reprodutiva em vacas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi aplicar técnicas de inteligência computacional para modelar o comportamento de indicadores metabólicos durante o período de transição gestante/lactante e suas relações com a reconcepção em vacas de corte criadas no sul do Brasil.

## **Material e Métodos**

### ***Coleta de dados***

Para este trabalho foram utilizados dados de 32 vacas de primeira, segunda e terceira crias, com idades entre três e cinco anos, sob pastoreio contínuo, com carga animal média de 315 kg/ha, catalogadas no estudo de Azambuja (2013). As vacas são oriundas de um experimento de cruzamentos que foi conduzido entre 2006 e 2016 no Centro de Pesquisa Pecuária dos Campos Sul-Brasileiros, Embrapa Pecuária Sul. Para o presente estudo foram utilizadas vacas de quatro composições raciais, sendo elas: sete animais da raça Angus (ANAN), nove do cruzamento de vacas Angus com touros Nelore (ANNE), oito do cruzamento de vacas Nelore com touros Angus (NEAN), e oito da raça Nelore (NENE).

Para cada uma das vacas disponíveis para o experimento, foram coletados os seguintes dados: peso, escore de condição corporal (ECC), hormônios fator de crescimento semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-I) e Insulina (INS); e o metabólito Beta-Hidroxibutirato (BHB).

Foram feitas múltiplas leituras para os indicadores acima mencionados, de acordo com duas abordagens distintas. Pela primeira abordagem, foram realizadas

quatro leituras nos dias zero (data do parto), 14, 28 e 42 (dias pós- parto). A esta abordagem foram submetidos os hormônios IGF-I e INS. Para os demais indicadores, as leituras foram realizadas nos dias -30 (30 dias pré-parto), zero (data do parto), 7, 14, 21, 28, 35 e 42.

As tabelas 1 e 2 apresentam os dados que foram utilizados nos experimentos.

A tabela 1 apresenta os indicadores para os quais foi feita uma única leitura.

Tabela 1. Indicadores, de leitura única, utilizados para criação dos modelos.

Nome do campo	Descrição
Vaca	Número do brinco da vaca
Raça	Composição racial da vaca
Terneiro	Número do brinco do terneiro
Nascimento	Data de nascimento do terneiro
PN	Peso do terneiro ao nascer
PD	Peso do terneiro ao desmame
Sexo	Sexo do terneiro, que pode ser macho ( <i>M</i> ) ou fêmea ( <i>F</i> )
Desmame	Data do desmame
OP	Ordem do parto da vaca, que pode ser 1, 2 ou 3
RT	Raça do touro, que pode ser Brangus ( <i>BN</i> ) ou Braford ( <i>BO</i> )
DG	Diagnóstico indicando se a vaca ficou <i>pregha</i> ou <i>vazia</i> após a estação de monta

A tabela 2 apresenta os indicadores produtivos, metabólicos e hormonais utilizados no experimento. Para cada um destes indicadores foram realizadas múltiplas leituras em diferentes datas, tomando-se por base a data do parto. As colunas com valor S indicam que foi realizada a medida do indicador na respectiva data. Colunas sem valor indicam que o indicador não foi medido naquela data.

Tabela 2. Indicadores, com múltiplas leituras, utilizados para criação dos modelos.

Sigla do indicador	Pré-parto	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
BHB	S	S	S	S	S	S	S	S
INS	-	S	-	S	-	S	-	S
IGFI	-	S	-	S	-	S	-	S
ECC	S	S	S	S	S	S	S	S
PESO	S	S	S	S	S	S	S	S

BHB= Beta-hidróxibutirato; INS= Insulina; IGFI= Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1; ECC= Escore de condição corporal;

## ***Inteligência Computacional e Árvores de Decisão***

A Inteligência Computacional (IC) pode ser conceituada como o ramo da ciência da computação que se preocupa com a automatização do comportamento inteligente. Atualmente, a área de IC engloba uma ampla variedade de sub-campos, dentre eles, uma das mais férteis áreas de pesquisa é a que se preocupa com a construção de sistemas de alto desempenho capazes de aprender através da experiência e obter conhecimento a partir de dados (CAMARGO, 2010).

Segundo Konar (2000), há quatro diferentes classes de aprendizado de máquina: aprendizado supervisionado, aprendizado não supervisionado, aprendizado por reforço e aprendizado por programação em lógica indutiva. No presente trabalho, foram aplicadas as técnicas de aprendizado supervisionado, que se referem a uma classe de algoritmos que visam aprender um relacionamento entre dados de entradas e dados de saída. Este relacionamento geralmente descreve uma dependência ou função  $f_o\{x\}$  presente de forma implícita em um conjunto de treinamento  $D = [x(i), y(i)] \in \mathcal{R} \times \mathcal{R}, i=1, \dots, l$  consistindo de  $l$  pares  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_l, y_l)$ . As entradas  $x$  consistem em um vetor  $n$ -dimensional onde  $x \in \mathcal{R}$ , e as saídas  $y$  consistem em um vetor 1-dimensional onde  $y \in \mathcal{R}$ . Dependendo do valor a ser predito o aprendizado supervisionado pode ser de dois tipos: regressão quando os valores de saída são contínuos, e classificação quando os valores de saída são discretos (KECMAN, 2001). Durante o processo de treinamento, as amostras são sucessivamente submetidas ao algoritmo de aprendizado. Para cada amostra de entrada, o algoritmo tenta prever a saída. A saída predita pelo algoritmo é comparada com a saída real, a diferença entre elas é utilizada para reajustar os parâmetros do modelo. Desta forma, o algoritmo iterativamente ajusta seus

parâmetros para criar um modelo que faça um mapeamento das entradas para a saída. Após o processo de aprendizado supervisionado, é criado um modelo que pode ser utilizado para simular o conhecimento do especialista do domínio.

Neste trabalho, foram aplicadas as técnicas de classificação, que estão inseridas no escopo do aprendizado supervisionado. Foi priorizada a construção de modelos do tipo caixa branca, onde se enquadram os algoritmos de geração de regras ou árvores de decisão. Apesar de estes modelos serem lineares e, tipicamente, terem uma capacidade preditiva menor que modelos não lineares, sua maior vantagem é a geração de modelos interpretáveis (CAMARGO, 2002). Na fase de avaliação dos modelos foi utilizada a técnica *10-fold cross validation* para assegurar a correta mensuração da capacidade preditiva dos modelos. Esta técnica é particularmente útil quando o conjunto de dados de treinamento é pequeno, ou quando a quantidade de parâmetros do modelo é grande (KOHAVI, 1995).

O algoritmo de geração de árvores utilizado foi o *J48* (QUINLAN, 1993). Este algoritmo classifica instâncias ordenando-as da raiz da árvore em direção a suas folhas. As características mais relevantes posicionam-se mais perto da raiz da árvore. À medida que a relevância da característica diminui, esta característica é posicionada mais longe da raiz e mais próxima às folhas (MITCHELL, 1997).

Para qualquer problema de classificação, podem ser geradas diversas árvores de decisão que o explicam. Cada árvore possui um nível de complexidade, diretamente proporcional à sua quantidade de nodos, e um nível de precisão, diretamente proporcional à quantidade de instâncias que são corretamente classificadas. De acordo com o princípio científico do reducionismo (SCOTT, 2004), havendo diversas explicações aceitas para um determinado fenômeno, aquelas mais complexas devem ser preteridas em favor das mais simples, que são mais

facilmente verificáveis. Este princípio também é conhecido por lei da parcimônia ou navalha de Occam (ORESQUES, 1994).

## **Resultados e Discussão**

Sobre os dados apresentados nas tabelas 1 e 2, utilizando os dados das 32 amostras, foi aplicado o algoritmo de classificação *J48* (QUINLAN, 1993). Foram realizados cinco experimentos. O primeiro experimento considerou, como dados de entrada, somente os dados da tabela 1 e as medições de peso das vacas, a fim de prever a condição de prenhez no ano seguinte. Os experimentos seguintes foram repetidos com os dados de Escore de Condição Corporal (ECC), Beta-hidróxibutirato (BHB), Insulina (INS) e Fator de Crescimento similar à Insulina Tipo 1 (IGF-I). A partir destes experimentos foram criados modelos preditivos para o diagnóstico de prenhez da vaca a partir dos dados de entrada. Foram encontrados diversos padrões de comportamento dos metabólitos que influenciam tal diagnóstico. A seguir são apresentadas as árvores de decisão que expressam os padrões encontrados, assim como o seu nível de precisão.

É relevante salientar que a vaca pode assumir, no ano seguinte, duas situações distintas: prenha ou vazia. Desta forma, uma escolha aleatória teria 50% de chance de acerto. Assim, toma-se por base que um modelo, para ser útil, precisaria apresentar uma precisão significativamente melhor que 50% de acerto para suas decisões.

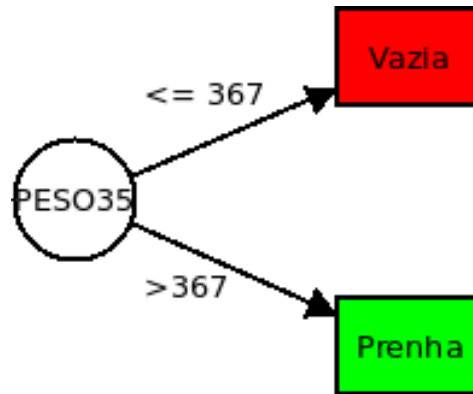


Figura 1: Árvore de decisão criada pelo algoritmo J48 para predição do diagnóstico de prenhez a partir dos níveis do peso das vacas.

A partir dos dados, foi inferido pelo algoritmo um modelo que considera que o peso da vaca, no 35º dia pós-parto, é determinante para a prenhez no ano seguinte (Figura 1). Caso a vaca esteja com peso menor ou igual a 367 kg, implica uma menor probabilidade de prenhez positiva. No entanto, para esta variável não se encontrou precisão satisfatória no exercício, tendo o modelo com maior grau de precisão apenas 59,38% de acerto. Tais resultados estão provavelmente relacionados naturalmente aos diferentes biótipos e linhagens das raças utilizadas (CUNDIFF et al., 1998), onde vacas embora mais leves, podem estar mais gordas, não representando, o peso, as reservas teciduais corporais, e sua relação positiva com nova concepção (MORAES et al., 2005).

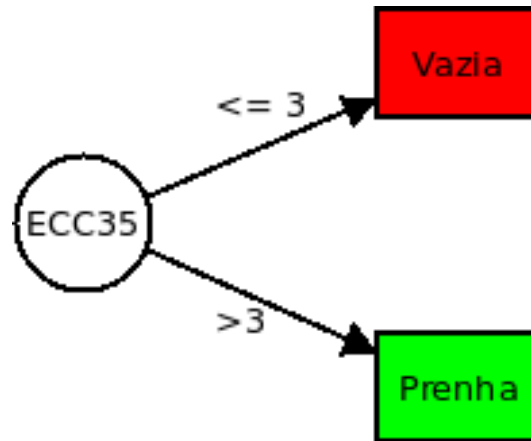


Figura 2: Árvore de decisão criada pelo algoritmo J48 para predição do diagnóstico de prenhez a partir do escore de condição corporal das vacas.

O modelo inferido a partir destes dados de entrada de escore de condição corporal (ECC) identificou que vacas com ECC menor ou igual a três, analisado no 35º dia pós-parto, tendem a não entrar no cio e conceber (Figura 2). O escore menor ou igual a três indica que a vaca está magra, com poucas reservas corporais. De acordo com Dias (1991), a avaliação do ECC ou de suas flutuações para estimar as reservas corporais é mais adequada do que as mensurações de peso vivo, pois sua análise independe do tamanho e do estado fisiológico do animal (prenhez, etc). No entanto, no presente estudo, para tal variável não se encontrou precisão satisfatória no exercício, tendo o modelo com maior grau de precisão 59,38% de acerto. Embora esteja estabelecido que o ECC está diretamente relacionado com as taxas de prenhez em vacas de corte (FAULKNER, 1990; DUNN e MOSS, 1992; WRIGHT et al., 1992; KUNKLE et al. 1994; FERREIRA et al., 2000; MORAES et al., 2005), os resultados do presente estudo mostram que podem existir diferenças na adaptabilidade de indivíduos e composições raciais ao ambiente, onde vacas com ECC's iguais apresentem comportamento metabólico, hormonal e reprodutivo



diferente. Isto reforça a necessidade de novas abordagens para estudar as relações causa-efeito entre estas variáveis.

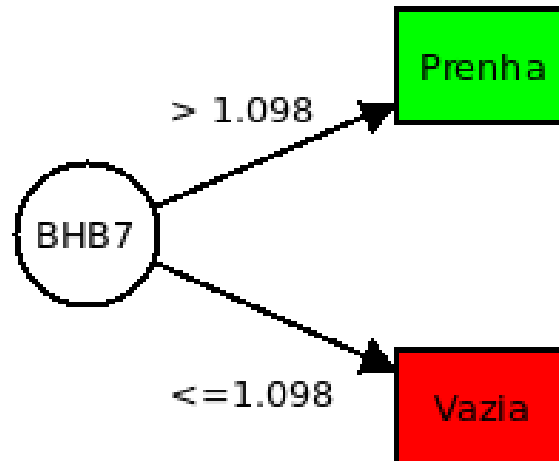


Figura 3: Árvore de decisão criada pelo algoritmo J48 para predição do diagnóstico de prenhez a partir dos níveis do metabólito Beta-hidróxibutirato.

O modelo informa que a medida do Beta-hidróxibutirato (BHB) no 7º dia pós-parto, sendo menor que 1.098 mmol/L indica uma propensão à vaca não estar prenha no próximo ano (Figura 3).

Este modelo não é coerente com o consenso da literatura científica, necessitando de mais estudos. Maiores níveis séricos de BHB indicam mobilização de reservas corporais, com consequentes prejuízos ao metabolismo, saúde e atividade reprodutiva das vacas (CHILLIARD; BOCQUIER; DOREAU, 1998; SMITH et al., 1997, LEROY et al., 2008). Tais resultados podem estar associados a diferenças na adaptação metabólica de indivíduos e composições raciais, onde vacas mesmo com níveis séricos elevados de BHB não tenham sua função reprodutiva prejudicada. Isto reforça a necessidade de novas abordagens para

estudar as relações causa-efeito entre estas variáveis. Por outro lado, a precisão de 71,875% do modelo mostra um ganho em relação aos modelos anteriores.

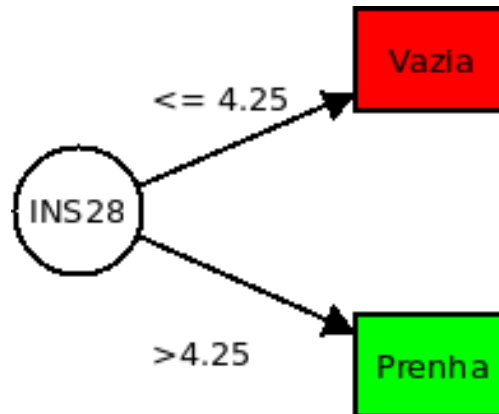


Figura 4: Árvore de decisão criada pelo algoritmo J48 para predição do diagnóstico de prenhez a partir dos níveis do hormônio insulina.

Para o hormônio Insulina (INS) encontrou-se precisão de intermediária a satisfatória no exercício, tendo o modelo com maior grau de precisão 78, 175% de acerto (Figura 4). A insulina é responsável por estimular o transporte da glicose para dentro das células por proteínas (GLUT) presentes na membrana plasmática (SALES, 2011). Dessa forma, a insulina tem papel importante no metabolismo energético celular (LAWRENCE et al., 2007). Além disso, a insulina reduz a oxidação de AGNE pelo fígado, inibe a lipólise, aumenta a utilização de corpos cetônicos em tecidos periféricos e diminui tanto a disponibilidade de substrato como a atividade de enzimas hepáticas responsáveis pela cetogênese (BROCKMAN; LAARVELD, 1986). Neste contexto, os níveis de insulina estão diretamente relacionados aos níveis de IGF-I (PORETSKY et al., 1999) e, além disso, atuam sinergicamente como reguladores da esteroidogênese e do crescimento folicular ovariano (BUTLER, 2003), corroborando os resultados do presente estudo.

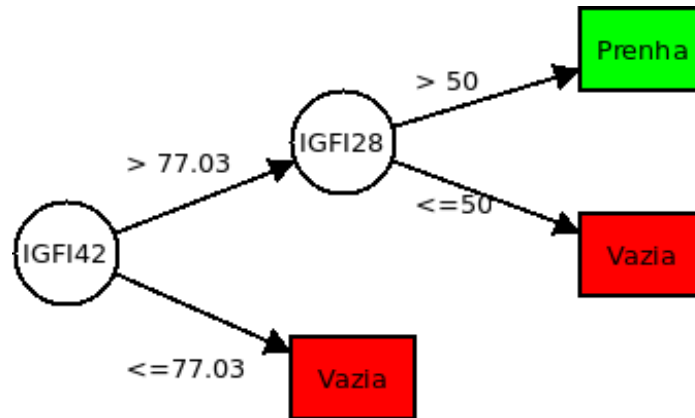


Figura 5: Árvore de decisão criada pelo algoritmo J48 para predição do diagnóstico de prenhez a partir dos níveis do hormônio IGF-I.

