**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS RELACIONADOS À DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM BOVINOS NELORE

**Bruna Maria Salatta**
**Zootecnista**

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

# EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS RELACIONADOS À DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM BOVINOS NELORE

**Bruna Maria Salatta**
**Orientadora: Prof.ª Dra. Lucia Galvão de Albuquerque**
**Coorientadora: Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal**

**2019**

S161e

Salatta, Bruna Maria

Expressão de genes e proteínas relacionados à deposição de gordura intramuscular em bovinos Nelore / Bruna Maria Salatta. -- Jaboticabal, 2019

71 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lucia Galvão de Albuquerque

Coorientadora: Larissa Fernanda Simielli Fonseca

1. Gordura intramuscular. 2. LC-MS/MS. 3. Nelore. 4. qRT-PCR. 5. Validação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**Câmpus de Jaboticabal**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS RELACIONADOS À DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM BOVINOS NELORE

**AUTORA: BRUNA MARIA SALATTA**
**ORIENTADORA: LUCIA GALVÃO DE ALBUQUERQUE**
**COORIENTADORA: LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Pós-doutoranda LARISSA FERNANDA SIMIELLI FONSECA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pós-Doutoranda YURI TATIANA GRANJA
Departamento de Zootecnia-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Pesquisadora Dra. MARIA EUGÊNIA ZERLOTTI MERCADANTE
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Jaboticabal, 23 de julho de 2019

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**Bruna Maria Salatta** nascida no dia 11 de janeiro de 1993, na cidade de Itápolis, São Paulo, filha de Donizeti Afonso Salatta e Diva Soares Salatta. Iniciou o curso de Zootecnia em março de 2012 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal. Foi bolsista de iniciação cientifica (Pibic – CNPq) no ano de 2016 sob orientação da professora Dra. Lucia Galvão de Albuquerque. Obteve o título de bacharel em Zootecnia em fevereiro de 2017. Em agosto de 2017, ingressou no curso de mestrado pelo programa Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrarias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação da professora Dra. Lucia Galvão de Albuquerque e co-orientação da Dra. Larissa Fernanda Simielli Fonseca. Foi bolsista de CAPES pelo período de 03 de agosto de 2017, até 03 de agosto de 2019.

## Agradecimentos

Achei está a parte mais difícil da dissertação para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo valor que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus pela proteção divina. Por iluminar minhas decisões e atitudes, por me guiar, por me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço a Ele também por manter o meu pai ao meu lado.

Aos meus pais Donizeti e Diva, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão. Vocês me mostraram o quanto era importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado. Agradeço por sempre terem me dado suporte para eu alcançar todas as minhas conquistas, pela paciência, atenção, amor incondicional, sabedoria e exemplo. Vocês são o maior exemplo de vida que eu tenho. Tanto de família, como de amor um com o outro. Amor maior que o mundo.

Agradeço a professora Dra. Lucia Galvão de Albuquerque a oportunidade de tê-la como orientadora de Iniciação Cientifica e Mestrado, as constantes demonstrações de sabedoria e exemplo profissional. Agradeço a orientação durante todos esses anos, disponibilidade de ensinar, e suporte para a realização do projeto. O meu mais sincero muito obrigada.

Agradeço muito a Larissa. Resumi-la a minha coorientadora é muito pouco e tenho certeza de que ela sente a importância que teve e tem para mim não só na condução do trabalho, mas também como conselheira e até nas horas em que parece que nada está dando certo. Obrigada pela amizade, disponibilidade, dedicação e paciência ao longo do projeto.

Aos professores Daniel, Jesus e Tiago por sempre solícitos para tirar dúvidas e dar sugestões para melhoria do projeto. Muito obrigada!

A minha querida amiga Gabriela. Agradeço pela companhia diária, desde os tempos da graduação até agora, pelo ombro amigo, pela confiança, pelas viagens e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos. Você é um exemplo de generosidade e bondade. Sua amizade é um presente que ganhei da vida e vou levá-la comigo para sempre.

Aos colegas de departamento Ivan, Marta, Caio, Diego, Patrícia, Danielly, Ana Fabrícia, Tiago, Natália, Andres, Willian, André, Thaise, Samuel, Malane e outros pela convivência, amizade, pela ajuda científica e por tornar nosso ambiente de trabalho agradável. Obrigada pelos cafés diários.

Àqueles que de alguma forma ou de outra estiveram presentes durante a realização desse trabalho.

À FCAV, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, ao pessoal da secretaria do nosso PPG e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A TODOS, obrigada de coração.