O árvore de árvore inferido para o hormônio IGF-I mostra que o nível de IGF142, que representa o hormônio IGF-I medido no 42º dia pós-parto, é o indicador mais importante para a predição do diagnóstico no ano seguinte (Figura 5). O ramo inferior da árvore mostra que, caso o nível de IGF142 seja igual ou inferior a 77,03 ng/dL o diagnóstico da vaca será *vazia*. Já o ramo superior, mostra que no caso de IGF142 seja superior ao limiar de 77,03 ng/dL, a predição do diagnóstico passa pela análise do nível do indicador IGF128, que representa o hormônio IGF-I medido no 28º dia pós-parto. Caso este indicador tenha valor igual ou inferior a 50 ng/dL, o diagnóstico também será *vazia*. Caso os dois indicadores tenham valores superiores aos limiares mencionados, o diagnóstico será *prenga*.

A figura 6 mostra a representação espacial da árvore de decisão com as amostras utilizadas. Os símbolos em azul mostram as vacas prenhas e os símbolos em vermelho, as vacas vazias. São utilizados símbolos diferentes para denotar as diferentes raças utilizadas no experimento. As linhas verdes indicam os limiares apontados pela árvore de decisão. O gráfico mostra que todas as vacas, com nível de IGF142 igual ou inferior ao limiar de 77,03 ng/dL, estão com diagnóstico *vazia*.

Desta forma, esta regra tem 100% de precisão. A regra que indica nível de IGF142 igual ou inferior a 77,03 ng/dL e nível de IGF128 igual ou inferior a 50 ng/dL, indica uma vaca com diagnóstico *vazia*. Esta regra tem um erro em cinco amostras, representando 20% de erro. A última regra, apontando nível de IGF142 superior a 77,03 ng/dL e nível de IGF128 superior a 50 ng/dL, indica que a vaca deverá ter diagnóstico *preença*. Esta regra tem dois erros em 15 amostras, apresentando 13% de erro.

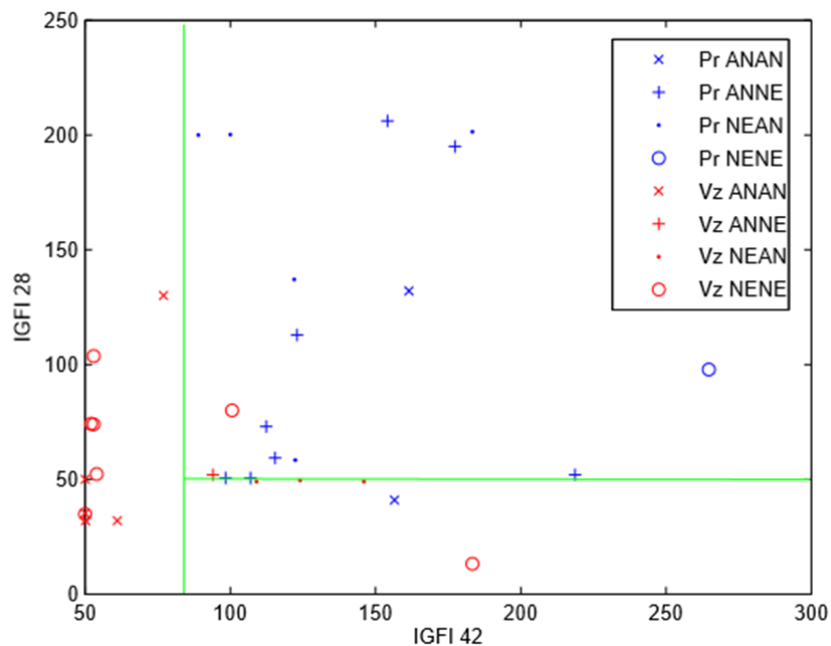


Figura 6. Representação espacial da árvore de decisão.

Para corroborar com os resultados apresentados acima, foram analisados os níveis médios de Fator de Crescimento Similar à Insulina tipo 1 (IGF-I) nas vacas prenhas e vazias. Enquanto as vacas prenhas apresentam um crescimento de produção do IGF-I após o parto, as vacas vazias apresentam uma diminuição da produção deste hormônio (Figura 7).

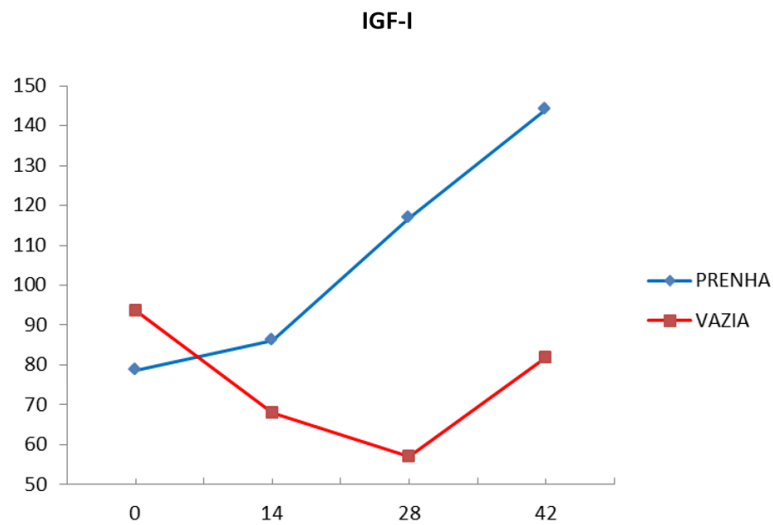


Figura 7. Diferenças de produção de IGF-I em vacas prenhas e vazias.

Em resumo, a árvore apresentada na figura 5 apresenta 3 erros de classificação em 32 amostras, representando mais de 90% de acerto. Desta forma, conclui-se que o nível do hormônio Fator de Crescimento similar à Insulina tipo 1, medido nos 42º e 28º dias pós-parto, pode ser determinante para predição do estado de prenhez no ano seguinte, podendo ser tomado como parâmetro para seleção das vacas que serão descartadas, e tornando possível um incremento da eficiência reprodutiva do lote analisado.

Tais resultados são confirmados pelas inúmeras relações deste hormônio com aspectos da reprodução relatados na literatura, conferindo a possibilidade de utilização dos mesmos na predição de diagnóstico positivo de prenhez em vacas de corte. Butler et al., (2003), relacionaram o nível sanguíneo de IGF-I ao retorno a atividade ovariana pós-parto. Isto estaria relacionado à atuação do IGF-I no crescimento e diferenciação de folículos antrais (RIVERA; FORTUNE, 2003). Ainda neste sentido, vários estudos demonstram que vacas que ovulam o folículo dominante da primeira onda pós-parto tem maiores níveis sanguíneos de IGF-I do

que vacas anovulatórias (BUTLER et al., 2006, KAWASHIMA et al., 2007). Outros estudos indicaram que o IGF-I funciona como um modulador da ação de gonadotrofinas, na teca e na granulosa, como estimulante da proliferação e diferenciação celular (ARMSTRONG; WEBB, 1997) e reduzindo a atresia folicular (EL-ROEIY et al., 1994). E, na sequência dos benefícios reprodutivos, Velazquez et al. (2005), associaram os níveis do hormônio metabólico a sobrevivência embrionária.

Apesar da pequena quantidade de amostras utilizadas para o experimento, a aplicação de técnicas de validação cruzada assegura uma mensuração apropriada da capacidade preditiva dos modelos aqui criados. Por outro lado, dentre os trabalhos futuros, pretende-se expandir o número de animais estudados, a fim de comprovar a generalidade dos resultados aqui obtidos.

### **Conclusões**

A utilização de técnicas de inteligência computacional para predição de eficiência reprodutiva em vacas de corte, a partir de dados de metabólitos e hormônios, é uma alternativa válida. Os modelos computacionais aqui criados, através da técnica de árvores de decisão, mostraram que o hormônio Fator de Crescimento similar à Insulina tipo 1 (IGF-I) pode ser utilizado para predizer a propensão da vaca a ter um diagnóstico de prenhez positivo no ano seguinte.

A utilização dos resultados aqui apresentados possibilita a obtenção de subsídios para selecionar as vacas de descarte e, desta forma, contribuir para um incremento da eficiência reprodutiva de vacas de corte.

## Referências

- ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Rev. in Rep.**, v.2, p.139-146, 1997.
- AZAMBUJA, R. C. C. **Características metabólicas do período de transição e eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes genótipos criadas no sul do Brasil.** *Universidade Federal de Pelotas (Dissertação de Mestrado)*, 79 p., 2013.
- BAUMAN, D.E. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeoresis. In: CRONJÉ, PB. **Ruminant physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction.** Wallingford: CAB 2000. Cap.18, p.311-328, 2000.
- BRETON, M.C.; CAMARGO, S. S.; KISHI, L.T.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Identification of differentially expressed genes in *Citrus sinensis* leaves and branches in response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Ca. L. americanus*. **Journal of Citrus Pathology.** v. 1, p. 269–269, 2014.
- BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 14, p.313-334, 1986.
- BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science.** v. 83, p. 211–218, 2003.

- BUTLER, S. T., S. H. PELTON, W. R. BUTLER. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, v. 89(8), p. 2938-2951. 2006.
- CAMARGO, S.S. **Mineração de regras de associação no problema da cesta de compras aplicada ao comércio varejista de confecção**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação de Mestrado), 101 p., 2002.
- CAMARGO, S.S. **Um modelo neural de aprimoramento progressivo para redução de dimensionalidade**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tese de doutorado), 107 p., 2010.
- CAMARGO, S.S.; ENGEL, P.M. Mining association rules for hiv-1 protease cleavage site prediction. In: **Anais do V Simpósio Brasileiro de Qualidade de Software**, 2006.
- CAMARGO, S. S. AZAMBUJA, R. C. C. FEIJÓ, J. O. CORRÊA, M.N. SCHNEIDER, A. CARDOSO, F.F. Modelagem Computacional de Indicadores Metabólicos para Estudo de Eficiência Reprodutiva em Vacas de Corte. **Anais do X Congresso Brasileiro de Agroinformática**, SBIAGRO, 2015.
- CAMPOS, R. Uma abordagem neural para predição da mastite a partir de indicadores bioquímicos do metabolismo. In: **II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, 2006.
- CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREAU, M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. **Reproduction Fertility and Development**, v. 38, p. 131152, 1998.



- CUNDIFF, L. V., K. E. GREGORY, AND R. M. KOCH. Germplasm evaluation in beef cattle-Cycle IV: Birth and Weaning Traits. **Journal of Animal Science**. 76:2528– 2535. 1998.
- DIAS, F. M. G. N. **Efeito da condição corporal, razão peso/altura e peso vivo sobre o desempenho reprodutivo pós-parto de vacas de corte zebuínas**. 1991. 100 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- DUNN, T. G.; MOSS, G. E. Effects of nutriente deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1580-1593, 1992.
- EL-ROEIY, A.; CHEN, X.; ROBERTS, V.J.; SHIMASAKAI, S.; LING, N.; LEROITH, D.; ROBERTS JUNIOR, C.T.; YEN, S.S. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.78, p.1488-1496, 1994.
- ENGELBRECHT, A. P. **Computational Intelligence: An introduction**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
- FAULKNER, D. B. Body condition scoring beef cows. In: **WINTER BEEF MEETINGS, 1989–1990. Proceedings**. Urbana-Champaign: Department of Animal Sciences, p. 11-16. 1990.
- FERREIRA, A. M. DE; VIANA, J. H. M; SÁ, W. F. CAMARGO, L. S. DE A.; VERNEQUE, R. DA S. Restrição alimentar e atividade ovariana luteal cíclica

- pós-parto em vacas girolanda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2521-2528, 2000.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, 2016.
- KAWASHIMA, C., S. FUKIHARA, M. MAEDA, E. KANEKO, C. A. MONTOYA, M. MATSUI, T. SHIMIZU, N. MATSUNAGA, K. KIDA, Y. MIYAKE, D. SCHAMS, A. MIYAMOTO. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. **Reproduction**, v. 133(1), p. 155163. 2007.
- KECMAN, V. Learning and Soft Computing: support vector machines, neural networks, and fuzzy logic models. **Cambridge: MIT Press**, 2001.
- KOHAVI, R. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. In: **Proceedings of the Fourteenth International Joint Conference on Artificial Intelligence**. [S.l.: s.n.], 1995.
- KONAR, A. **Artificial Intelligence and Soft Computing: behavioral and cognitive modeling of the human brain**. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- KUNKLE, W. E.; SAND, R. S.; ERA, D. O. Effect of body condition on productivity in beef cattle. In: FIELDS, M. J.; SANDS, R. S. (Ed.). **Factors affecting calf crop**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.167-178.
- LAWRENCE, M. C.; MCKERN, N. M.; WARD, C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. **Current Opinion Structure Biology**, v. 17, p.699-705, 2007.
- LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I The Importance of Negative Energy Balance and

- Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 612-622, 2008.
- LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction**. Suppl. 61:415-427, 2003.
- MITCHELL, T. M. **Machine Learning**. New York: McGraw-Hill, 1997.
- MORAES J. C. F., JAUME, C. M., SOUZA, C. J. H. Controle da reprodução em bovinos de corte. **Comun. Téc. Embrapa Pecuária Sul**, n.58, p.1-3, 2005.
- OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M.C.; BASTOLLA, F.M.; CAMARGO, S.S.; MARGIS, R.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, p. 405–422, 2011.
- ORESQUES, N.; SHRADER-FRECHETTE, K.; BELITZ, K. Verification, validation, and confirmation of numerical models in the earth sciences. **Science Magazine**, v. 5147, p. 641–646, 1994.
- PORETSKY, L.; CATALDO, N.A.; ROSENWAKS, Z.; GIUDICE, L.C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. **Endocrinology Review**. v. 20, p. 535–582, 1999.
- QUINLAN, J. R. C4.5: **Programs for Machine Learning**. New York: Morgan Kaufmann Publishers, 1993.
- RIVERA, G. M, J. E. FORTUNE. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, v. 144(7), p. 2977-2987. 2003.
- SALES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas Bos indicus e Bos taurus**.162 f.Tese

(Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

SCOTT, A. Reductionism revisited. **Journal of Consciousness Studies**, v. 11, n. 2, p. 51–68, 2004.

SMITH, T. R.; HIPPEN, A. R.; BEITZ, D. C.; YOUNG, J. W. Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1569-1581, 1997.

VELAZQUEZ, M. A., M. NEWMAN, M. F. CHRISTIE, P. CRIPPS, M. A. CROWE, R. F. SMITH, H. DOBSON. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. **Theriogenology**, v. 64(9), p. 1977-1994. 2005.

WETTEMANN, R. P., LENTS, C. A., CICCIOLO, N. H., WHITE, F. J., RUBIO, I. Nutrition and suckling mediated anovulation in beef cows. **Journal of Animal Science**. 81 (E. Suppl.2) E48-E59. 2003.

WRIGHT, I. A.; RHIND, S. M.; WHYTE, T. K. Effect of body condition at calving and feeding level after calving on LH profiles and duration of the post-partum anoestrous period in beef cows. **Animal Production**, Edinburgh, Escocia, v. 55, p. 41-46, 1992.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckledbeef cows: a review. **Theriogenology**, v.54, p.25–55, 2000.

## 6. Artigo 3

### **Transcriptoma do tecido hepático de vacas de corte no pós-parto recente divergentes quanto à re-concepção futura: prenhas e vazias.**

Rodrigo Carneiro Campos de Azambuja<sup>1</sup>, Sandro da Silva Camargo<sup>2</sup>, Pedro Faraco Rodrigues<sup>1</sup>, Leonardo de Melo Menezes<sup>1</sup>, Josiane de Oliveira Feijó<sup>1</sup>, Marcio Nunes Corrêa<sup>1</sup>, Augusto Schneider<sup>1</sup>, Fernando Flores Cardoso<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel) – Pelotas, RS

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) – Bagé, RS

<sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Bagé, RS

### **Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o transcriptoma do tecido hepático no pós-parto recente de vacas de corte divergentes quanto à reconcepção futura: prenhas e vazias. Para tal foram avaliados em vacas de corte de diferentes composições raciais: Peso e condição corporal em diferentes fases do ciclo produtivo; Concentrações séricas Beta-hidróxibutirato (BHB), insulina e IGF-I durante o período de transição de gestante a lactante. Foram aplicadas técnicas de inteligência computacional para identificar padrões sobre o comportamento destas variáveis e sua relação com o status reprodutivo, e então determinar quais amostras e que momento de coleta para o sequenciamento de RNA; A partir de árvores de decisão construídas, foram selecionadas vacas a partir dos níveis séricos de IGF-I nos dias 28 e 42 pós-parto, sendo realizada expressão diferencial de genes por meio de

RNA-seq no tecido hepático coletado no dia 42 pós-parto. Foram identificados 308.139 transcritos, sendo 30.464 genes, 103.148 isoformas, 51.353 sítios de início de transcrição (TSS), 21.950 sequências de DNA codificante (CDS), 30.464 promotores, 51.353 Splicing e 19.407 CDS regulados (relCDS). Apenas 8 genes comuns a todas as composições raciais que estão mais diferencialmente expressos nas prenhas do que nas vazias, enquanto somente 7 genes comuns a todas as composições raciais que estão mais diferencialmente expressos nas vazias do que nas prenhas. Genes relacionados a proteínas inflamatórias como a haptoglobina e o fator de necrose tumoral estiveram entre os transcritos mais diferencialmente expressos em vacas prenhas, enquanto enzimas do catabolismo de lipídios e proteínas estiveram entre os transcritos mais diferencialmente expressos em vacas vazias. Genes relacionados a enzimas lipolíticas foram detectados como transcritos exclusivos em vacas vazias. Vias metabólicas relativas ao ciclo celular, secreção pancreática, fosforilação oxidativa e digestão e absorção de proteínas apresentaram-se significativamente ativadas (up-regulation) em vacas vazias com relação a vacas prenhas. Processos biológicos relacionados ao ciclo celular, catabolismo de lipídios e respostas imune e inflamatória estiveram significativamente ativados em vacas vazias com relação a vacas prenhas. Processos biológicos relacionados à morfogênese e a resposta ao estímulo de gonadotropinas/ ciclo de ovulação estiveram significativamente inibidos em vacas vazias com relação a vacas prenhas. A expressão diferencial de transcritos relacionados, bem como o enriquecimento de vias metabólicas e a ativação de processos biológicos relativos à mobilização e catabolismo de reservas corporais e digestão de nutrientes da dieta em vacas vazias, somado a inibição de processos biológicos da reprodução, indica

que a condição metabólica no pós-parto recente é determinante no status reprodutivo futuro.

Palavras-chave: IGF-I, reprodução, RNA-seq, transcriptômica, vacas de corte.

## **Introdução**

A fim de se atingir um maior sucesso na produção de bovinos de corte, um dos fatores que tem sido aperfeiçoado é o melhor aproveitamento da capacidade reprodutiva das vacas (YAVAS, 2000). Todavia, este aproveitamento é dificultado pelo processo de lactação, que é um estado dominante sobre outras atividades fisiológicas, e exerce pressão negativa na ocorrência do cio, fazendo com que a vaca priorize a produção de leite, em detrimento da atividade reprodutiva (BAUMAN, 2000).

Este padrão de lactação é clássico em vacas leiteiras, onde a alta produção de leite, em parte, só é possível de ser obtida através da utilização de parte da reserva de gordura corporal para obtenção de energia e gordura para a síntese láctea na glândula mamária. Este evento homeorrético resulta em um Balanço Energético Negativo (BEN), típico da fase inicial de lactação (BUTLER, 2003). No mesmo sentido, existem indicativos metabólicos e hormonais de BEN em vacas de corte (AZAMBUJA, 2013), além de estudos que relacionam estes indicativos a atividade reprodutiva, abordando que estas experimentam infertilidade quando as necessidades de nutrientes para manutenção e lactação no pós-parto recente excederem a ingestão de nutrientes (LUCY, 2003). Perotto et al. (2006), trabalhando com primíparas, relacionou incremento da lactação com perdas na reprodução,

relatando que o aumento no peso do bezerro à desmama aumentou o intervalo de partos que se sucedeu ao nascimento do respectivo bezerro.

A principal resposta fisiológica dos animais em BEN é tentar manter a homeostase através da mobilização de gordura corporal (e proteínas) de reserva (DRACKLEY, 1999). Isso resulta na liberação de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) do tecido adiposo. Ácidos graxos não-esterificados são transportados principalmente para o fígado, onde eles são totalmente oxidados ou convertidos em corpos cetônicos, tais como o beta-hidróxibutirato (BHB), ou ainda, esterificados em triacilgliceróis (TAG) (DRACKLEY, 1999). Desta forma, estão suscetíveis ao acúmulo de altos níveis de TAG nas células do fígado (fígado gordo ou lipidose hepática) e elevadas concentrações de corpos cetônicos no sangue (cetose) (REYNOLDS et al., 2003), ambos são potencialmente prejudiciais para a saúde e fertilidade das matrizes (MORRIS et al., 2008). Isto tem levado a um esforço para compreender estes eventos em nível de genes e sua expressão (LOOR, 2010).

Mecanismos associados à obtenção e, posterior, manutenção da competência reprodutiva em vacas de corte no pós-parto resultam da integração funcional do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (HESS, 2005). Períodos mais longos de aciclicidade em vacas de corte são atribuídos à lactação, a presença do bezerro e a baixas reservas de tecido adiposo (RANDEL, 1990; SHORT et al., 1990; WILLIAMS, 1990; WETTEMANN e BOSSIS, 2000). Apesar dos avanços no conhecimento da biologia reprodutiva da vaca (SANTOS et al., 2004), muitos fatores envolvidos na retomada da ciclicidade pós-parto ainda não estão totalmente esclarecidos. O típico balanço energético negativo pós-parto está associado a um intervalo prolongado do parto a primeira ovulação (STAGG et al., 1998). No entanto, a causa subjacente de anestro pós-parto prolongado não é a falta de desenvolvimento do folículo



dominante, mas uma falha de ovulação (DISKIN et al., 2003) devido à reduzida concentração de metabólitos e hormônios que atuam diretamente sobre o crescimento e maturação folicular (BEAM e BUTLER, 1998).

Conforme descrito nos parágrafos anteriores, alterações na expressão de genes no fígado são centrais no BEN. Vários estudos descrevem essas alterações em nível de transcrição no fígado de vacas em BEN, utilizando PCR em tempo real (FENWICK et al., 2008) e microarranjos (LOOR et al., 2007; MCCARTHY et al., 2010). No entanto, análises de microarranjos dependem de anotações de genomas existentes e requerem uma variedade especializada de sondas com base na informação obtida a partir de outros métodos, tais como sequenciamento, a fim de detectar os mecanismos mais complexos na expressão de genes, como, por exemplo, *splicing* alternativo (HUANG e KHATIB, 2010).

Neste contexto, RNA-seq é uma técnica relativamente nova que pode ser utilizada para analisar as alterações na expressão dos genes em todo o transcriptoma (MORTAZAVI et al., 2008; WANG et al., 2009) e vem sendo aplicado em um crescente número de organismos (HUANG E KHATIB, 2010). Esta tecnologia tem vantagens distintas sobre microarranjos, incluindo a detecção sensível de todos os genes expressos, sem a necessidade de se gerar uma matriz de sondas com base na sequência conhecida, e praticamente nenhum ruído de fundo. Ao contrário dos microarranjos, as ferramentas de bioinformática para os dados de RNA-seq são medianamente recentes (OSHLACK et al., 2010; GARBER et al., 2011). Em parte por esta razão, há poucos relatos sobre o uso de RNA-seq para identificação de genes diferencialmente expressos entre grupos de animais de diferentes condições fisiológicas e/ou metabólicas, e até o momento, escassos trabalhos em bovinos.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho é, por meio de RNA-seq, determinar a expressão diferencial de genes no tecido hepático no pós-parto recente de vacas de corte divergentes quanto à re-concepção futura: prenhas e vazias.

## **Material e Métodos**

### ***Animais e Coleta de dados***

Este estudo foi realizado na Embrapa Pecuária Sul, unidade de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), situada no município de Bagé, Região da Campanha, RS.

Para este trabalho foram utilizados dados de 32 vacas de primeira, segunda e terceira crias, com idades entre três e cinco anos, manejadas sob pastoreio contínuo em pastagens naturais, com carga animal média de 315 kg/ha. Foram utilizadas vacas de quatro composições raciais, sendo elas: sete animais da raça Angus (ANAN), nove do cruzamento de vacas Angus com touros Nelore (ANNE), oito do cruzamento de vacas Nelore com touros Angus (NEAN), e oito da raça Nelore (NENE). Estas vacas foram divididas ao acaso dentro de composição racial em dois lotes e acasaladas com touros das raças Brangus (BN) e Braford (BO) em estação de monta de 60 dias (janeiro a fevereiro). O período de parição foi entre os meses de outubro e dezembro. Uma vez paridas, foram acasaladas novamente entre 30 e 120 dias pós-parto (janeiro e fevereiro), e o diagnóstico gestacional realizado 60 dias após o último acasalamento.

### ***Coletas de sangue e análises bioquímicas***

Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular. Foram realizadas coletas ao redor de 30 dias antes da data prevista para o parto (dia -30), ao parto (dia 0), e a cada sete dias até a 6ª semana pós-parto (dia 42). Todas as amostras de soro foram utilizadas para a determinação das concentrações sanguíneas de Beta-hidroxiacetato, enquanto que as amostras coletadas nos dias 0, 14, 28 e 42 pós-parto foram utilizadas para a determinação das concentrações de IGF-I e insulina. Nos mesmos dias também foi realizada pesagem das vacas em balança eletrônica e a determinação do escore de condição corporal de cada vaca utilizando uma escala de 1 a 5 (LOWMAN et al. 1976).

As concentrações séricas de Beta-Hidroxiacetato foram determinadas por método colorimétrico utilizando kit Ranbut (Randox, Crumlin, Inglaterra) em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus (Femto Ind. e Com.. de Instrumentos Ltda., São Paulo, Brasil) (VELAZQUEZ et al., 2005). O limite de detecção do ensaio foi de 1,04 mg dl<sup>-1</sup>, e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5%. Para determinação das concentrações séricas de IGF-I e Insulina foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando kits comerciais Bovine Insulin Like Growth Factor 1 (IGF1) e Bovine Insulin INS ELISA Kit (USCN Life Science®, Houston, EUA) (LEE et al., 2005). Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 6% e 4,0% para IGF-I e insulina, respectivamente.

### ***Biópsias hepáticas e RNA-seq***

Nos dias 0,14, 28 e 42 pós-parto foram realizadas biópsias de fígado das 32 vacas, transcutâneamente, com anestesia local e agulhas Tru-cut 14 e 16 G, método

descrito por Radcliff et. al (2003). As amostras de fígado foram imediatamente armazenadas em microtubos e congeladas em nitrogênio líquido até a extração e sequenciamento de RNA. A extração do RNA total, bem como a construção e sequenciamento das bibliotecas, foram realizados pelo Laboratório de Biotecnologia Animal, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), a partir de 0,05 a 0,10 g de tecido hepático, utilizando o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme as instruções do fabricante.

A pureza e a quantidade do RNA total extraído foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e por espectrofotometria a 260 e 280 nm, através do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A qualidade e a integridade do RNA total foram analisadas com o Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies). Apenas amostras com RNA total apresentando RNA Integrity Number (RIN) maior ou igual a 8,0 foram utilizadas para as análises de RNA-Seq.

Cada amostra, contendo de 1 a 4 µg de RNA total, foi purificada de acordo com o protocolo descrito pela Illumina, utilizando microesferas magnéticas ligadas a oligos dT para separação do RNA ribossômico. O mRNA purificado foi fragmentado em tampão específico (Illumina). A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com a enzima Superscript II (Invitrogen). A síntese da segunda fita de cDNA foi realizada com as enzimas RNaseH e DNA Pol I e as extremidades das moléculas foram tratadas com as enzimas T4 DNA Polymerase e Klenow DNA Polymerase (Illumina) para a geração de extremidades abruptas. A extremidade 5' foi fosforilada com a enzima T4 PNK (e a adenilação da extremidade 3' foi realizada com a enzima Klenow exo, ambas da Illumina). As moléculas de cDNA foram então ligadas à adaptadores com uso da enzima T4 DNA Ligase (Illumina). As bibliotecas foram em

seguida submetidas a eletroforese em gel de agarose, purificadas (fração correspondente a 200 pb  $\pm$ 30 pb), e amplificadas por meio de PCR, com primers específicos para os adaptadores (Illumina).

Após o término da preparação, a qualidade das bibliotecas foi validada no Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) usando o chip DNA 1000, com intuito de verificar se o procedimento foi bem sucedido e se as amostras apresentaram a maior parte dos fragmentos próximos do tamanho de 260 pb.

A seguir, as bibliotecas foram quantificadas individualmente via PCR em Tempo Real (RT-qPCR), com o uso do Kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems), o qual possui seis amostras padrões de concentrações (entre 20 a 0,0002 pM) e tamanho de fragmento conhecido (452 pb) presentes no kit. A partir dos valores de Cycle threshold (Ct) dos padrões foram determinadas as concentrações das amostras por meio de uma regressão linear. Depois de calculadas essas concentrações, elas foram diluídas novamente para uma concentração padronizada, combinadas e então inseridas na lâmina de sequenciamento para a clusterização.

O sequenciamento do mRNA foi realizado com a tecnologia de sequenciamento de nova geração por meio do equipamento HiScanSQ (Illumina – San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o protocolo para sequências pair-end. Com uso do kit TruSeq PE Cluster Kit v3-cBotHS (Illumina – San Diego, EUA), as amostras ligaram-se a oligos complementares posicionados na superfície das canaletas da lâmina, e foram amplificadas, resultando em clusters (agrupamentos) de fragmentos iguais. A sequência dos agrupamentos foi determinada com uso do kit TruSeq SBS kit v3-HS (Illumina – San Diego, EUA), (200 cycles), conforme recomendações do fabricante.

Cada canaleta conteve seis amostras e cada amostra foi sequenciada até gerar cerca de 10 milhões de sequências por biblioteca.

Através do programa CASAVA, versão 1.8.2, os dados gerados pelo sequenciador HiScanSQ (Illumina, Inc., San Diego, CA), foram convertidos para o formato FASTQ.

Para extração dos dados de expressão gênica do RNA-Seq, os dados foram inicialmente processados pelo programa FastQC (ANDREWS, 2010), versão 0.10.0, o qual gerou um relatório global da composição e qualidade de cada biblioteca. Subsequentemente, as bibliotecas foram individualmente filtradas por qualidade, utilizando-se o programa FASTQ Quality Trimmer, pertencente ao pacote FastX ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) versão 0.0.13. Esse filtro elimina os nucleotídeos das extremidades considerando-se a pontuação Q (Phred score) (EWING; GREEN, 1998) de uma janela deslizante de tamanho ajustável. Os parâmetros utilizados foram: manter os IDs de sequências de tamanho 0; verificar as extremidades 5' e 3' de cada sequência; tamanho de janela de 3 nucleotídeos com deslizamento de base por base, sem limite de exclusão de bases; eliminar a última base da janela que tenha média de pontuação igual ou inferior a Q20. A pontuação Q20 na escala Phred corresponde a 1% de probabilidade da base nucleotídica estar incorreta.

Foram obtidos 4 reads para cada uma das 16 vacas. Estes reads foram colapsados e alinhados com o genoma de referência bovino (Bos Taurus UMD3.1 do banco de dados de genomas do Ensembl, disponibilizado na base Illumina), versão de 15/05/2016, usando Bowtie2 com suas opções padrão.

A expressão gênica foi calculada usando o arquivo General Transfer Format (GTF) do repositório do Ensembl, também disponibilizado na base da Illumina. Foi utilizada a ferramenta TopHat (TRAPNELL et al., 2012) (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>) para alinhar os reads em relação ao genoma completo, gerando um mapa de alinhamentos que foi utilizado nas análises posteriores. A ferramenta CuffLinks (TRAPNELL et al., 2010) (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) usa o mapa e o genoma para montar os reads em transcritos. Já a ferramenta CuffDiff, a partir do alinhamento dos reads nas diferentes condições analisadas, faz a quantificação e comparação dos genes e transcritos que são diferencialmente expressos.

### ***Análise estatística***

Para determinação de quais amostras seriam destinadas para sequenciamento de RNA foram construídas árvores de decisão a partir do algoritmo *J48* (QUINLAN, 1993). Este algoritmo classifica instâncias ordenando-as da raiz da árvore em direção a suas folhas. As características mais relevantes posicionam-se mais perto da raiz da árvore. À medida que a relevância da característica diminui, esta característica é posicionada mais longe da raiz e mais próxima às folhas (MITCHELL, 1997). O objetivo foi identificar qual das medidas, metabólitos ou hormônios estudados apresentou maior grau de acerto das árvores de decisão, juntamente com o dia de coleta mais relevante, predizendo o diagnóstico de prenhez.

As análises estatísticas dos mRNAs expressos diferencialmente foram realizadas utilizando o software R (3.2.2) e o pacote Bioconductor DESeq (1.2.0) (ANDERS E HUBER, 2010) usando a saída HTSeq. As contagens de leitura foram

normalizadas para a profundidade de sequenciamento da biblioteca, medindo a razão das contagens de reads (FC, Fold Change), com P-valores não corrigidos a partir da distribuição binomial negativa, e foram obtidos valores de P ajustados pela taxa de falsas descobertas (FDR). Análise de componentes principais também foi realizada utilizando R para observar a distribuição da amostra em um gráfico bidimensional e a presença de dados extremos (*outliers*). Genes com  $FDR < 0,02$  e  $FC > 1,50$  foram considerados *Up-regulated*; E  $FDR < 0,02$  e  $FC < 0,75$  foram considerados *Down-regulated*.

Os transcritos de cada biblioteca de sequências foram montados através do Cufflinks, versão 2.1.1 (TRAPNELL et al., 2010, 2012), utilizando as sequências previamente mapeadas pelo programa TopHat2. O Cuffmerge, versão 1.0.0 (TRAPNELL et al., 2010), utilizou os transcritos montados das bibliotecas de sequências trimadas e originais para reconstruir o transcriptoma e incluiu a anotação para os genes. Esta etapa foi necessária para criar um arquivo de referência para posterior comparação de genes entre as análises utilizando sequências trimadas e originais. Como último passo, foi utilizado o pacote CummeRbund, da ferramenta R, para geração interpretação dos resultados gerados pela ferramenta CuffDiff (TRAPNELL et al., 2010). Foram construídos diagramas de Venn com os transcritos diferencialmente expressos em comum de acordo com status reprodutivo e composição racial.