# SUMÁRIO

**1. INTRODUÇÃO ..... 1**

**2. OBJETIVO ..... 3**

**2.1 Objetivo geral ..... 3**

**3. REVISÃO DE LITERATURA ..... 4**

**3.1 Aspectos gerais da bovinocultura de corte ..... 4**

**3.2 Gordura Intramuscular ..... 5**

**3.3 Genes Relacionados ao Marmoreio ..... 7**

**3.4 Genes relacionados à deposição intramuscular de lipídios ..... 10**

**3.5 Expressão gênica ..... 16**

**3.6 Expressão Proteica ..... 17**

**4. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 19**

**4.1 Coleta das amostras ..... 19**

**4.2 Análise de Marmoreio e Lipídios Totais ..... 20**

**5. Análise da Expressão Gênica ..... 21**

**5.1 Escolha dos genes ..... 21**

**5.2 Extração do RNA Total ..... 23**

**5.3 Verificação da concentração e integridade do RNA Total extraído ..... 23**

**5.4 Síntese da primeira fita de cDNA ..... 24**

**6. PCR Quantitativa em Tempo Real ..... 24**

**6.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores ..... 24**

**6.2 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores ..... 27**

**6.3. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR ..... 28**

**6.4 Escolha do Gene de Referência ..... 29**

**6.5 Método do Ct Comparativo (ΔΔ Ct) .....30**

**6.6 Análises Estatísticas.....30**

**7. Espectrometria de Massa.....31**

**7.1 Extração proteica das amostras .....31**

**7.2 Quantificação de Proteínas .....32**

**7.3 Preparação das amostras para análise proteômica .....32**

**7.4 Análise por espectrometria de massas avançada .....33**

**7.5 Análise comparativa e quantificação.....33**

**7.6 Análise de enriquecimento.....33**

**8. RESULTADO E DISCUSSÃO .....34**

**8.1 Expressão Gênica Diferencial.....34**

**9. Proteômica.....43**

**10. CONCLUSÃO .....46**

**11. REFERÊNCIAS.....47**

**12 MATERIAL SUPLEMENTAR.....** Erro! Indicador não definido.

# EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS RELACIONADOS À DEPOSIÇÃO DE GORDURA INTRAMUSCULAR EM BOVINOS NELORE

**Resumo -** Produtos cárneos que contenham propriedades organolépticas específicas e que atendam às exigências dos consumidores, são cada vez mais valorizados no mercado. Apesar da sua importância, as características de qualidade da carne em geral não são consideradas em programas de melhoramento genético animal, em razão do alto custo e dificuldade de mensuração. Marcadores moleculares identificados em análises genômicas, têm sido estudados em rebanhos Nelore. Trabalhos que visam o entendimento da expressão de genes e proteínas envolvidos na determinação de características relacionadas a gordura intramuscular da carne, são realizados com o intuito de auxiliar no entendimento da expressão dos genes relacionados a possíveis biomarcadores. Assim, inúmeros trabalhos que visam avaliar a expressão diferencial de genes podem ser encontrados na literatura, no entanto, devido a divergências entre o manejo e as raças estudadas, os resultados são discordantes, e a validação dos genes mais comumente encontrados, se faz necessário para que essas informações possam ser úteis em programas de melhoramento genético. Assim, este estudo teve como finalidade buscar na literatura genes diferencialmente expressos associados à característica de deposição de gordura intramuscular, avaliada por meio de duas técnicas, e validá-los em uma população de bovinos Nelore com fenótipo extremo para a característica gordura intramuscular por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real. Além disto, foi verificado se os genes diferencialmente expressos estão sendo traduzidos em proteínas diferencialmente expressas, por meio da técnica de espectrometria de massas avançada (LC-MS/MS). Para isso, foram selecionadas 24 amostras divergentes para cada método de avaliação de deposição de gordura. F0oram selecionados 5 genes para o método do escore visual (FABP4, DAGT1, DGAT2, SCD e PPARG) e oito genes para o conteúdo lipídico, medidos pelo método químico (SREBF1, LPL, ACACA, BARX2, EGR1, CDS1, STAT5A e HTATIP2). Foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes *FABP4, DGAT1, DGAT2, BARX2, STAT5A* e *SDC*. Além disso, as proteínas *PRDM1* e *CO1A2*, reguladas pelo fator de transcrição *STAT5A* parecem exercer papel importante no processo de deposição de gordura intramuscular, podendo ser possíveis marcadores moleculares para o melhoramento dessa característica. Em relação às demais proteínas não identificadas em nossos estudos, os resultados sugerem a importância dos mecanismos pós-transcricionais e pós-traducionais na regulação do metabolismo.

**Palavras chave:** Gordura intramuscular, LC-MS/MS, Nelore, qRT-PCR, Validação.

# EXPRESSION OF GENES AND PROTEINS RELATED TO INTRAMUSCULAR FAT DEPOSITION IN NELORE BOVINE

**Abstract:** Meat products with specific organoleptic properties and that attend the requirements of consumers, are increasingly valued in the market. Despite its importance, meat quality traits have not been widely used in animal breeding programs because of the high cost and difficulty of measurement. Molecular markers identified in genomic analyzes have been studied in Nellore herds. Studies aimed at understanding the expression of genes and proteins involved in the determination of characteristics such as intramuscular fat from meat are performed with the aim of helping to understand the expression of the genes related to possible biomarkers. Several studies that aim the expression of differentially expressed genes can be found in the literature, however, because of differences between management and breeds studied the results are discordant, and the validation of the common genes found is necessary for this information to be useful in breeding programs. Thus, this study aimed to search the literature for differentially expressed genes related to the marbling trait, by means of the two techniques for the evaluation of this trait and to validate them in a commercial herd of Nellore cattle, by quantitative real time PCR techniques. Besides that, this study will verify if the differentially expressed genes are being translated into differentially expressed proteins, using advanced mass spectrometry technique (LC-MS/MS). For this, 24 divergent samples were selected for each intramuscular fat deposition evaluation method. Five genes were selected for the marbling, measured by visual score method (FABP4, DAGT1, DGAT2, SCD and PPARG) and eight genes for the lipid content, measured by the chemical method (SREBF1, LPL, ACACA, BARX2, EGR1, CDS1, STAT5A and HTATIP2). Significant differences in expression levels of FABP4, DGAT1, DGAT2, BARX2, STAT5A and SDC were observed. In addition, the PRDM1 and CO1A2 proteins, regulated by the transcription factor STAT5A, seem to play an important role in the intramuscular fat deposition process, and molecular markers may be possible to improve this characteristic. Regarding the other unidentified proteins in our studies, the results suggest the importance of post-transcriptional and post-translational mechanisms in the regulation of metabolism.