Os mRNAs definidos como significativamente para cima e para baixo ( $FDR < 0,02$  e  $FC > 1,50$ , ou  $FDR < 0,02$  e  $FC < 0,75$ ) foram ainda analisados quanto ao enriquecimento de Ontologia genética (GO) (processos biológicos) e análise de vias metabólicas usando os pacotes Pathview em R (LUO et al., 2009; LUO e BROUWER, 2013), considerando valores de P inferiores a 0,05 como significativos



para diferenças de enriquecimento tanto para as vias metabólicas quanto para os processos biológicos mais enriquecidos em vacas vazias com relação as vacas prenhas. Figuras das vias metabólicas diferencialmente enriquecidas foram adicionadas a partir da Enciclopédia de genes e genomas Kyoto (KEGG).

## Resultados e Discussão

### Árvores de decisão

Dentre as variáveis estudadas foram construídas árvores de decisão a partir do algoritmo *J48* com os seguintes graus de precisão para Peso, ECC, Beta-hidroxibutirato, insulina e IGF-I: 59,38%, 59,38%, 71,38%, 78,38% e 90%, respectivamente. A partir destes resultados selecionamos IGF-I como variável para definição de que amostras e dias de coleta mais relevantes para sequenciamento de RNA (Figura 1).

A árvore de decisão construída mostra que o nível de IGFI42, que representa o hormônio IGF-I medido no 42º dia pós-parto, é o indicador mais importante para a predição do diagnóstico no ano seguinte (Figura 1). O ramo inferior da árvore mostra que, caso o nível de IGFI42 seja igual ou inferior a 77,03 ng/dL o diagnóstico da vaca será vazia. Já o ramo superior, mostra que no caso de IGFI42 seja superior ao limiar de 77,03 ng/dL, a predição do diagnóstico passa pela análise do nível do indicador IGFI28, que representa o hormônio IGF-I medido no 28º dia pós-parto. Caso este indicador tenha valor igual ou inferior a 50 ng/dL, o diagnóstico também será vazia. Caso os dois indicadores tenham valores superiores aos limiares mencionados, o diagnóstico será prenha. A partir destas informações também foi

definido que o momento de coleta da biópsia hepática a ser utilizado no sequenciamento de RNA deveria ser o dia 42.

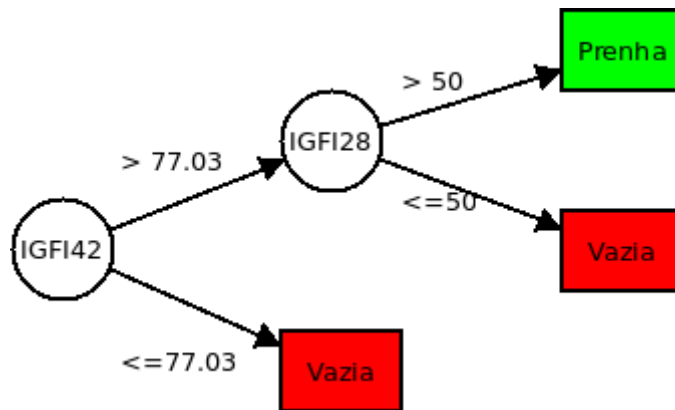


Figura 1: Árvore de decisão criada pelo algoritmo *J48* para predição do diagnóstico de prenhez a partir dos níveis do hormônio IGF-I.

Os símbolos em azul mostram as vacas prenhas e os símbolos em vermelho, as vacas vazias (Figura 2). São utilizados símbolos diferentes para denotar as diferentes raças utilizadas no experimento. As linhas verdes indicam os limiares apontados pela árvore de decisão. O gráfico mostra que todas as vacas, com nível de IGF142 igual ou inferior ao limiar de 77,03 ng/dL, estão com diagnóstico vazia. Desta forma, esta regra tem 100% de precisão. A regra que indica nível de IGF142 igual ou inferior a 77,03 ng/dL e nível de IGF128 igual ou inferior a 50 ng/dL, indica uma vaca com diagnóstico vazia. Esta regra tem um erro em cinco amostras, representando 20% de erro. A última regra, apontando nível de IGF142 superior a 77,03 ng/dL e nível de IGF128 superior a 50 ng/dL, indica que a vaca deverá ter diagnóstico prenha. Esta regra tem dois erros em 15 amostras, apresentando 13% de erro. Em resumo, a árvore apresentada na figura 1 apresenta 3 erros de classificação em 32 amostras, representando 90% de acerto. A partir dos resultados (Figura 2) foram selecionadas 16 vacas, para RNA-seq das amostras de tecido

hepático coletadas no dia 42 pós-parto. Não houve a possibilidade de selecionar duas vacas de cada composição racial para os diferentes status reprodutivos (prenhas ou vazias), pois apenas 01 (uma) vaca NENE apresentou diagnóstico de prenhez positivo e 01 (uma) vaca ANNE apresentou diagnóstico de prenhez negativo.

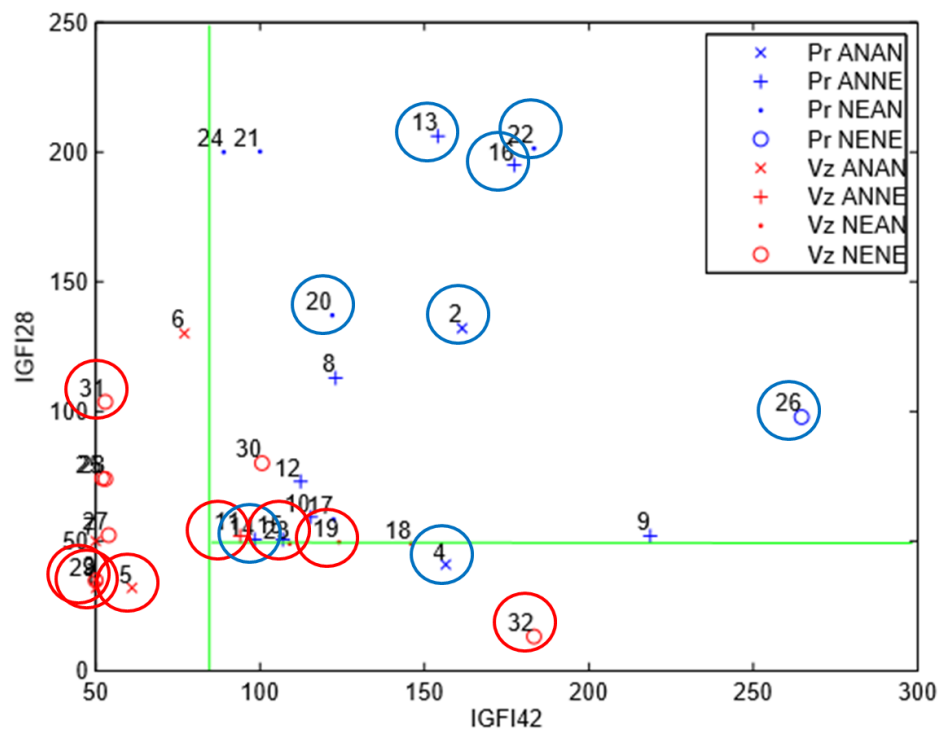


Figura 2. Representação espacial da árvore de decisão. Círculos identificam as vacas selecionadas para RNA-seq das amostras de tecido hepático coletadas no dia 42 pós-parto.

### Sequenciamento do RNA – Dados gerais

Foram identificados 308.139 transcritos, sendo 30.464 genes, 103.148 isoformas, 51.353 sítios de início de transcrição (TSS), 21.950 sequências de DNA codificante (CDS), 30.464 promotores, 51.353 Splicing e 19.407 CDS regulados (relCDS).

### Transcritos diferencialmente expressos em comum de acordo com status reprodutivo e composição racial

Os diagramas de Venn construídos para os genes diferencialmente expressos em vacas prenhas e falhadas (Figuras 3 e 4 , respectivamente) mostram que, para as 4 composições raciais analisadas, há somente 8 e 7 genes comuns a todas as composições raciais, respectivamente. Estes genes estão diferencialmente expressos nas vacas prenhas do que nas vacas vazias (Tabelas 1 e 2).

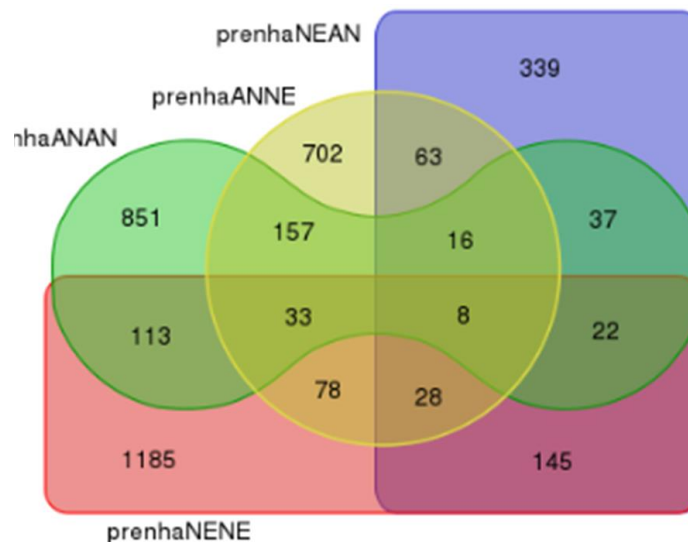


Figura 3: Diagrama de Venn construído para indicar os genes diferencialmente expressos em vacas prenhas.

Tabela 1: Transcritos diferencialmente expressos em vacas prenhas, em comum nas 4 composições raciais analisadas.

Gene_id	Função
XLOC_018833	Função não identificada
XLOC_001287	PAQR5
XLOC_023905	ERBB3
XLOC_023297	TCP11L2
XLOC_022986	SOCS2
XLOC_021124	SLC22A15
XLOC_022816	Função não identificada
XLOC_003896	ENSBTAG00018955

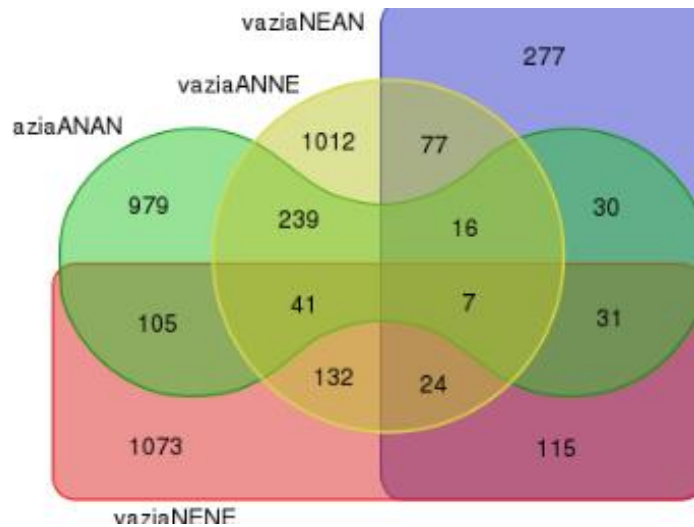


Figura 4: Diagrama de Venn construído para os genes diferencialmente expressos em vacas vazias.

Tabela 2: Transcritos diferencialmente expressos em vacas prenhas comuns as 4 composições raciais analisadas.

Gene_id	Função
XLOC_008125	GOS2
XLOC_015345	ABHD6
XLOC_023782	KCNH3
XLOC_016140	TNFRSF21
XLOC_018109	BAG3
XLOC_011394	TMEM98
XLOC_019539	STIP1

### Comparação dos níveis de expressão dos transcritos entre prenhas e vazias independente de composição racial

Embora as distribuições de densidade dos níveis de expressão dos transcritos sejam muito similares, para vacas prenhas e vazias, é possível verificar que há uma diferença mais clara de expressão de transcritos para  $\log_{10}(\text{fpkm})$  próximo ao valor zero, com uma densidade superior nas vacas prenhas (figura 5).

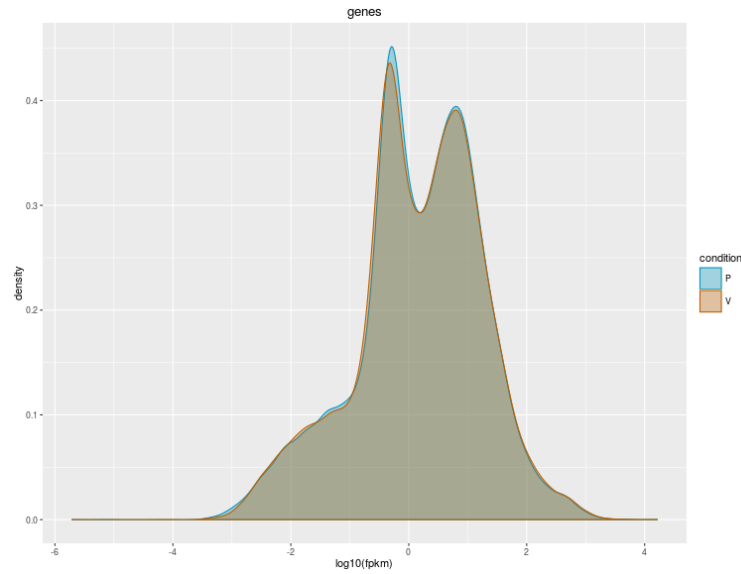


Figura 5: Distribuição dos níveis de expressão de cada transcrito nas condições analisadas

Os resultados de expressão dos transcritos em vacas prenhas e vazias indicam uma pequena diferença entre grupos, mas salientam a homogeneidade dos resultados da expressão indicando a eficiência e baixa variabilidade das amostras submetidas a técnica (Figura 6).

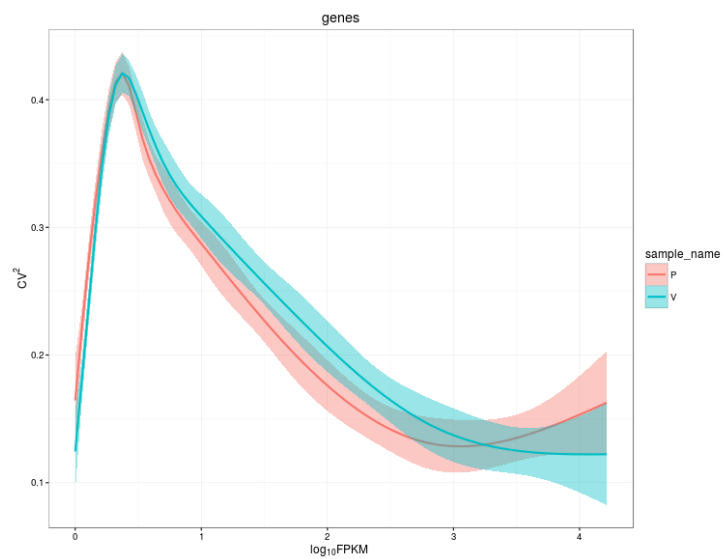


Figura 6: Diferenças de nível de Expressão em vacas prenhas e vazias.

### Transcritos diferencialmente expressos em vacas prenhas

Os transcritos estão ordenados por diferença de expressão, cujo valor está apresentado na coluna log2 fold change. As 10 maiores diferenças de expressão, considerando os transcritos mais diferencialmente expressos em vacas prenhas quando comparadas as vacas vazias (Tabela 3).

Tabela 3: Top 10 dos transcritos mais expressos em vacas prenhas.

Gene_id	Prenha	Vazias	log2 fold_change	test_stat	p_value	q_value
XLOC_027135*	3,35401	0,00287636	-10,1874	-0,44301	0,00005	0,00269176
SNORA70	4,09926	0,33958	-3,59354	-0,77577	0,0001	0,00495596
XLOC_022925*	9,83966	1,60647	-2,61471	-5,06662	0,00005	0,00269176
C19orf81	1,50646	0,265174	-2,50615	-1,49587	0,00005	0,00269176
Haptoglobin	738,064	132,592	-2,47675	-1,51244	0,00005	0,00269176
XLOC_015082*	14,0584	2,9619	-2,24684	-2,7201	0,00005	0,00269176
XLOC_022907*	1,25399	0,286506	-2,12919	-1,41718	0,00005	0,00269176
TNFRSF10A	3,10738	0,724436	-2,1007	-1,6545	0,00005	0,00269176
MT1E	17,9936	4,36014	-2,04504	-1,75276	0,00005	0,00269176
XLOC_009929*	300,6800	74,46520	-2,01359	-7,20752	0,00005	0,00269176

\*Função não identificada.

Os transcritos mais expressos em vacas prenhas está o gene SNORA70 (Small nucleolar RNA). Os microRNAs são pequenos RNAs dupla-fita endógenos, com aproximadamente 22 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores pós-transcricionais, pois pareiam-se com mRNAs específicos e regulam sua estabilidade e tradução (PRODROMAKI, 2015).

Da mesma forma, em relação as vacas prenhas, o gene Haptoglobina (HP) esteve entre os genes com maior diferença de expressão entre prenhas e vazias. Este gene codifica uma pré-proteína, que é processada para produzir cadeias alfa e beta, que subsequentemente se combinam como um tetrâmero para produzir haptoglobina (LECCHI et al., 2012). Em bovinos, dados recentes sugerem que o estado inflamatório ocasionado pelo balanço energético negativo durante o período de transição parece causar prejuízos de ordem inflamatória e metabólica para a

vaca (TREVISI et al., 2009). Atraso no retorno da atividade do fígado, evidenciado pelas baixas concentrações de proteínas de fase aguda negativa como a albumina e paraoxonase e aumento nas concentrações de proteínas de fase aguda positivas como a haptoglobina foram relatados (TREVISI et al., 2009). Uma clara correlação existe entre a imunossupressão, a ocorrência de doenças, a inflamação, o estresse metabólico e a reprodução (TREVISI et al., 2012). No caso do presente estudo, diferente do esperado, vacas prenhas apontaram maior expressão do transcrito relacionado à síntese desta proteína. Por outro lado, Lecchi et al. (2012), encontraram uma expressão generalizada do gene HP também em condições não patológicas, prevendo assim um possível papel como moléculas imunomoduladoras e protetoras. Isto reforça a necessidade de novas abordagens para desvendar a relação crítica entre a causa e o efeito, bem como o prognóstico do estado de saúde da vaca a partir da expressão deste gene, ou ainda, dos níveis séricos desta proteína.