**Key words:** Intramuscular fat, LC-MS/MS, Nellore, qRT-PCR, Validation.

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte exerce papel de destaque no cenário econômico mundial. Desde 2004, o Brasil ocupa o cargo de líder global de exportação, canalizando sua produção para mais de 146 países, totalizando 16% da exportação total mundial. No ano de 2018 o rebanho brasileiro chegou ao efetivo de 214 milhões de cabeças, sendo que, em torno de 80% dos animais, são de raça Zebuína (*Bos taurus indicus*). Considerando essa parcela, a raça Nelore totaliza cerca de 90%, com efetivo de 160 milhões de animais (Ferraz & Felício, 2010; Abiec, 2019).

Embora bovinos Nelore produzidos no Brasil têm se destacado em termos de produção de carne, ainda não há seleção intensiva para características relacionadas à qualidade da mesma. O alto teor de gordura intramuscular (marmoreio) tem sido associado à sensibilidade, suculência e satisfação do consumidor (O'Quinn et al.,2012). No mercado de carne bovina existe demanda por carne bovina com baixa gordura e alta qualidade por parte dos consumidores. Além disso, em alguns países, os consumidores têm preferências diferentes do valor do FMI. Por exemplo, os consumidores da Ásia e da América do Norte desejam carne com alto FMI, enquanto os europeus preferem carne magra, com baixo FMI (Hocquette et al., 2014).

Devido à tendência do mercado, a indústria tem procurado ampliar a qualidade da carne bovina, de modo que as exigências dos consumidores sejam atendidas (Scollan et al., 2006).

A gordura intramuscular, ou marmoreio, é um fator essencial na determinação de parâmetros importantes que contribuem para a qualidade da carne, como a suculência e sabor. Além disso, está associada à maciez da carne, uma característica de relevância na determinação de qualidade em sistemas de classificação internacionais (Alves & Mancio, 2007). Outro aspecto no comércio de carne bovina, é que alguns nichos de mercado, preferem carcaças que apresentam alto índice de marmorização, já que essa característica está associada à maior palatabilidade (Shahidi, 2002; Thompson, 2004; Joo et al., 2013), enquanto outros priorizam carnes mais magras. Sendo assim, a gordura intramuscular é um atributo essencial no valor econômico para o produtor no mercado brasileiro de carne bovina, uma vez que agrega valor ao produto.

Embora as características de qualidade da carne tenham grande importância no comércio internacional e serem altamente valorizadas pelo consumidor, não são muito exploradas em programas de melhoramento genético animal devido à sua difícil mensuração e alto custo. Além disso, tais características expressam-se tardiamente na vida do animal, dificultando o processo de melhoramento e, aumentando, consequentemente, o intervalo de gerações (Luchiari Filho, 2000; Tizioto, 2013). Como alternativa, estudos dos genes relacionados à expressão fenotípica dessas características têm sido realizados, principalmente, utilizando as novas tecnologias de análise de alta resolução disponíveis (Cesar et al. 2014; Piorkowska et al., 2015; Silva et al., 2019b).

Os diferentes trabalhos revelam grande divergência entre as listas de genes encontradas, sendo assim, existe dificuldade na determinação de genes que realmente atuam na expressão da característica de interesse (Jeong et al 2013; Cesar et al., 2015; Silva et al., 2019b). Assim, a validação dos genes candidatos encontrados nos diferentes trabalhos, por meio de análise da expressão gênica e proteica, torna-se uma ferramenta fundamental na determinação dos genes que efetivamente atuam na expressão do fenótipo.

Dentre os genes mais encontrados na literatura que, influenciam na deposição de gordura intramuscular estão os genes *FABP4* (Proteína de ligação aos ácidos graxos tipo 4) e *LPL* (Lipoproteína lipase) que parecem contribuir para o armazenamento de gordura entre as fibras musculares, uma vez que estão envolvidos na distribuição de ácidos graxos no tecido muscular (Gerbens, 2004; Wang e Eckel, 2009). O fator de transcrição *PPARG* (Receptor ativado por peroxissoma gamma), desempenha um papel crucial na regulação da adipogênese, ou seja, é essencial na formação de células adiposas (Grindflek et al., 2000).

Os genes *DGAT1* e *DGAT2* (Diacilglicerol O-Aciltransferase 1 e 2), parecem influenciar nas diferenças de síntese e armazenamento de triglicerídeos nos adipócitos, principalmente em animais de produção. O gene *SCD* (Estearoil CoA Dessaturase) atua na conversão de ácidos graxos saturados em monoinsaturados em adipócitos, diminuindo a densidade da gordura e consequentemente contribuindo com maciez e suculência (Ntambi, 1999).