Ainda em relação aos processos inflamatórios, o gene TNFRSF10A, membro da superfamília dos receptores para fatores de necrose tumoral (TNF) esteve entre os com maior diferença de expressão entre prenhas e vazias. Este receptor é ativado pela ligação de um indutor de apoptose relacionado com o fator de necrose tumoral (TNFSF10 / TRAIL), e assim traduz o sinal de morte celular e induz apoptose celular (SOUZA e URIBE-VELAZQUEZ, 2008). Ao enfrentar um desafio imunológico, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) é liberado, dando suporte à resposta imunológica. No entanto, o TNF $\alpha$  pode afetar o funcionamento uterino por desempenhar um importante papel na regulação da produção de PGF2 $\alpha$  (MIYAMOTO et al., 2000). Dessa forma, níveis altos de TNF $\alpha$  poderiam ser seguidos de níveis suficientemente altos de PGF2 $\alpha$ , levando à luteólise e conseqüentemente



à perda de embriões nos seus estágios iniciais no caso de vacas prenhas (STAPLES et al., 1998). Por outro lado, o TNF- $\alpha$  gerado nos folículos pré-ovulatórios, tem papel obrigatório no desenvolvimento e diferenciação celular (SAKUMOTO E OKUDA, 2004), bem como nos mecanismos de debilidade e ruptura ovariana (BRÄNNSTRÖM et al., 1995). O TNF- $\alpha$ , combinado ao LH, pode potencializar o processo de ovulação (BRÄNNSTRÖM et al., 1995; TERRANOVA, 1997). Já na fase luteal, ele reduz a secreção de estradiol (BRÄNNSTRÖM et al., 1995; PATE, 1995; TERRANOVA, 1997). Também é de fundamental importância na luteogênese e na luteólise (MIYAMOTO et al., 2000). As diferenças nas respostas celulares os efeitos desta citocina dependem do estágio de diferenciação das células-alvo, e da presença ou da presença ou ausência de outros fatores ou reguladores dos processos. Desta forma, Isto reforça a necessidade de novas abordagens para estudar as relações entre a causa e o efeito, bem como as relações da expressão hepática deste fator com suas ações em nível de tecidos reprodutivos.

### **Transcritos diferencialmente expressos em vacas vazias**

Os transcritos mais expressos em vacas vazias em relação às vacas prenhas estão ordenados por diferença de expressão, cujo valor está apresentado na coluna log<sub>2</sub> fold change (Tabela 4).

Tabela 4: Top 10 dos transcritos mais expressos em vacas vazias.

Gene_id	Prenha	Vazias	log2 fold_change	test_stat	p_value	q_value
PTP	0,0180178	15,8842	9,78395	1,25327	0,00005	0,00269176
PNLIP	0,00415665	3,19861	9,58781	0,528708	0,00005	0,00495596
CPA1	0,0422167	26,4062	9,28874	3,23619	0,00005	0,00269176
CEL	0,0138604	8,5311	9,26562	2,13271	0,0013	0,0401946
XLOC_009118	0,141835	77,1665	9,08762	5,01402	0,00005	0,00269176
CTRB1	0,0481181	23,8941	8,95314	3,21133	0,00005	0,00269176
CELA3B	0,070513	31,1236	8,7859	3,39226	0,00005	0,00269176
pCPB	0,0336045	10,3169	8,26214	2,45858	0,00005	0,00269176
RNASE1	0,153827	29,1328	7,56519	4,09715	0,00005	0,00269176
CELA1	0,254671	37,1996	7,19051	5,07821	0,00005	0,00269176

Entre os transcritos mais diferencialmente expressos em vacas vazias com relação a vacas prenhas está o gene da Lipase pancreática (PNLIP). Este gene codifica uma proteína membro da família das lipases. A enzima codificada é secretada pelo pâncreas e hidrolisa os triglicerídeos no intestino delgado, sendo essencial para a eficiente digestão das gorduras alimentares (GUYTON e HALL, 2002). No mesmo sentido, o gene da Carboxyl Ester Lipase (CEL) esteve entre os com maior diferença de expressão entre vazias e prenhas. A proteína codificada por este gene é uma glicoproteína secretada do pâncreas para o trato digestivo (GUYTON e HALL, 2002). O papel fisiológico desta proteína está na hidrólise e absorção de colesterol e ésteres de vitaminas lipossolúveis (HUI, 1996). Além das enzimas pancreáticas lipolíticas, também estiveram entre os genes com maior diferença de expressão entre vacas vazias e prenhas, codificadores das proteases, caracterizando o estado catabólico. Quimiotripsinogênio B1 esteve entre os mais diferencialmente expressos. Este gene codifica um membro da família de enzimas proteases de serina e forma um precursor principal das enzimas proteolíticas pancreáticas (GUYTON e HALL, 2002).

Da mesma forma, outras enzimas catabólicas estiveram entre os transcritos com maior diferença de expressão entre vacas vazias e prenhas, como os genes

das carboxipeptidases, com a expressão dos genes Carboxipeptidase A1 (CPA1) e Carboxipeptidase B (pCPB). Estes genes codificam membros da família carboxipeptidase, de metaloproteases. Estas enzimas preferencialmente clivam carbonos terminais de cadeias ramificadas e aminoácidos aromáticos de proteínas da dieta (GUYTON e HALL, 2002). No mesmo sentido, ainda com relação ao metabolismo de proteínas, elastases como a CELA1 (Chymotrypsin Like Elastase Family Member 1) e CELA3B (Chymotrypsin-like Elastase Family, Member 3B) estiveram entre os genes com maior diferença de expressão de vacas vazias em relação a vacas prenhas. As elastases formam uma subfamília de proteases de serina que hidrolisam muitas proteínas além da elastina (GUYTON e HALL, 2002). Outro aspecto importante é que a Elastase 3B tem função estabelecida no transporte intestinal e no metabolismo do colesterol, caracterizando seu envolvimento, também, no metabolismo de lipídios (HALL, 1963). A ativação da expressão destas enzimas pode estar relacionada com a necessidade de maior ativação da absorção de nutrientes, uma vez que vacas vazias, com menores níveis séricos de IGF-I, teriam balanço energético de nutrientes menos favorável (HESS, 2005; AZAMBUJA, 2013), com conseqüente reflexo negativo na reprodução.

### **Transcritos diferencialmente expressos exclusivamente**

Com relação aos transcritos exclusivos em vacas prenhas (Tabela 5), o gene XLOC\_001143, foi encontrado, porém, ainda não teve sua função identificada em mamíferos. Por outro lado, em vacas vazias, mais uma vez estiveram entre os transcritos exclusivos, genes que codificam enzimas lipolíticas, como a fosfolipase e a colipase.

Tabela 5: Transcritos exclusivos em vacas prenhas e vazias.

Gene_id	Prenha	Vazias	p_value	q_value
XLOC_001143	37,4219	0	0,00005	0,00269176
XLOC_008516	0	56,0804	0,00005	0,00269176
PLA2G1B	0	44,5863	0,00005	0,00269176
XLOC_028154	0	24,0467	0,00005	0,00269176
CLPS	0	7,38392	0,00005	0,00269176
U6	0	0,939642	0,00005	0,00269176

O gene Fosfolipase A2 do grupo 1B, gene que codifica um membro da classe de enzimas fosfolipase A2 (PLA2). A enzima é dependente do cálcio e codificada catalisa a hidrólise da posição sn-2 dos glicerofosfolípidos de membrana, para libertar ácido araquidónico (AA) e lisofosfolípidos (CUNNINGHAM, 2004). O ácido araquidônico é posteriormente convertido por enzimas metabólicas em vários compostos bioativos lipofílicos (eicosanóides), incluindo prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) (BAYNES e DOMINICZAK, 2005). Estes resultados demonstram que, assim como as vacas prenhas, vacas vazias também tiveram processos inflamatórios ativados, e dados a relação do ácido araquidônico com as prostaglandinas, interferências na produção de PGF2 $\alpha$  poderiam estar relacionados à luteólise, e conseqüentemente à perda de embriões nos seus estágios iniciais no caso de vacas prenhas (STAPLES et al., 1998).

Por outro lado, o gene da Colipase codifica uma proteína que é um cofactor necessário para a lipase pancreática na hidrólise eficiente dos lípidos da dieta. Liga-se ao domínio C-terminal não catalítico da lipase, estabilizando assim uma conformação ativa e aumentando consideravelmente o potencial de ligação (CUNNINGHAM, 2004; DRACKLEY, 2008). Conforme abordado anteriormente, a ativação da expressão destas enzimas pode estar relacionada com a necessidade

de maior absorção de nutrientes em vacas com maior desequilíbrio energético (HESS, 2005), e por consequência, vazias.

### **Vias metabólicas mais enriquecidas**

Foram encontradas 4 vias metabólicas significativamente ativadas (up-regulation) em vacas vazias em relação as vacas prenhas (Tabela 6; Figuras 7, 8, 9 e 10). Não houve vias metabólicas significativamente inibidas (down-regulation) entre vacas vazias e prenhas.

Tabela 6. Vias metabólicas enriquecidas significativamente no transcriptoma do tecido hepático de vacas de corte no pós-parto recente.

Via metabólica	p.val
Ciclo celular	0,00425
Secreção pancreática	0,00671
Fosforilação oxidativa	0,01680
Digestão e absorção de proteínas	0,02748

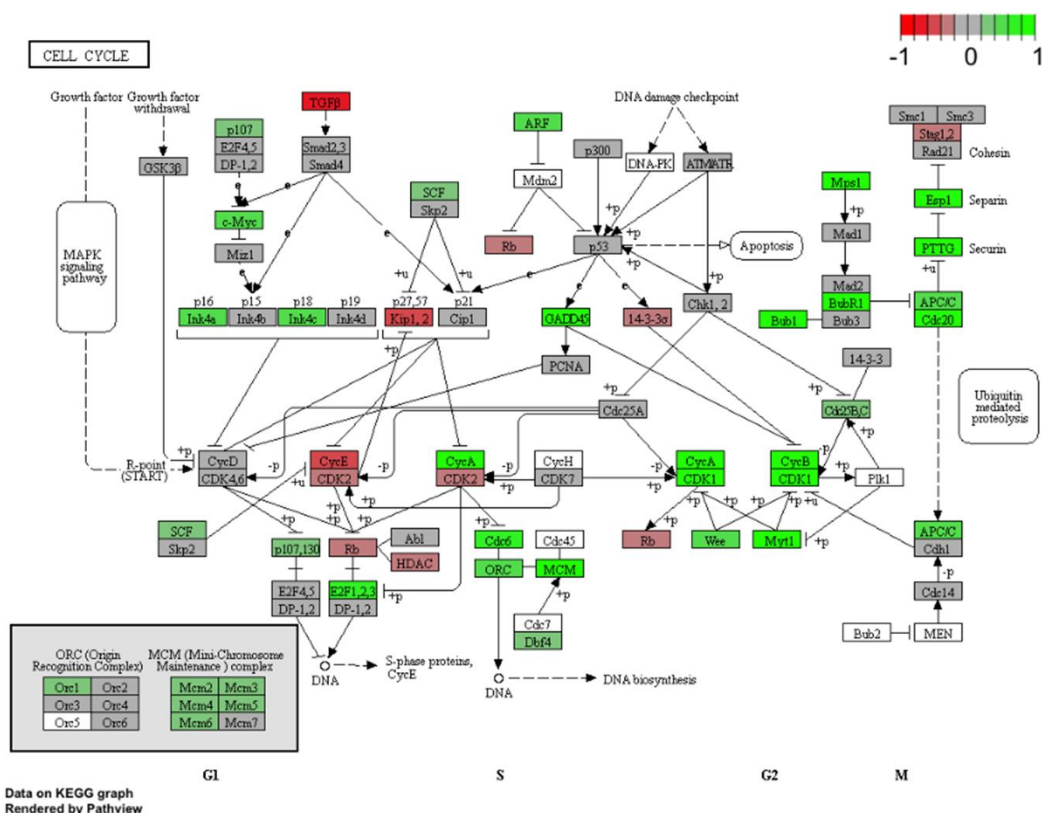


Figura 7. Mapa da via metabólica Ciclo Celular retirado da KEGG, mais enriquecida significativamente ativada (up-regulation) para vacas vazias em relação a vacas prenhas.

Ciclo Celular é o conjunto de fases que uma célula passa com o intuito de duplicar-se, dando origem a duas células novas. Este processo extremamente coordenado onde a progressão pelas fases do ciclo celular é regulada, por uma rede bioquímica que sinaliza o andamento e as passagens entre as fases G1, S, G2 e M da intérfase. Esse controle é vital para manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES e BARBACID, 2009). Estudos em bovinos relacionaram níveis de metabólitos indicadores de balanço energético negativo, como o Beta-hidróxibutirato, a alterações no ciclo celular (LI e ELSASSER, 2005). No presente estudo, vacas vazias apresentaram níveis inferiores de IGF-I, quando comparadas às vacas

preenhas, resumindo provavelmente uma condição de estresse metabólico (HESS, 2005; AZAMBUJA, 2013). Tais condições, especialmente aquelas relacionadas ao metabolismo de gorduras, cetose e fígado gordo, já foram associadas a diferenças de transcrição e expressão gênica em vacas no periparto (LOOR et al., 2006; 2007; LOOR, 2010) e os resultados do presente estudo contribuem com estes indicativos. Neste sentido, novas abordagens para estudar as relações destas vias com o status metabólico e reprodutivo se mostram promissoras.

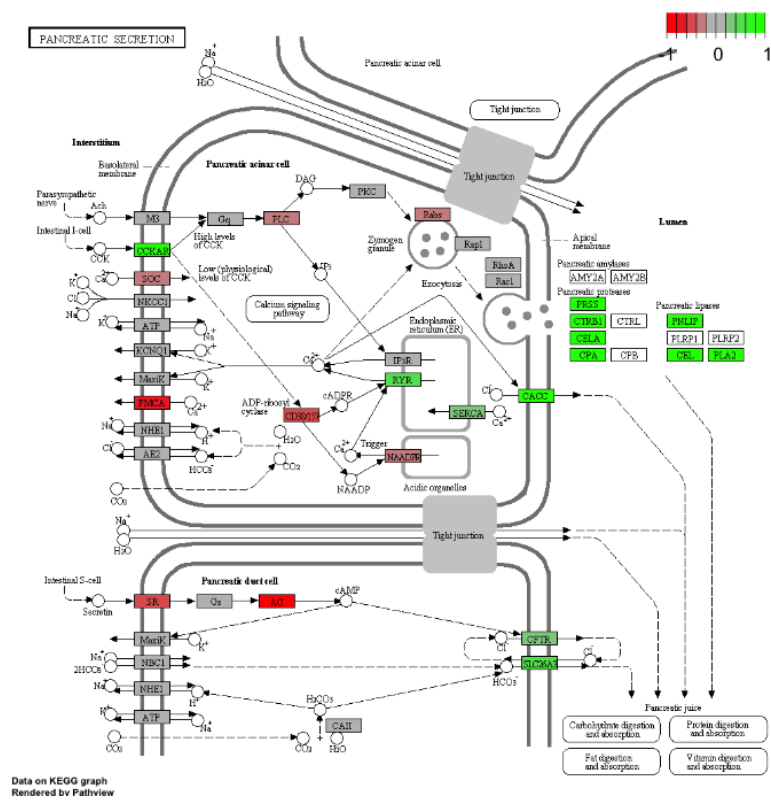


Figura 8. Mapa da via metabólica Secreção pancreática retirado da KEGG, mais enriquecida significativamente ativada (up-regulation) para vacas vazias em relação a vacas prenhas.

A secreção pancreática, por meio do suco pancreático, secreção que atua no processo digestivo, é fundamental na absorção de nutrientes. A secreção

pancreática contém enzimas como a amilase pancreática, lipase pancreática, tripsinogênio, quimiotripsinogênio, pró-carboxipeptidase, pró-elastase, fosfolipase A e B, e nucleotidasas (CUNNINGHAM, 2004). Os genes que codificam boa parte destas enzimas estiveram entre os mais diferencialmente expressos em vacas vazias; e no caso da fosfolipase, foi identificado entre os transcritos mais diferencialmente expressos exclusivos para este grupo de vacas, corroborando com as vias metabólicas significativamente ativadas. As vias metabólicas mais enriquecidas para estas funções em vacas vazias podem estar relacionadas à necessidade de maior ativação da absorção de nutrientes por este grupo de vacas, uma vez que o mesmo apresentou menores níveis séricos de IGF-I, indicativo de balanço energético negativo (HESS, 2005; AZAMBUJA, 2013).