O gene *SREBP1-C* (Proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis 1c), um fator de transcrição de genes lipogênicos, e os genes *ACACA* (Acetil CoA Carboxilase) e *HTATIP2* (Proteína Interativa 2 do HIV-1) parecem atuar na síntese de ácidos graxos em ruminantes (Smith, Witkowki & Joshi, 2003; Zhang et al., 2008). O gene codificador da enzima *CDS1* (Diacilglicerol Síntese 1) desempenha papel chave no metabolismo dos fosfolipídios, no armazenamento lipídico celular e na diferenciação de adipócitos (Qi et al., 2016).

O fator de transcrição *BARX2* (Proteína Homeodomínio BARX2) está envolvido na diferenciação celular, tendo um papel crucial no crescimento, reparo muscular e manutenção muscular (Meech et al., 2012). O Gene *STAT5A* (Sinal transdutor e ativador de transcrição) exerce um papel importante nas células de adiposas, sendo induzido durante o processo de diferenciação de adipócitos (Stephens et al., 1996). A família do gene *EGR1* (Resposta de crescimento precoce 1) parece ter influência na lipogênese, adipogênese, consequentemente influenciando na deposição de gordura (Chakrabarti et al., 2013).

O estudo da expressão gênica diferencial aliado com a proteômica pode auxiliar no entendimento das proteínas envolvidas na expressão das características estudas, além da identificação de possíveis biomarcadores, permitindo prever a capacidade dos animais de produzir carne com qualidades desejáveis.

Desse modo, avaliar genes e proteínas diferencialmente expressos relacionados a gordura intramuscular da carne, em uma população comercial representativa do sistema de criação de bovinos Nelore no Brasil, pode fornecer informações importantes para o avanço das estratégias de seleção para o melhoramento de tal característica, juntamente com os métodos quantitativos de melhoramento animal.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Utilizar uma população comercial de bovinos Nelore para validar genes descritos na literatura, relacionados à conteúdo de lipídios (método químico) e índice de marmorização da carne (método visual), tendo em vista um melhor entendimento

dos mecanismos moleculares envolvidos na expressão dessas características, além de identificar se os genes diferencialmente expressos são traduzidos em proteínas diferencialmente expressas.

### 2.1.1 Objetivo específico

a) Obter na literatura genes comuns em diferentes trabalhos (RNA-Seq, Microarranjo, SNPs, Proteômica, entre outros), relacionados à conteúdo de lipídios e índice de marmorização da carne.

b) Validar por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), genes diferencialmente expressos identificados em trabalhos encontrados na literatura, relacionados às características de índice de marmorização e conteúdo de lipídios, em tecido muscular (*longissimus thoracis*) de uma população de bovinos Nelore pertencentes a um rebanho comercial, representativo do sistema mais comum de criação de bovinos Nelore no Brasil.

c) Verificar, por espectrometria de massas avançada (LC-MS/MS), se os genes diferencialmente expressos, estão sendo traduzidos em proteínas diferencialmente expressas.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Aspectos gerais da bovinocultura de corte

A bovinocultura de corte exerce papel de destaque no cenário econômico mundial. Desde 2004, o Brasil ocupa o cargo de líder global de exportação, canalizando sua produção para mais de 146 países, totalizando 16% da exportação total mundial. No ano de 2018 o rebanho brasileiro chegou ao efetivo de 214 milhões de cabeças, sendo que, em torno de 80% dos animais, são de raça Zebuína (*Bos taurus indicus*). Considerando essa parcela, a raça Nelore totaliza cerca de 90%, com efetivo de 160 milhões de animais (Ferraz & Felício, 2010; Abiec, 2019).

O Nelore (*Bos taurus indicus*), originário da Índia, chegou ao Brasil em meados do século XIX, onde se adaptou muito bem devido a semelhança das condições ambientais locais e as de seu país de origem, ambos caracterizados pelo clima predominantemente tropical (Magnabosco et al., 1997). Esses animais são resistentes ao calor, naturalmente resistentes a parasitas e são capazes de aproveitar pastagens

com baixo valor nutricional. Além disso, as fêmeas apresentam excelente habilidade materna, facilidade de parto e os bezerros apresentam maior rusticidade (Albuquerque; Mercadante; Eler, 2007; Canavez et al, 2012).

Apesar de serem adaptados, os animais de origem *Bos taurus indicus,* apresentam carne mais dura e menor deposição de gordura intramuscular quando comparados aos animais de origem taurina, evidenciando a necessidade de se produzir animais que tenham boa qualidade de carne para atender as exigências do mercado (Shackelford, et al.,1994, Restle et al., 2003, Cundiff, 2004). Sendo assim, a melhoria na qualidade de carne tende a ser um dos focos dos programas de seleção da raça Nelore, por meio da avaliação e seleção genética.

### 3.2 Gordura Intramuscular

De acordo com o local de deposição, a gordura na carcaça pode ser classificada como gordura externa (subcutânea), gordura interna (envolvendo órgão e vísceras), gordura intermuscular (ao redor dos músculos) e gordura intramuscular (entremeada às fibras musculares). O termo marmorização refere-se a gordura entremeada caracterizada por manchas brancas ou estrias de tecido adiposo, que não podem ser separadas da carne (Harper et al., 2004). A gordura intramuscular é uma característica poligênica regulada por diversos mecanismos envolvidos diretamente ou indiretamente na adipogênese e no metabolismo de gordura (Michael et al., 2006). A deposição de gordura pode variar de acordo com a raça, nutrição, sexo, idade e vários outros fatores em um animal (Rule et al., 1997).