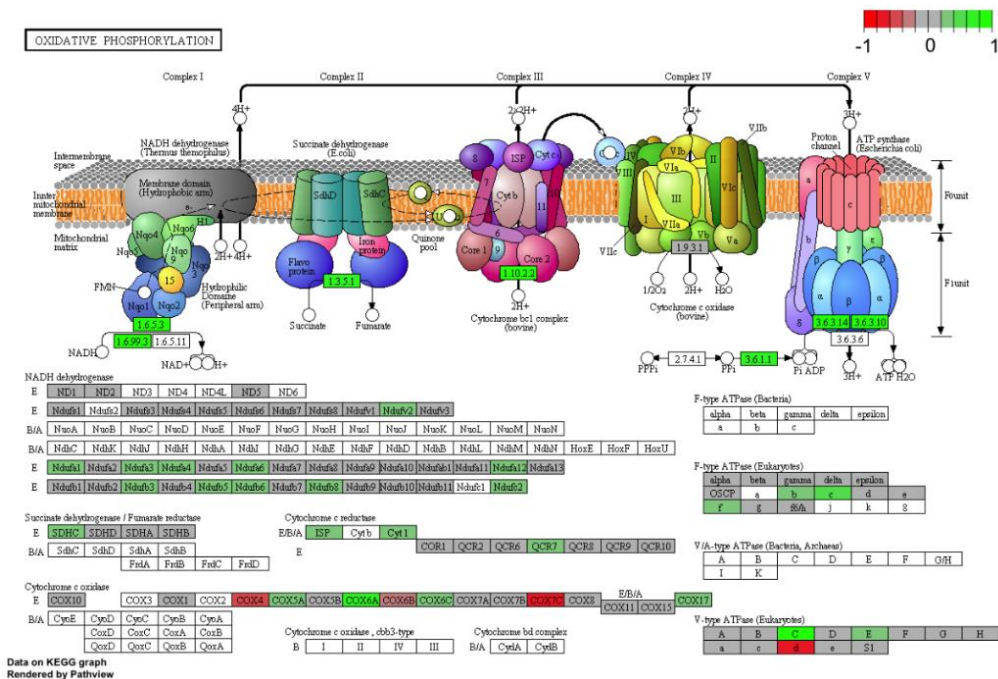


Figura 9. Mapa da via metabólica Fosforilação oxidativa retirado da KEGG, significativamente ativada (up-regulation) para vacas vazias em relação a vacas prenhas.



A fosforilação oxidativa é uma via metabólica que utiliza energia liberada pela oxidação de nutrientes de forma a produzir trifosfato de adenosina (ATP). O processo refere-se à fosforilação do ADP em ATP, utilizando para isso a energia liberada nas reações de oxidação-redução (NELSON e COX, 2004). Esperava-se que houvesse uma redução da intensidade metabólica em vacas vazias, em razão de menor substrato para produção de ATP's em vacas teoricamente em balanço energético desfavorável. Neste sentido, os achados do presente estudo contrariam os resultados encontrados por Loo et al. (2007), que observou a inibição da via metabólica da fosforilação oxidativa, quando estudou a expressão de genes no tecido hepático de vacas em restrição alimentar e com indicativos metabólicos de cetose. Por outro lado, a glicose é normalmente considerada uma fonte chave de energia para a produção de ATP através da fosforilação oxidativa mitocondrial (LUCY, 2003), e vários estudos demonstram grandes variações nos níveis séricos deste metabólito em vacas (BLACKSHAW e BLACKSHAW, 1994; SIMPSON et al., 1997; ALVAREZ et al., 2000; AZAMBUJA, 2013). Isto reforça a necessidade de novas abordagens para desvendar a relação crítica entre causa e o efeito, bem como as condições para maior ativação desta via metabólica.

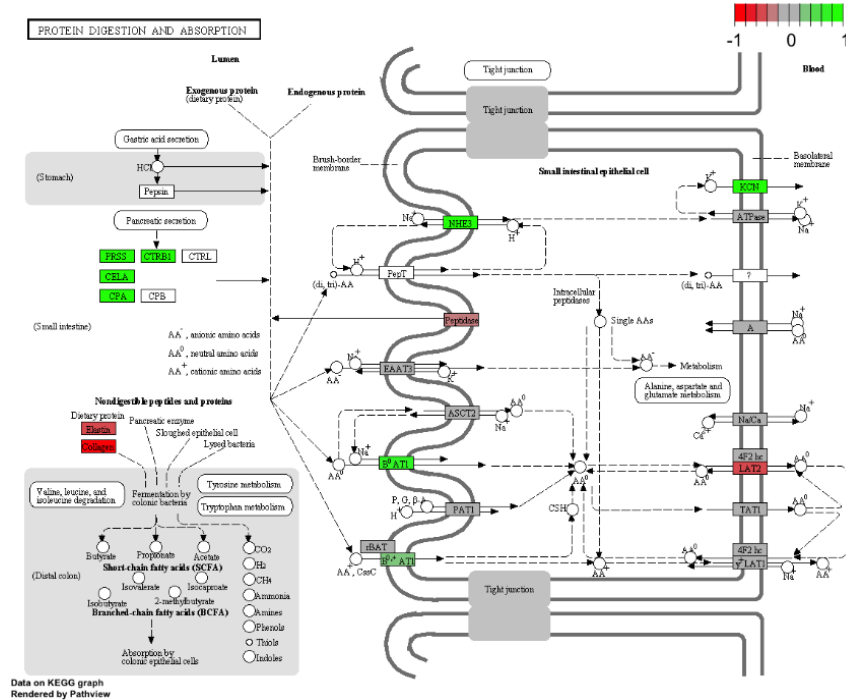


Figura 10. Mapa da via metabólica da digestão e absorção de proteínas retirado da KEGG, mais enriquecida significativamente ativada (up-regulation) para vacas vazias em relação a vacas prenhas.

A digestão das proteínas em ruminantes começa no retículo-rúmen com a fermentação, absorção e aproveitamento da proteína microbiana, e continua no abomaso, que devido à presença de ácido clorídrico, desnatura as proteínas (BERCHIELLI et al., 2006). No intestino delgado, as proteínas sofrem a ação das enzimas produzidas pelo pâncreas (tripsina, quimiotripsina, elastase e carboxipeptidase) (WEBB, 1990). Corroborando com as enzimas proteolíticas mais diferencialmente expressas no presente estudo, as vias metabólicas também mais enriquecidas para estas funções em vacas vazias, podem estar relacionadas à necessidade de maior absorção de nutrientes por este grupo de vacas.

## Termos de ontologia genética

O número de Termos de ontologia genética (GOT) enriquecidos para processos biológicos das vacas vazias em relação às vacas prenhas, significativamente ativados (*up-regulation*) e significativamente inibidos (*down-regulation*) estão apresentados nas tabelas 8 e 9 respectivamente.

Tabela 7. Termos de ontologia genética (GOT) enriquecidos para processos biológicos das vazias em relação às prenhas - *up-regulation*.

Processo biológico	p.val
Fase M	3,54E-07
Segregação cromossômica	7,21E-06
Fase M do ciclo celular mitótico	1,01E-05
Divisão nuclear	1,41E-05
Mitose	1,41E-05
Fissão de organelas	2,06E-05
Prometáfase mitótica	0,0001
Divisão celular	0,0002
Meiose	0,0008
Fase M do ciclo celular meiótico	0,0008
Ciclo celular meiótico	0,0009
Regulação da segregação cromossômica	0,0021
Segregação da cromátide irmã	0,0029
Segregação de cromátide irmã mitótica	0,0044
Organização de fuso mitótico	0,0055
Estabelecimento de localização cromossômica	0,0065
Regulação do processo do ciclo celular	0,0066
Meiose I	0,0077
Conjunto complexo do centrômero	0,0082
Localização cromossômica	0,0093
Fixação dos microtúbulos do fuso ao cinetócoro	0,0094
Segregação cromossômica meiótica	0,0104
Ponto de verificação do ciclo celular	0,0111

Interfase do ciclo celular mitótico	0,0111
Organização do fuso mitótico	0,0128
Interfase	0,0132
Regulação da transição G2 / M do ciclo celular mitótico	0,0133
Transição G2 / M do ciclo celular mitótico	0,0142
Regulação da parada do ciclo celular	0,0148
Homeostase de temperatura	0,0168
Remodelação de cromatina no centrômero	0,0175
Despolimerização de microtúbulos	0,0197
Metáfase placa de congresso	0,0198
Contração do músculo esquelético	0,0206
Regulação positiva do processo de biossíntese de nucleotídeos	0,0212
Regulação positiva do processo de biossíntese de nucleotídeos de purina	0,0212
Regulação positiva do processo metabólico do cAMP	0,0232
Regulação positiva do processo de biossíntese de AMPc	0,0232
Fosforilação de tirosina de proteína STAT	0,0237
Organização cromossômica envolvida na meiose	0,0242
Regulação positiva do processo biosintético de nucleotídeos cíclicos	0,0253
Recombinação de DNA	0,0281
Resposta ao estímulo de temperatura	0,0282
Montagem de nucleosoma independente da replicação do DNA	0,0287
CENP-A contendo nucleossomos em centrômero	0,0287
Organização de nucleosoma independente da replicação do DNA	0,0287
Regulação da transcrição envolvida na fase G1 / S do ciclo celular mitótico	0,0287
Reparo do DNA	0,0290
Regulação positiva do processo metabólico nucleotídico	0,0293
Regulação positiva do processo metabólico de nucleotídeos de purina	0,0293
Processo lipídico catabólico	0,0298
Organização do citoesqueleto de microtúbulos	0,0303
Embalagem de DNA	0,0307
Regulação positiva do processo metabólico de nucleotídeos cíclicos	0,0311
Alteração da conformação do DNA	0,0314
Respiração celular	0,0315

Movimento organismal multicelular	0,0322
Movimento musculoesquelético	0,0322
Troca de histona	0,0325
Resposta a protozoários	0,0333
Congressão da placa metafásica mitótica	0,0346
Citocinese	0,0372
Deslocamento do filamento muscular	0,0385
Filamentos actina-miosina	0,0385
Promotor da Anáfase complexo-dependente proteasomal ubiquitina-dependente processo catabólico de proteína	0,0386
Remodelação de cadeia acil de fosfatidilinositol	0,0387
Resposta de defesa aos protozoários	0,0391
Ativação de células T alfa-beta CD4-positivas	0,0396
Digestão	0,0402
Migração de linfócitos	0,0403
Processo metabólico esteroide	0,0403
Remodelação da cadeia acil-fosfatidiletanolamina	0,0405
Cadeia de transporte de elétrons respiratórios	0,0411
Manutenção da localização	0,0414
Condensação cromossômica	0,0426
Regulação negativa da resposta ao estímulo externo	0,0431
Quimiotaxia celular	0,0431
Prisão do ciclo celular	0,0434
Regulação da transmissão sináptica, glutamatérgica	0,0436
Regulação do transporte de íons de potássio	0,0438
Resposta imune adaptativa	0,0441
Regulação da organização do citoesqueleto de microtúbulos	0,0448
Quimiotaxia dos linfócitos	0,0450
Ponto de verificação do ciclo celular mitótico	0,0454
Transição G1 / S do ciclo celular mitótico	0,0459
Processo metabólico álcool	0,0461
Regulação do ciclo celular mitótico	0,0469
Complexo proteína-DNA	0,0470
Resposta inflamatória	0,0470

Contração de células mediada por actina	0,0471
Regulação positiva da atividade de liase	0,0473
Regulação do processo baseado em microtúbulos	0,0476
Organização do cinetócoro	0,0482
Regulação da fosforilação de tirosina da proteína STAT	0,0483
Processo metabólico do composto hidroxiorgânico	0,0485
ERK1 e ERK2 em cascata	0,0494
Polimerização ou despolimerização de microtúbulos	0,0495
Regulação positiva da atividade da ciclase	0,0496
Diferenciação de células T alfa-beta CD4-positiva	0,0497

---

Nos processos biológicos enriquecidos com *up-regulation* para vacas vazias em relação a vacas prenhas, conforme já abordado com relação às vias metabólicas, observamos amplo predomínio de atividades relativas ao ciclo celular. Este processo é vital para manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte celular (MALUMBRES e BARBACID, 2009). Neste contexto, estudos em bovinos relacionaram níveis de metabólitos indicadores de balanço energético negativo, como o Beta-hidróxibutirato a alterações no ciclo celular (LI e ELSASSER, 2005). Vacas vazias apresentaram níveis inferiores de IGF-I, quando comparadas às vacas prenhas, resumindo, desta forma, uma condição de estresse metabólico (BUTLER, 2006). Conforme já abordamos anteriormente, tais condições, especialmente aquelas relacionadas ao metabolismo de gorduras, cetose e fígado gordo, já foram associadas a diferenças de transcrição e expressão gênica em vacas no periparto e os resultados do presente estudo contribuem com estes indicativos (LOOR et al., 2006; 2007; LOOR, 2010).

Além disso, e concordando com outros resultados do presente estudo, outro processo biológico que esteve entre os mais enriquecidos com *up-regulation* em vacas vazias foi o catabolismo de lipídios. Tais resultados sugerem que vacas vazias tiveram maior ativação da maquinaria metabólica para degradação e absorção de gorduras, o que corrobora com níveis menores de IGF-I deste grupo, e provável maior estresse metabólico no periparto (BUTLER et al. 2003; BUTLER, 2006). A ativação deste processo biológico encontra respaldo nos transcritos mais diferencialmente expressos encontrados no presente estudo no grupo de vacas com diagnóstico de prenhez *vazia* em relação às vacas prenhas: CPA1, CELA1, CELA3B, PNLIP; Todos envolvidos no metabolismo de lipídios. Globalmente, estes resultados fornecem evidência tanto do aumento do transporte como da canalização de ácidos graxos derivados da circulação para a  $\beta$ -oxidação e do aumento da síntese de corpos cetônicos (LOOR et al., 2007).

Finalmente, outros processos biológicos mais enriquecidos, com *up-regulation*, de vacas vazias em relação às vacas prenhas, foram àqueles relacionados à resposta inflamatória e o sistema imune. Tais eventos estão provavelmente associados à agressão do tecido hepático pela mobilização de ácidos graxos. Vacas vazias provavelmente experimentaram maior mobilização de tecido gordo no pós-parto recente, o que se refletiu em menores níveis séricos de IGF-I (BUTLER et al. 2003; BUTLER, 2006). Nossos dados demonstram adaptações de uma série de genes relacionados à inflamação, provavelmente como resultado de efeitos tanto em hepatócitos quanto em células de Kupffer (LOOR et al., 2007). Alterações em todos os processos biológicos relacionados à inflamação e sistema imune descritas na tabela 8 podem contribuir para o desenvolvimento de lipidose

hepática, cetose e resistência à insulina, prejudicando assim a função hepática normal (LOOR et al., 2007).

Tabela 8. Termos de ontologia genética (GOT) enriquecidos para processos biológicos das vazias em relação às prenhas - *down-regulation*.

Processo Biológico	p.val
Percepção visual	0,0026
Percepção sensorial do estímulo da luz	0,0028
Adesão de células homofílicas	0,0053
Desenvolvimento da próstata	0,0079
Morfogênese da glândula prostática	0,0080
Desenvolvimento de cabeça	0,0090
Via de sinalização da serina / treonina cinase da proteína receptora transmembranar	0,0092
Morfogênese do epitélio da glândula prostática	0,0104
Despolarização da membrana	0,0105
Regulação da via de sinalização da serina / treonina cinase da proteína do receptor transmembranar	0,0118
Brotação lateral de um epitélio	0,0121
Morfogênese do corpo	0,0129
Desenvolvimento do coração	0,0139
Formação de padrão dorsal / ventral	0,0140
Regulação negativa da via de sinalização canônica do receptor Wnt	0,0151
Desenvolvimento facial	0,0157
Morfogênese da cabeça	0,0165
Face morfogênese	0,0165
Adesão célula-célula	0,0169
Caminho de sinalização BMP	0,0181
Processo neuromuscular que controla o equilíbrio	0,0192
Desenvolvimento da glândula adrenal	0,0204
Desenvolvimento genital	0,0219
Regulação da plasticidade sináptica neuronal	0,0225
Resposta ao estímulo transformador do fator de crescimento beta	0,0246
Regulação do desenvolvimento da cartilagem	0,0246
Resposta celular ao estímulo transformador do fator de crescimento beta	0,0247



Manutenção de células fotorreceptoras	0,0259
Processo neuromuscular	0,0274
Morfogênese do tipo câmara embrionária	0,0287
Processo padrão de especificação	0,0291
Morfogênese de um broto epitelial	0,0305
Regulação da migração de células epiteliais	0,0310
Regulação negativa da via de sinalização da serina / treonina cinase da proteína receptora transmembranar	0,0317
Manutenção de componentes celulares	0,0335
Percepção sensorial	0,0336
Migração celular epitelial	0,0336
Migração do epitélio	0,0336
Desenvolvimento endoderma	0,0337
Regulação da ligação às proteínas	0,0338
Morfogênese do olho embrionário	0,0356
Morfogênese do tecido	0,0360
Regulação do conjunto do feixe de filamentos de actina	0,0382
Especificação do eixo	0,0406
Desenvolvimento do sistema endócrino	0,0408
Morfogênese do átrio cardíaco	0,0420
Morfogênese de uma dobra epitelial	0,0421
Formação de padrão proximal / distal	0,0427
Transformando a via de sinalização do receptor beta do fator de crescimento	0,0428
Mielinização no sistema nervoso periférico	0,0445
Envolvimento do axônio do sistema nervoso periférico	0,0445
Regionalização	0,0445
Morfogênese do trato digestivo	0,0448
Processo rítmico	0,0453
Desenvolvimento de sistema urogenital	0,0456
Resposta ao estímulo das gonadotropinas	0,0467
Desenvolvimento embrionário do tipo câmara-olho	0,0480
Regulação do processo baseado em filamentos de actina	0,0488
Morfogênese da glândula	0,0489
Ciclo de ovulação	0,0492

Nos processos biológicos enriquecidos com *down-regulation* para vacas vazias em relação a vacas prenhas, observamos amplo predomínio de atividades relativas ao desenvolvimento embrionário. Morfogênese é o processo de modelagem dos organismos, ou seja, do seu desenvolvimento a partir do zigoto, por meio da formação dos tecidos, órgãos e sistemas (HYTTEL et al., 2012).

Também estiveram entre os processos biológicos mais enriquecidos com *down-regulation* das vacas vazias em relação às prenhas aqueles relacionados à reprodução, como: resposta ao estímulo das gonadotropinas e ciclo da ovulação. Tais resultados podem estar relacionados aos menores níveis de IGF-I encontrados em vacas vazias, o que traduziu todo o estado metabólico de balanço energético negativo e não retorno a concepção (HESS, 2005). Vários trabalhos demonstram que vacas que ovulam o folículo dominante da primeira onda pós-parto tem maiores níveis sanguíneos de IGF-I do que vacas anovulatórias (BUTLER et al., 2006, KAWASHIMA et al., 2007). No mesmo sentido, o hormônio metabólico IGF-I atua sobre os ovários (WILLIS et al., 1998) e funciona como um modulador da ação de gonadotrofinas, na teca e na granulosa, como estimulante da proliferação e diferenciação celular (ARMSTRONG e WEBB, 1997) e reduzindo a atresia folicular (EL-ROEIY et al., 1994).

## **Conclusões**

A maior expressão diferencial de transcritos relacionados, bem como o enriquecimento de vias metabólicas e a ativação de processos biológicos relativos à

mobilização e catabolismo de reservas corporais e digestão de nutrientes da dieta em vacas vazias; somado a inibição significativa de processos biológicos da reprodução; indica que a condição de estresse metabólico no pós-parto recente pode ser determinante na predição do status reprodutivo futuro.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA) pela disponibilização da estrutura do Laboratório Multiusuário de Bioinformática para o processamento dos dados.

### **Referências bibliográficas**

- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE JUNIOR, C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1291-1302, 2000.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. **HTSeq A Python framework to work with highthroughput sequencing data**. p. 0–5, 2014.
- ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. **Reference Source**, 2010.
- ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews in Reproduction**, v.2, p.139-146, 1997.

- AZAMBUJA, R. C. C. **Características metabólicas do período de transição e eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes genótipos criadas no sul do Brasil.** *Universidade Federal de Pelotas (Dissertação de Mestrado)*, 79 p. 2013.
- BAUMAN, D.E. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeoresis. In: CRONJÉ, PB. **Ruminant physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction.** Wallingford: CAB 2000. Cap.18, p.311-328, 2000.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- BEAM, S.W.; BUTLER, W.R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.411-424, 1999.
- BERCHIELLI, T.T.; RODRIGUEZ, N.M.; OSÓRIO NETO, E. **Nutrição de ruminantes.** Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.
- BLACKSHAW, J.K.; BLACKSHAW, A.W. Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behavior: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.34, p.285- 295, 1994.
- BRÄNNSTRÖM, M. Effects of human necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) on ovulation in the rat ovary. **Reproduction Fertility and Development, Collingwood**, v. 7, n. 1, p. 67-73, 1995.

- BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**. v. 83, p. 211–218, 2003.
- BUTLER, S. T., S. H. PELTON, W. R. BUTLER. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, v. 89(8), p. 2938-2951. 2006.
- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 579p. 2004.
- DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.345-370, 2003.
- DRACKLEY, J.K: ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of Dairy Science**. 82 (11): 2259-2273. 1999.
- DRACKLEY, J.K. Calf nutrition from birth to breeding. **Vet. Clin. N. Am. Food Anim.**, v.24, p.55-86, 2008.
- EL-ROEIY, A.; CHEN, X.; ROBERTS, V.J.; SHIMASAKAI, S.; LING, N.; LEROITH, D.; ROBERTS JUNIOR, C.T.; YEN, S.S. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.78, p.1488-1496, 1994.

- EWING, B.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p. 186–194, 1 mar. 1998.
- FENWICK MA, FITZPATRICK R, KENNY DA, DISKIN MG, PATTON J, MURPHY JJ, WATHES DC: Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. **Domest Anim Endocrinol**. 2008, 34 (1): 31-44. 10.1016/j.domaniend.2006.10.002
- GARBER M, GRABHERR MG, GUTTMAN M, TRAPNELL C: Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nat Methods**. 2011, 8 (6): 469-477. 10.1038/nmeth.1613.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado De Fisiologia Médica**, 10. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2002.
- HALL, D. A. **International review of connective tissue research**. University of Leeds. Academic Press. Vol. 1, 400 p., 1963.
- HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; WESTON, T. R.; NAYIGIHUGU, V.; MOLLE, J. D. C.; MOSS, G. E. Nutritional controls of beef cow reproduction. **Journal Animal Science**, v. 83, p. E90-E106, 2005
- HUANG W, KHATIB H: Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. **BMC Genomics**. 2010, 11: 711-10.1186/1471-2164-11-711.
- HUI, D. Y. 1996. Molecular biology of enzymes involved with cholesterol ester hydrolysis in mammalian tissues. **Biochim. Biophys. Acta**. 1303: 1–14.
- HYTTEL, P. SINOWATZ, F. VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. 1 ed. Elsevier, 2012.
- KAWASHIMA, C., S. FUKIHARA, M. MAEDA, E. KANEKO, C. A. MONTOYA, M. MATSUI, T. SHIMIZU, N. MATSUNAGA, K. KIDA, Y. MIYAKE, D. SCHAMS,

- A. MIYAMOTO. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. **Reproduction**, v. 133(1), p. 155163. 2007.
- LECCHI, C. DILDA, F. SARTORELLI, P. CECILIANI, F. Widespread expression of SAA and Hp RNA in bovine tissues after evaluation of suitable reference genes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, vol. 145, no. 1-2, pp. 556–562, 2012.
- LEE S. H.; ENGLE T. E.; HOSSNER K. L. Effects of dietary copper on the expression of lipogenic genes and metabolic hormones in steers. **Journal of Animal Science**. 80 1999-2005.
- LI, C. J. ELSASSER, T. H. Butyrate-induced apoptosis and cell cycle arrest in bovine kidney epithelial cells: Involvement of caspase and proteasome pathways. **Journal of Animal Science**. 2005. 83:89–97.
- LOOR JJ, DANN HM, EVERTS RE, OLIVEIRA R, GREEN CA, JANOVICK-GURETZKY NA, LITHERLAND N, RODRIGUEZ-ZAS SL, LEWIN HA, DRACKLEY JK. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. **Physiol Genomics**, 27: 29–41, 2006.
- LOOR JJ: Genomics of metabolic adaptations in the periparturient cow. **Animal**. 2010.
- LOOR JJ, EVERTS RE, BIONAZ M, DANN HM, MORIN DE, OLIVEIRA R, RODRIGUEZ-ZAS SL, DRACKLEY JK, LEWIN HA: Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signalling gene networks in liver of periparturient dairy cows. **Physiol. Genomics**. 32: 105-116. 2007.
- LOWMAN, B.G.; SCOTT, N.A.; SOMERVILLE, S.H. **Condition scoring of cattle**. Edinburgh: Edinburgh School of Agriculture, 1976. 31p.

- LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction**. Suppl. 61:415-427, 2003.
- LUO, W., FRIEDMAN, M.S., SHEDDEN, K., HANKENSON, K.D., WOOLF, P.J., 2009. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. **BMC Bioinforma.** 10, 161.
- LUO, W., BROUWER, C., 2013. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. **Bioinformatics** 29, 1830e1831.
- MALUMBRES M, BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Ver. Cancer** . 2009; 9 (3):153-66.
- MCCARTHY SD, WATERS SM, KENNY DA, DISKIN MG, FITZPATRICK R, PATTON J, WATHES DC, MORRIS DG: Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. **Physiol Genomics**. 2010, 42A (3): 188-199. 10.1152/physiolgenomics.00118.2010.
- MITCHELL, T. M. **Machine Learning**. New York: McGraw-Hill, 1997.
- MORRIS DG, WATERS SM, MCCARTHY SD, PATTON J, EARLEY B, FITZPATRICK R, MURPHY JJ, DISKIN MG, KENNY DA, BRASS A., Pleiotropic effects of negative energy balance in the postpartum dairy cow on splenic gene expression: repercussions for innate and adaptive immunity. **Physiol Genomics**. 39 (1): 28-37.2008.
- MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, MCCUE K, SCHAEFFER L, WOLD B: Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat Methods**. 2008.
- MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Is tumor necrosis factor a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F2 release at luteolysis in cattle? **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v. 62, n. 5, p. 1109-1115, May 2000.



- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Savier, 2007.
- OSHLACK A, ROBINSON MD, YOUNG MD: From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biol.** 11 (12): 220-10. 2010.
- PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J.J.S.; KROETZ, I.A.. Intervalo de partos de fêmeas bovinas Nelore, Guzerá x Nelore, Red Angus x Nelore, Marchigiana x Nelore e Simental x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa - MG, v. 35, n. 3, p. 733-741, 2006.
- PRODROMAKI, E. A. Expression of the microRNA regulators Drosha, Dicer and Ago2 in non-small cell lung carcinomas. IN.: **Cellular Oncology**, 38 (4): 307-317. 2015.
- RADCLIFF, R.P.; MCCORMACK, B.L.; CROOKER, B.A.; LUCY, M.C. Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3920-3926, 2003.
- RANDEL, R. D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **Journal of Animal Science**. 68:853. 1990.
- REYNOLDS, C. K., AIKMAN, P.C., LUPOLI, B., HUMPHRIES, D.J., BEEVER, D.E. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**. 2003, 86 (4): 1201-1217.
- SAKUMOTO, R.; OKUDA, K. Possible actions of tumor necrosis factor- $\alpha$  in ovarian function. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 39-46, February, 2004.
- SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.; GALVAO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus

- synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.513-535, 2004.
- SHORT, R.E., BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B. et al. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beefcattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.799-815, 1990.
- SIMPSON, R. B., C. C. CHASE, JR., L. J. SPICER, J. A. CARROLL, A. C. HAMMOND, AND T. H. WELSH, JR. Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein activity, and metabolites in ovariectomized Angus and Brahman cows. **Domest. Anim. Endocrinol.** 14:367–380. 1997.
- SOUZA, M. I. L; VELÁSQUEZ, L. F. U. O Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) na Reprodução de Fêmeas - Revisão de Literatura. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** 11, n. 1, p. 47-53, jan./jun. 2008.
- STAGG, K.; SPICER, L.J.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biology of Reproduction**, v.59, p.777783, 1998.
- STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.856-871, 1998.
- TERRANOVA, P. F. Potential roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, 14, n. 1, p. 1-15, 1997.

- TRAPNELL, C. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511–515, 2010.
- TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat Protoc.** ; 7(3): 562–578. 2012.
- TREVISI E, AMADORI, M, BAKUDILA, A, BERTONI, G., 2009. Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. **Journal of Animal Science**, 87, 3020–3029.
- TREVISI E., AMADORI M., COGROSSI S., RAZZUOLI E., BERTONI G., 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. **Research Veterinary Science**, 93, 695–704.
- VELAZQUEZ, M. A., M. NEWMAN, M. F. CHRISTIE, P. CRIPPS, M. A. CROWE, R. F. SMITH, H. DOBSON. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. **Theriogenology**, v. 64(9), p. 1977-1994. 2005.
- WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet.** 10 (1): 57-63. 2009.
- WEBB, K. E. JR. 1990. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: A review. **Journal of Animal Science**, 68:3011–3022. 1990.
- WETTEMANN, R. P., BOSSIS, I., Energy intake regulates ovarian function in beef cattle. **Proc. Am. Soc. Anim. Sci.** 2000.
- WILLIAMS, G.L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science.** v.68, p.831-852, 1990.
- WILLIS, D.S.; MASON, H.D.; WATSON, H.; FRANKS, S. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I

and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.83, p.1256-1259, 1998.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckledbeef cows: a review. **Theriogenology**, v.54, p.25–55, 2000.

## 7. Considerações finais

Nas condições estudadas, a utilização do cruzamento entre raças com maior distanciamento genético aumentou a produção leiteira em vacas de corte. Vacas F1 Angus-Nelore, Nelore-Angus e Angus-Caracu demonstraram maior habilidade maternal, com produções de leite superiores a quase todos os demais grupos raciais e também foram os genótipos que produziram o leite mais nutritivo mesmo com produção de leite elevada. Por consequência, produziram também, bezerros mais pesados. Tais resultados apontam que cruzamentos devem ser utilizados para aumentar a produtividade da fase de cria na pecuária de corte extensiva sobre pastagem natural na região sul do Brasil. Em um segundo momento, utilizamos técnicas de inteligência computacional para predição de eficiência reprodutiva em vacas de corte, a partir de dados de metabólitos e hormônios, o que se mostrou uma alternativa válida. Os modelos computacionais aqui criados, através da técnica de árvores de decisão, mostraram que o hormônio Fator de Crescimento similar à Insulina tipo 1 (IGF-I) pode ser utilizado para prever a propensão da vaca a ter um diagnóstico de prenhez positivo pós-acasalamento. Em um terceiro momento, por meio de sequenciamento de RNA, verificamos que a maior expressão diferencial de transcritos relacionados, bem como o enriquecimento de vias metabólicas e a ativação de processos biológicos relativos à mobilização e catabolismo de reservas corporais e digestão de nutrientes da dieta em vacas vazias; somado a inibição significativa de processos biológicos da reprodução; indica que a condição de estresse metabólico no pós-parto recente pode ser determinante na predição do status reprodutivo futuro.

## 8. Referências bibliográficas

- ALBERTINI, T.Z.; MEDEIROS, S.R.; TORRES, R.A.A. Características das curvas de lactação de vacas de corte cruzadas obtidas por diferentes métodos. In: 44<sup>o</sup> **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2007, Anais.** Jaboticabal-SP, 2007.
- ALBERTINI, T. Z. MEDEIROS, S. R. TORRES JÚNIOR, R. A. A. ZOCCHI, S. S. OLTJEN, J. W. STRATHE, A. B., LANNA, D. P. D. A methodological approach to estimate the lactation curve and net energy and protein requirements of beef cows using nonlinear mixed-effects modeling. **J. Anim. Sci.** 90:3867–3878. 2015.
- ALBUQUERQUE, L. G., J. P. ELER, M. J. R. P. COSTA. Milk Production and Calf Performance from Birth to Weaning in Three Beef Cattle Breeds. **Rev. Bras. Zootec.** 22:745-754. 1993.
- ALENCAR, M. M. Heritability and effects of milk production on the reproductive efficiency of Canchim cows. **Rev. Bras. Zootec.**16:163-165. 1987.
- ALENCAR, M. M., F. J. RUZZA AND E. J. S. PORTO. Productive performance of Canchim and Nelore females. III. Milk production. **Rev. Bras. Zootec.**17:317-328. 1988.
- ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews in Reproduction**, v.2, p.139-146, 1997.

- AZAMBUJA, R. C. C. **Características metabólicas do período de transição e eficiência produtiva de vacas de corte de diferentes genótipos criadas no sul do Brasil.** *Universidade Federal de Pelotas (Dissertação de Mestrado)*, 2013.
- BAI, Y.; SARTOR, M.; CAVALCOLI, J. Current status and future perspectives for sequencing livestock genomes. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 8–8, jan. 2012.
- BARCELLOS, J.O.J.; LOBATO, J.F.P.; FRIES, L.A.. Eficiência de vacas primíparas Hereford e cruzas Hereford-Nelore acasaladas no outono/inverno ou na primavera/verão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 414-427, 1996.
- BAUMAN, D.E. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeoresis. In: CRONJÉ, PB. Ruminant physiology. **Digestion, metabolism, growth and reproduction**. Wallingford: CAB 2000. Cap.18, p.311-328, 2000.
- BAUMAN, D. E, W. B. CURRIE. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of Dairy Science**, v. 63(9), p. 1514-1529. 1980.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 73(9), p. 2804-2819. 1995.
- BEAL, W. E., D. R. NOTTER. 1990. Techniques for estimation of milk yield in beef cows and relationships of milk yield to calf weight gain and postpartum reproduction. **J. Anim. Sci.** 38:937–943.

- BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic hormones and early postpartum follicle development in dairy cows fed prilled lipid. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 121–131, 1998.
- BORNFELDT, K.E.; ARNQVIST, H.J.; ENBERG, B.; MATHEWS, L.S.; NORSTEDT, G. Regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression by diabetes and nutritional state in rat tissues. **Journal of Endocrinology**, v.122, p.651-656, 1989.
- BRETON, M.C.; CAMARGO, S. S.; KISHI, L.T.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Identification of differentially expressed genes in Citrus sinensis leaves and branches in response to Candidatus Liberibacter asiaticus and Ca. L. americanus. **Journal of Citrus Pathology**. v. 1, p. 269–269, 2014.
- BROCKMAN, R. P.; LAARVELD, B. Hormonal regulation of metabolism in ruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 14, p.313-334, 1986.
- BROWN, M. A., A. H. BROWN, W. G. JACKSON AND J. R. MIESNER. Genotype × environment interactions in milk yield and quality in Angus, Brahman, and reciprocal-cross on different forage systems. **Journal of Animal Science**. 79:1643–1649. 2001.
- BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 2533–2539, 1998.
- BUTLER, W.R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. **Livestock Production Science**. v. 83, p. 211–218, 2003.