O mercado de carne busca cada vez mais fornecer ao consumidor carnes com alta qualidade e de alto valor nutricional. O marmoreio é um critério importante na compra por parte do consumidor, uma vez que tem influência positiva na qualidade da carne, devido as características sensoriais como, sabor e maciez. Estas características sensoriais podem ser percebidas pelo consumidor, pois garantem a sensação de suculência da carne à mastigação. Além disso, a gordura intramuscular também está associado à saúde humana, devido ao seu valor nutricional (Alves & Mancio, 2007; Wood et al., 2008; Da Costa et al., 2013; Pickworth et al., 2011).

Alguns nichos de mercado preferem carcaças que apresentam alto índice de marmorização. Nos países Asiáticos e na América do Norte, por exemplo, o marmoreio é considerado um critério de qualidade na classificação da carne, com o

intuito de diferenciar os produtos de carne bovina *in natura*, e consequentemente, agregar valor ao produto (Shahidi, 2002; Thompson, 2004; Joo et al., 2013; Hocchette et al., 2014).

No mercado de carne bovina, no qual o Brasil tem importante papel de exportador, o marmoreio pode ser responsável pela entrada da carne brasileira em novos nichos de mercado, trazendo uma maior rentabilidade ao produtor (Paz e Lucchiari FIlho, 2000).

Embora a característica de marmoreio da carne tenha grande impacto no comércio internacional e seja altamente valorizada pelo consumidor, a viabilidade de sua inclusão em programas de melhoramento genético animal é comprometida por somente poder ser mensurada após o abate do animal ou por ultrassonografia, o que consequentemente, dificulta e encarece o processo (Lucchiari Filho, 2000; Tizioto, 2013). Além disso, o marmoreio é conhecido como uma característica avaliada tardiamente na vida do animal, e como resultado, se tem o aumento do intervalo de gerações.

A gordura intramuscular, geralmente medida no músculo *longissimus thoracis*, é frequentemente avaliada subjetivamente por inspeção visual de uma seção transversal de músculo, chamado de escore de marmoreio, ou mensurada de forma objetiva por meio de análise química (Marshall, 1999; Bertrand et al, 2001).

A avaliação por inspeção visual é realizada por meio de uma escala desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – Quality and Yield Grade, 2000), que varia de zero a 10, na qual, zero representa gordura intramuscular ausente e 10 representa gordura intramuscular muito abundante. Com a análise química, desenvolvida por Bligh e Dyer (1959), é possível obter de forma quantitativa a proporção lipídica intramuscular. Ambos os métodos apresentam vantagens, como a maior precisão do método químico, ou facilidade de análise e o baixo custo da avaliação visual, e são amplamente utilizados em programas que visam o melhoramento da qualidade da carne em todo o mundo.

## 3.3 Genes Relacionados ao Marmoreio

### 3.3.1 Receptor ativado por peroxissoma gamma (*PPARG*)

Os receptores ativados por peroxissoma (*PPARs*) são uma família de receptores, que influenciados por ácidos graxos, desempenham funções importantes na regulação do metabolismo de nutrientes e homeostase energética (Lemay et al.,2006). Os *PPARs*, assim como vários receptores hormonais nucleares, são regulados por fosforilação. Basicamente existem três membros da família PPAR, *PPARA, PPARG* e *PPARB,* que se diferenciam pelo tecido alvo, propriedades fisiológicas e por estágios de desenvolvimento do tecido (Berger et al., 2002).

O *PPARG* é um fator de transcrição que regula o metabolismo lipídico e glicose em mamíferos e pode ser expresso em muitos tipos de células, incluindo adipócitos, células epiteliais, células do músculo liso das células endoteliais, entre outros (Spiegelman et al., 1997; Clark et al., 2000; Law et al., 2000). Pesquisas anteriores demonstraram que o *PPARG* é expresso em bovinos principalmente no tecido adiposo, especificamente nos adipócitos, e desempenha um papel crucial na regulação da adipogênese, no balanço energético e na biossíntese de lipídios, sendo importante fator de transcrição para deposição de gordura intramuscular (Chawla et al., 1994; Kliewer et al., 1997; Medina-Gomez et al., 2007; Grindflek et al., 2000; Lim et al., 2011; Bionaz et al., 2013).

O *PPARG* é responsável direto por regular a expressão de vários genes que codificam proteínas envolvidas na diferenciação de adipócitos e deposição de gordura (Grindflek et al., 2000), como a lipoproteína lipase (*LPL*), a proteína de transporte de ácidos graxos (*FABP*) e a acetil-coenzima A carboxilase (*ACACA*), está relacionada à captação de ácidos graxos circulantes pelos adipócitos (Schoonjans et al., 1996; Frohnert et al., 1999).

### 3.3.2 Proteína de ligação aos ácidos graxos tipo 4 (FABP4)

A família de proteínas de ligação aos ácidos graxos (FABPs) são expressas em todos os órgãos e tecidos envolvidos no metabolismo de gordura, e apresentam uma distribuição celular e tecidual característica, sendo conhecidas como transportadoras de nutrientes cruciais no controle do direcionamento de energia (Veerkamp et al., 1993; Glatz et al., 1993). As FABPs se ligam a compostos hidrofóbicos como os ácidos

graxos, mas possuem diferentes estruturas, distribuição tecidual e especificidade de ligação.

A proteína de ligação aos ácidos graxos tipo 4 (FABP-A ou FABP4), está envolvida no direcionamento intracelular de ácidos graxos, no transporte e no metabolismo de lipídios (Kaikaus et al., 1990), e é expressa principalmente em adipócitos (Matarese & Bernlohr, 1988). No transporte de ácidos graxos, a FABP4, presente no tecido adiposo de animais domésticos, está relacionada ao efluxo e influxo de ácidos graxos no adipócito, devido às condições anabólicas e catabólicas, respectivamente (Hertzel et al., 2006; Shen et al., 1999; Vural et al., 2008). No metabolismo energético do músculo, a FABP4 contribui para o armazenamento de gordura entre as fibras musculares, direcionando ácidos graxos de cadeia longa para a oxidação ou esterificação nas mitocôndrias e nos peroxissomos (Brandstetter et al., 2002; Gerbens, 2004).

A gordura intramuscular é resposta do equilíbrio entre síntese e degradação de triacilgliceróis, como consequência, muitas vias metabólicas dos adipócitos podem cooperar para a diferenciação do teor do marmoreio, incluindo transporte intracelular de ácidos graxos pela FABP4 (Hocquette et al., 1998). A importância da FABP4 para a deposição de gordura intramuscular ou escores de marmoreio foram observadas em vários estudos (Wang et al., 2005; Lee et al., 2008; Pannier et al., 2010; Pickworth et al., 2011; Lee et al., 2013b; Wang et al., 2015).

### 3.3.3 Estearoil CoA Dessaturase (SCD)

A Estearoil CoA Dessaturase (*SCD*) é uma enzima do retículo endoplasmático (ER), e está associada ao aumento do acúmulo de gordura e na conversão de ácidos graxos saturados em monoinsaturados no músculo esquelético (Ntambi, 1999).

A *SCD* é uma enzima lipogênica central que catalisa a síntese de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), que são componentes de triglicérides, cerídeos, ésteres de colesterol e fosfolipídios de membrana (Miyazaki & Ntambi, 2004; Man et al., 2006). Este gene é altamente expresso no tecido adiposo branco, bem como no tecido adiposo marrom sob condições dietéticas normais (Jang et al., 2008). Lee et al. (2011), encontraram no tecido adiposo subcutâneo maior expressão do gene *SCD* em relação ao tecido intramuscular. Archibeque et al. (2005), encontraram resultados

semelhantes ao observar que tecido adiposo subcutâneo possui o dobro de quantidade de mRNA transcrito a partir do gene *SCD,* em relação ao tecido adiposo intramuscular.

A MUFA sintetizada a partir da ação da enzima SCD, segundo Zembayashi et al. (1995), influencia no ponto de fusão da gordura, assim como o perfil de ácidos graxos, que estão positivamente correlacionados com a qualidade da carne e com o conteúdo de gordura intramuscular ou marmoreio em bovinos JB (Japanese Black) e Coreanos (Oka et al., 2002; Jeong et al., 2012).

Sendo assim, o gene *SCD* pode ser particularmente interessante para a melhoria da qualidade da gordura de produtos alimentícios cárneos e para suas implicações na saúde humana.

### 3.3.4 Diacilglicerol O-Aciltransferase 1 (*DGAT1*) e Diacilglicerol O-Aciltransferase 2 (*DGAT2*)

No tecido adiposo, a diacilglicerol aciltransferase (DGAT), por meio da catalização pelas enzimas acil-CoA, é responsável pela biossíntese do triacilglicerol (TAG), principal molécula de armazenamento de energia metabólica realizada nos adipócitos (Cases et al., 1998). Pertencentes à família DGAT, as enzimas DGAT1 e DGAT2, embora catalisem a mesma reação na síntese de TAG, são diferenciadas funcionalmente por regulação (Kelley et al. 2002; Meegalla et al. 2002).

O DGAT1, é membro de uma grande família de O-aciltransferases ligadas à membrana (Yu e Ginsberg, 2004). Este gene (*DGAT1*) é amplamente expresso em todos os tecidos, porém sua expressão é maior em tecidos ou órgãos onde a síntese de triglicérides é mais ativa, ou seja, tecido adiposo branco, intestino delgado e fígado (Li et al., 2013a). Estudos demonstram que o gene *DGAT1* apresenta associação significativa com as características relacionadas à deposição de gordura, como espessura de gordura e marmoreio da carne bovina (Thaller et al., 2003; Tantia et al., 2006; Pannier et al., 2010; Li et al., 2013b).

O gene *DGAT2* tem influenciado nas diferenças de síntese e armazenamento de triglicerídeos, principalmente em animais de produção (Winter et al., 2005), consequentemente, o *DGAT2* é expresso principalmente em tecidos que sintetizam grandes quantidades de ácido graxos como, por exemplo, tecido adiposo, músculo,

fígado e outros (Yamashita et al., 2014). Segundo Bakhtiarizadeh et al. (2013), o gene *DGAT2* se encontra entre os 10 genes mais abundantes no tecido adiposo em mamíferos. Jeong et al. (2012), em estudos com tecido de músculo *longissimus* em bovinos Coreanos, relataram que a maior expressão do gene *DGAT2* está relacionada ao aumento da gordura intramuscular, além disso, esse gene parece ter um papel crucial no acúmulo de ácidos graxos durante a fase de terminação de bovinos.