BUTLER, S. T., S. H. PELTON, W. R. BUTLER. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. **Journal of Dairy Science**, v. 89(8), p. 2938-2951. 2006.

CAMARGO, S.S. **Mineração de regras de associação no problema da cesta de compras aplicada ao comércio varejista de confecção**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Dissertação de Mestrado), 101 p. 2002.

CAMARGO, S.S.; ENGEL, P.M. Mining association rules for hiv-1 protease cleavage site prediction. In: **Anais do V Simpósio Brasileiro de Qualidade de Software**, 2006.

CAMARGO, S.S. **Um modelo neural de aprimoramento progressivo para redução de dimensionalidade**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tese de doutorado), 107p. 2010.

CAMARGO, S. S. AZAMBUJA, R. C. C. FEIJÓ, J. O. CORRÊA, M.N. SCHNEIDER, A. CARDOSO, F.F. Modelagem Computacional de Indicadores Metabólicos para Estudo de Eficiência Reprodutiva em Vacas de Corte. **Anais do X Congresso Brasileiro de Agroinformática**, SBIAGRO, 2015.

CAMPOS, R. Uma abordagem neural para predição da mastite a partir de indicadores bioquímicos do metabolismo. In: **II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, 2006.

CÁNOVAS A, RINCON G, ISLAS-TREJO A, WICKRAMASINGHE S, MEDRANO JF: SNP discovery in the bovine milk transcriptome using RNA-Seq technology. **Mamm Genome**. 21 (11–12): 592-598. 2010.

- CERDÓTES, L., J. RESTLE, D. C. ALVES FILHO, M. F. B. L. NÖRNBERG, J. L. NÖRNBERG, I. HECK, M. F. SILVEIRA. Production and Composition of Milk of Cows of Four Genetic Groups Submitted to Two Feeding Managements During the Lactation Period. **Rev. Bras. Zootec.** 33:610-622. 2004.
- CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREAU, M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. **Reproduction Fertility and Development**, v. 38, p. 131152, 1998.
- CROMBERG, V.U.; PARANHOS da COSTA, M.J.R. Mamando logo, para crescer a receita. **ANUALPEC 97**, São Paulo:FNP, p.215-217, 1997.
- CUBAS, A.C.; PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J.J.S. Desempenho até a desmama de bezerros Nelore e cruzas com Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa - MG, v.30, p.694-701, 2001.
- DALEY, D.R.; MCCUSKEY, A.; BAILEY, C.M.. Composition and yield of milk from beef-type *Bos taurus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* dams. **Journal of Animal Science**, v.64 p.373, 1987.
- DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.345-370, 2003.
- DOUGLAS, G. N., T. R. OVERTON, H. G. BATEMAN, N. D, H. M. DANN, J. K. DRACKLEY. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89(6), p. 2141-2157. 2006.

EL-ROEIY, A.; CHEN, X.; ROBERTS, V.J.; SHIMASAKAI, S.; LING, N.; LEROITH, D.; ROBERTS JUNIOR, C.T.; YEN, S.S. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.78, p.1488-1496, 1994.

ENGELBRECHT, A. P. **Computational Intelligence: An introduction**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

FAGUNDES, J.I.B.; LOBATO, J.F.P.; SCHENKEL, F.S. Efeito de carga animal na produção de leite de vacas de corte primíparas e no desenvolvimento de seus bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.412-419, 2004.

FENWICK MA, FITZPATRICK R, KENNY DA, DISKIN MG, PATTON J, MURPHY JJ, WATHES DC: Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. **Domest Anim Endocrinol**. 34 (1): 31-44. 2008.

GREGORY, K.E.; CUNDIFF, L.V. Crossbreeding in beef cattle: evaluation of systems. **Journal of Animal Science**, v.51, p.1224-1242, 1980.

GARBER M, GRABHERR MG, GUTTMAN M, TRAPNELL C: Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nat Methods**. V. 8 (6): 469-477. 2011.

HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; WESTON, T. R.; NAYIGIHUGU, V.; MOLLE, J. D. C.; MOSS, G. E. Nutritional controls of beef cow reproduction. **Journal Animal Science**, v. 83, p. E90-E106, 2005.

HOLTENIUS, P. Hormonal regulation related to the development of fatty liver and ketosis. **Acta Vet Scandinavian**. Suppl. 89: p. 55-60, 1993.

- HUANG W, KHATIB H: Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq. **BMC Genomics**. V. 11: 711-20.2010.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Pecuária Municipal 2016.
- INSKEEP, E. K. progesterone on embryonic survival in the cow Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of **Journal of Animal Science**. 82:E24-E39. 2004.
- JENKINS, T. G. AND C. L. FERRELL. Lactation characteristics of nine breeds of cattle fed various quantities of dietary energy. **J. Anim. Sci.** 57:1652-1660. 1992.
- JENKINS, T. G., C. L. FERRELL, AND A. J. ROBERTS. Lactation and calf weight traits of mature cross bred cows fed varying daily levels of metabolizable energy. **J. Anim. Sci.** 78:7–14. 2000.
- JONES, J. I, D. R. CLEMMONS. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16(1), p. 3-34. 1995.
- KAWASHIMA, C., S. FUKIHARA, M. MAEDA, E. KANEKO, C. A. MONTOYA, M. MATSUI, T. SHIMIZU, N. MATSUNAGA, K. KIDA, Y. MIYAKE, D. SCHAMS, A. MIYAMOTO. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. **Reproduction**, v. 133(1), p. 155163. 2007.
- KECMAN, V. **Learning and Soft Computing: support vector machines, neural networks, and fuzzy logic models**. Cambridge: MIT Press, 2001.

- KIM TK, HEMBERG M, GRAY JM, COSTA AM, BEAR DM, WU J, HARMIN DA, LAPTEWICZ M, BARBARA-HALEY K, KUERSTEN S: Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. **Nature**. 465 (7295): 182-187. 2010.
- KOHAVI, R. A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. In: **Proceedings of the Fourteenth International Joint Conference on Artificial Intelligence**. [S.l.: s.n.], 1995.
- KONAR, A. **Artificial Intelligence and Soft Computing: behavioral and cognitive modeling of the human brain**. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- LAWRENCE, M. C.; MCKERN, N. M.; WARD, C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. **Current Opinion Structure Biology**, v. 17, p.699-705, 2007.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; DELANGHE, J. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, G.; BOLS, P. E. J.; DEWULFA, J.; KRUIF, A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 201–211, 2004.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A.; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Nonesterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on development capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, p. 485–495, 2005.
- LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part I The Importance of Negative Energy Balance and Altered Corpus Luteum Function to the Reduction of Oocyte and Embryo

- Quality in High-yielding Dairy Cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 612-622, 2008.
- LIU, T. MAYS, A. R. TURNER, K. E. WU, J. P. BROWN, M. A. Relationships of milk yield and quality from six breed groups of beef cows to preweaning average daily gain of their calves. **J. Anim. Sci.** 93:1859–1864, 2015.
- LOOR JJ: Genomics of metabolic adaptations in the periparturient cow. **Animal**. V. 4 (7): 1110-1139. 2010.
- LOOR JJ, EVERTS RE, BIONAZ M, DANN HM, MORIN DE, OLIVEIRA R, RODRIGUEZ-ZAS SL, DRACKLEY JK, LEWIN HA: Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signalling gene networks in liver of periparturient dairy cows. **Physiol. Genomics**. v. 32: 105-116. 2007.
- LUCY, M. C., SAVIO, J. D., BADINGA, L., DE LA SOTA, R. L., THATCHER, W. W., Factor That affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*. 70: 3615-3626. 1992.
- LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**. 83, 1635-1647. 2000.
- LUCY, M. C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction**. Suppl. 61:415-427, 2003.
- MAHER CA, PALANISAMY N, BRENNER JC, CAO X, KALYANA-SUNDARAM S, LUO S, KHREBTUKOVA I, BARRETTE TR, GRASSO C, YU J: Chimeric transcript discovery by paired-end transcriptome sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 106 (30): 12353-12358. 2009.
- 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. Vldl, p. 193–193, jan. 2012.

McCARTHY SD, WATERS SM, KENNY DA, DISKIN MG, FITZPATRICK R, PATTON J, WATHES DC, MORRIS DG: Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. **Physiol Genomics**. 2010, 42A (3): 188-199. 10.1152/physiolgenomics.00118.2010.

McMORRIS, M.R.; WILTON, J.W.. Breeding systems, cow weight and milk yield effects on various biological variables in beef production. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1363-1372, 1986.

MENDONÇA, G.; PIMENTEL, M.A.; CARDELLINO, R.A. OSÓRIO, J.C.S. Produção de leite em primíparas de bovinos Hereford e desenvolvimento ponderal de terneiros cruzas taurinos e zebuínos. **Rev. Bras. Zootec.** Viçosa, MG, v.31 p.467-474, 2002.

MELTON, A. A., J. K. RIGGS, L. A. NELSON AND T. C. CARTWRIGHT. Milk production, composition and calf gains of Angus, Charolais and Hereford cows. **Journal of Animal Science**, 26:804-809. 1967.

MILLER, S. P. AND J. W. WILTON. Genetic relationships among direct and maternal components of milk yield and maternal weaning gain in a multibreed beef herd. **Journal of Animal Science**. 77:1155-1161. 1999.

MITCHELL, T. M. **Machine Learning**. New York: McGraw-Hill, 1997.

MORAES J. C. F., JAUME, C. M., SOUZA, C. J. H. Controle da reprodução em bovinos de corte. **Comum. Téc. Embrapa Pecuária Sul**, n.58, p.1-3, 2005.

- MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, MCCUE K, SCHAEFFER L, WOLD B: Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nat Methods**. V. 5 (7): 621-628. 2008.
- MULLER, E.E., LOCATELLI, V., COCCHI, D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 79, 511-607. 1999.
- NAGAI, L. A. E. **Identificação de genes relacionados a maciez da carne de bovinos das raças Angus e Nelore por análise de expressão diferencial**. Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de Mestrado. 2014.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. Washington, D.C. 242p. 1996.
- NEGUSSIE, B.; BRANNANG, E.; ROTTMANN, O.J.. Reproductive performance and herd life of dairy cattle at Asella livestock farm. *Arsi. Ethiopia*. II. Crossbreds with 50. 75 e 87,5% European inheritance. **Journal of Animal Breeding Genetic**, v.116, p.225-234, 1999.
- NOOKAEW, I. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 20, p. 10084–97, nov. 2012.
- OLIVEIRA, V.T.; FONTES, C.A.A.; SIQUEIRA, J.G. Produção de leite e desempenho dos bezerros de vacas Nelore e mestiças. **Revista Brasileira de Zootecnia** , Viçosa - MG, v.36, 2007.
- OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M.C.; BASTOLLA, F.M.; CAMARGO, S.S.; MARGIS, R.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of gene



- expression in eucalyptus species. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, p. 405–422, 2011.
- ORESQUES, N.; SHRADER-FRECHETTE, K.; BELITZ, K. Verification, validation, and confirmation of numerical models in the earth sciences. **Science Magazine**, v. 5147, p. 641–646, 1994.
- OSHLACK A, ROBINSON MD, YOUNG MD: From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biol.** V. 11 (12): 220-10. 2010.
- PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J.J.S.; KROETZ, I.A.. Intervalo de partos de fêmeas bovinas Nelore, Guzerá x Nelore, Red Angus x Nelore, Marchigiana x Nelore e Simental x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa - MG, v. 35, n. 3, p. 733-741, 2006.
- PORETSKY, L.; CATALDO, N.A.; ROSENWAKS, Z.; GIUDICE, L.C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. **Endocrinology Review**. v. 20, p. 535–582, 1999.
- QUINLAN, J. R. C4.5: **Programs for Machine Learning**. New York: Morgan Kaufmann Publishers, 1993.
- RANDEL, R.D.. Reproduction of Bos indicus breeds and crosses. In: **Proceedings of Symposium on Tropically Adapted Breeds**. American Society of Animal Science. Southern section meeting. Little Rock, Arkansas, p.24-37, 2005.
- RESTLE, J.; POLLI, V. A.; SENNA, D.B.. Efeito de grupo genético e heterose sobre a idade e peso a puberdade e sobre o desempenho reprodutivo de novilhas de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.701-707, 1999.
- RESTLE, J., P. S. PACHECO, J. L. MOLETTA, I. L. BRONDANI, L. CERDÓTES. Genetic Group and Postpartum Nutritional Level on the Milk Yield and Composition of Beef Cows. **Rev. Bras. Zootec.** 32:585-597. 2003.

- RESTLE, J.; SENNA, D.B.; PACHECO, P.S. et al. Grupo genético e heterose na produção de leite de vacas de corte submetidas a diferentes sistemas de alimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa - MG, v.34, p.1329-1338, 2005.
- RIBEIRO, E. L. A., J. RESTLE AND C. C. PIRES, C.C. Milk production and composition in Charolais and Angus cows nursing straightbred or crossbred calves. **Rev. Bras. Pesq. Agr.** 26:1267-1273. 1991.
- RIVERA, G. M, J. E. FORTUNE. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, v. 144(7), p. 2977-2987. 2003.
- ROBERTS, A. J., R. A. NUGENT, III, J. KLINDT, AND T. G. JENKINS. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. **J. Anim. Sci.** 75:1909–1917. 1997.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010.
- ROBISON, O. W., M. K. M. YOUSEFF, AND E. U. DILLARD. Milk production in Hereford cows. I – Means and correlations. **J. Anim. Sci.** 47:131-136. 1978.
- ROSO, V. M. AND L. A. FRIES. Evaluation of Maternal and Individual Heterosis on Prewaning Gain of Angus x Nellore Calves **Rev. Bras. Zootec.** 29:732-737. 2000.

RUTLEDGE, J. J., O. W. ROBISON, W. T. AHLSCHEDE, AND J. E. LEGATES.  
Milk yield and its influence on 205-day weight of beef calfs. **J. Anim. Sci.**  
33:563-567. 1971.

SALES, J. N. S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas Bos indicus e Bos taurus.**162 f.Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

SCHILLO, K. K., Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.1271-1282, 1992.

SCOTT, A. Reductionism revisited. **Journal of Consciousness Studies**, v. 11, n. 2, p. 51–68, 2004.

SENNA, D.B. **Desempenho reprodutivo e produção de leite de vacas de quatro grupos genéticos, desterнейradas precocemente, submetidas a diferentes períodos de pastagem cultivada.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1996. 85p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, 1996.

SHORT, R.E., BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beefcattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.799-815, 1990.

SMITH, T. R.; HIPPEN, A. R.; BEITZ, D. C.; YOUNG, J. W. Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1569-1581, 1997.

STAGG, K.; SPICER, L.J.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F.; DISKIN, M.G. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic

- hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biology of Reproduction**, v.59, p.777783, 1998.
- SULTAN M, SCHULZ MH, RICHARD H, MAGEN A, KLINGENHOFF A, SCHERF M, SEIFERT M, BORODINA T, SOLDATOV A, PARKHOMCHUK D: A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. **Science**. 321 (5891): 956-960. 2008.
- VAZ, R. Z. RESTLE, J. PACHECO, P. S. VAZ, F. N. ALVES FILHO, D. C. BRONDANI, I. L. PASCOAL, L. L. ARGENTA, F. M. Produtividade e eficiência de produção de vacas de diferentes grupos genéticos submetidas a pastagens cultivadas no pré ou pós-parto. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2697-2708, 2014.
- VELAZQUEZ, M. A., M. NEWMAN, M. F. CHRISTIE, P. CRIPPS, M. A. CROWE, R. F. SMITH, H. DOBSON. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. **Theriogenology**, v. 64(9), p. 1977-1994. 2005.
- WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet**. 10 (1): 57-63. 2009.
- WATHES, D. C., M. FENWICK, Z. CHENG, N. BOURNE, S. LLEWELLYN, D. G. MORRIS, D. KENNY, J. MURPHY, R. FITZPATRICK. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. **Theriogenology**, v. 68 Suppl 1, p. S232-241. 2007.
- WEBB, R., GARNSWORTHY, P.C., GONG, J.G., ARMSTRONG, D.G., Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**. 82 (E. Suppl) 63-74. 2004.

- WETTEMANN, R. P., LENTS, C. A., CICCIOLO, N. H., WHITE, F. J., RUBIO, I.  
Nutrition and suckling mediated anovulation in beef cows. **Journal of Animal Science**. 81 (E. Suppl.2) E48-E59. 2003.
- WILLIAMS, G.L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science**. v.68, p.831-852, 1990.
- YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Postpartum acyclicity in suckledbeef cows: a review. **Theriogenology**, v.54, p.25–55, 2000.
- YIMAZ, A., M. E. DAVIS, R. C. M. SIMMEN. Analysis of female reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum insulinlike growth factor I concentration. **Theriogenology**, v. 65(6), p. 1180-1190. 2006.
- ZHANG, Z. Y.; ZHOU, B.; XIE, L.; **Pharmacol. Ther.** V. 93, 307. 2002.