## 3.4 Genes relacionados à deposição intramuscular de lipídios

### 3.4.1 Lipoproteína lipase (*LPL*)

A lipoproteína lipase (LPL) desempenha um papel importante no metabolismo e transporte de lipídios. Esta enzima basicamente hidrolisa triglicerídeos em monoacilglicerol (molécula de ácido graxo + glicerol), tendo importância em tecidos de animais para produção de carne, por controlar a distribuição dos ácidos graxos e lipoproteínas entre o tecido adiposo e muscular (Hocquette & Bauchart, 1999; Wang e Eckel, 2009).

A atividade da enzima *LPL* foi identificada em uma ampla variedade de tecidos e células extra-hepáticas, incluindo tecido adiposo, coração, músculo esquelético, pulmão, glândula mamária lactante, cérebro, rim e macrófagos (Kirchgessner et al., 1989). De acordo com alguns autores, apesar dos mRNAs da *LPL* estarem presentes no tecido adiposo e no músculo esquelético, seus níveis são muito maiores no tecido adiposo. Estudos relatam que essa diferença pode ser até 15 vezes maior em comparação com o músculo esquelético (Goldberg & Markel, 2001). Vários estudos genéticos encontraram associação da *LPL* com a gordura intramuscular em bovinos (De Jager et al.,2013; Lee et al., 2013b; Zhang et al., 2017).

### 3.4.2 Acetil CoA Carboxilase (*ACACA*)

A enzima lipogênica Acetil-CoA carboxilase-α (ACACA) está associada a síntese de lipídios em ruminantes e é considerada uma enzima regulatória, uma vez que a mudança na sua atividade influencia na taxa de síntese de ácidos graxos, promovida pela ativação do *ACACA,* por meio da via da insulina (Saltiel e Kahn, 2001; Smith; Witkowki; Joshi, 2003). Esta enzima é altamente expressa em tecidos lipogênicos,

como tecidos adiposos, glândula mamária em lactação e fígado (Ponce-Castaneda et al., 1991; Abu-Elheiga et al., 1995).

A enzima ACACA é responsável por catalisar a carboxilação de acetil-CoA e malonil-CoA, que por sua vez, atua no controle da síntese e oxidação de ácidos graxos em respostas as mudanças na dieta. Sendo assim, a atividade da *ACACA* é responsável pela regulação da homeostase energética em animais e desemprenha um papel crucial na deposição de lipídios em diferentes compartimentos, por meio do seu produto (Rollin et al, 2003).

Em mamíferos, a ACACA é influenciada por hormônios, dieta e fatores fisiológicos (Kim, 1997). A ingestão de alimentos que contenham baixo teor de lipídios, induz a síntese de ACACA e, como consequência, há o aumento da sua atividade (Abu-Elheiga et al., 2001).

Estudos realizados em bovinos no músculo *longissimus thoracis* encontraram associação da expressão do gene *ACACA* para características relacionadas a deposição de lipídios (Zhang et al., 2010b; Zhang et al., 2017).

### 3.4.3 Proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis (*SREBPs*)

As proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis (SREBPs) desempenham um papel central na homeostase energética, promovendo a glicólise, a síntese lipídica a partir da glicose (lipogênese) e a adipogênese (Zhang et al., 2008).

Existem três membros, intimamente relacionados, da família de SREBP em mamíferos: *SREBP-1a, SREBP-1c e SREBP-2*. O *SREBP-1* ou SREPBF1, a forma mais abundante entre as *SREBPs* no tecido adiposo, é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes lipogênicos, incluindo *ACACA*, *DGAT1 e SCD* (Yin et al., 2002; Doran et al., 2006; Man et al., 2006). Já a *SREBP-2* influencia na regulação na síntese e absorção de colesterol (Goldstein et al., 2006).

A expressão do SREBP é transcricionalmente controlada por vários fatores nutricionais e hormonais, sendo a insulina um dos ativadores mais potentes (Hegarty et al., 2005; Yellaturu et al., 2009). Estudos relatam que o gene SREBP possui correlação positiva ao conteúdo de gordura intramuscular em bovinos. Yang et al. (2017), manipulando a energia da dieta em bovinos Yaks (*Bos grunniens*), com o

propósito de aumento no conteúdo de gordura intramuscular, observaram correlação positiva do SREBP com o aumento de gordura intramuscular. Estudo com SNPs tem associado o gene SREBP com a deposição de gordura intramuscular em bovinos Hanwoo (*Korean cattle*) (Lee et al., 2013a).

### 3.4.4 Diacilglicerol Síntese 1 (*CDS1*)

A Diacilglicerol Síntese 1 (*CDS1*) é uma proteína de membrana integral localizada no retículo endoplasmático. O *CDS1* é responsável pela codificação da enzima que catalisa a formação de CDP-diacilglicerol (CDP-DAG), a partir do ácido fosfatídico, o precursor de todos os fosfolipídios e da síntese de triacilgliceróis (TAG) (Qi et al., 2016).

A expansão de gotículas lipídicas e a diferenciação de pré-adipócitos são dois aspectos importantes do armazenamento de lipídios em mamíferos. Qi et al. (2016), em seus estudos relizados em células *HeLa*, cultivadas *in vitro,* mostraram o papel da *CDS*, uma enzima chave no metabolismo dos fosfolipídios, no armazenamento lipídico celular, bem como na diferenciação de adipócitos. Eles observaram que *CDS1* está envolvida na regulação da expansão de gotículas lipídicas por meio da regulação do nível de ácido fosfatídico no retículo endoplasmático. A *CDS1*, pode ser essencial para o armazenamento de lipídios em mamíferos.

Em estudo de RNA-seq realizado por Silvan et al. (2019b), em tecido muscular de bovinos Nelore, o gene *CDS1* apresentou maior expressão em animais que continham maior deposição de gordura intramuscular.

### 3.4.5 Proteína Homeodomínio BARX2

O gene *BARX2* codifica um membro da família do fator de transcrição homeobox, que influencia a diferenciação celular em vários contextos de desenvolvimento, tendo um papel crucial no crescimento, reparo muscular e manutenção muscular. A proteína homeobox Barx2 é regulada precocemente durante a diferenciação de mioblastos, e está associada a fatores responsáveis pela regulação muscular, além de promover a proliferação, migração e adesão dessas células de diferenciação (Meech et al., 2003; Makarenkova et al., 2009; Meech et al., 2012).

O *BARX2* pode ser expresso em vários tecidos mesenquimais e epiteliais durante o desenvolvimento, incluindo cartilagem, músculo esquelético e liso, sistema nervoso central e estruturas epiteliais ramificadas, como as glândulas mamária, lacrimal e salivar. No músculo liso e esquelético este gene é regulado positivamente durante a diferenciação dos miotubos esqueléticos (Herring; Kriegel; Hoggatt, 2001; Meech et al., 2003).

Trabalhos de transcriptoma realizados em bovinos da raça Nelore e bubalinos, relatam o gene *BARX2* como diferencialmente expresso para alto conteúdo de gordura intramuscular e rendimento do leite, respectivamente (Silva et al., 2019b; Deng et al., 2019).

### 3.4.6 Resposta de crescimento precoce 1 (ERG1)

Os fatores de transcrição de respostas precoces ao crescimento (EGR) são genes importantes para a indução de programas celulares de diferenciação, proliferação e morte celular em resposta a estímulos ambientais (Thiel et al., 2002; Carter et al., 2007)

O gene *EGR1* é um regulador transcricional importante em diversos tipos de células atuando em resposta a diferentes estímulos. Uma das possíveis formas de induzir a expressão desse gene é por meio da insulina e nutrientes, como por exemplo, dieta ricas em gorduras (Chakrabarti et al.,2013).

A lipólise nos adipócitos representa uma importante fonte de ácidos graxos circulantes. Diversos tecidos como o coração, fígado e músculo esquelético utilizam ácidos graxos como forma de energia em períodos de demanda energética. O fator de transcrição de resposta de crescimento precoce *EGR1,* tem influenciado no controle da lipólise nos adipócitos por meio da inibição da transcrição da lipase triglicerídica adiposa (ATGL). Esta enzima, *ATGL*, catalisa o passo inicial da reação por meio da hidrólise dos triacilgliceróis, com subsequente formação de diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e liberando três ácidos graxos livres para re-esterificação ou para a circulação sanguínea. Sendo assim, a expressão do gene *EGR1* pode influenciar no estoque de triacilgliceróis em adipócitos, diminuindo os níveis de ATGL, nos períodos em que a oferta de alimento é abundante e rica em lipídios (Chakrabarti et al.,2013).

Os alvos específicos dos fatores de transcrição *EGR* são desconhecidos, no entanto, esta família tem sido implicada na adipogênese e a biossíntese do colesterol. Além disso, o gene *EGR1* também parece estar envolvido na diferenciação de células satélites derivadas do músculo esquelético bovino (Boyle et al, 2009; Shen et al., 2011; Zhang et al., 2018).

### 3.4.7 Sinal transdutor e ativador de transcrição (*STAT5A*)

Em mamíferos, as proteínas STAT (sinal de transdutores e ativadoras de transcrição) pertencentes a uma família de fatores de transcrição citoplasmáticos que mediam as ações de muitos hormônios peptídicos, esteróides e citocinas, além de estarem envolvidas com crescimento e divisão celular, apoptose e inflamação (Stoecklin et al 1999). As STATs podem ser rapidamente ativadas para regular a expressão gênica por meio da fosforilação da tirosina, em resposta à diferentes estímulos, e translocam-se para o núcleo da célula onde atuam como ativadores da transcrição (Floyd et al., 2003). As STATs podem ser rapidamente ativados para regular a expressão gênica e representam um paradigma relativamente inexplorado na regulação transcricional das células adiposas (Darnell, 1997).

Vários trabalhos demonstraram que as proteínas STAT5 são ativadas e induzidas durante a adipogênese e desempenham um papel importante no desenvolvimento do tecido adiposo (Stephens et al., 1996; Teglund et al., 1998; Stewart et al., 1999; Kawai et al., 2007). Além disso, esses ativadores de transcrição desempenham papel crucial na regulação da produção da proteína em bovinos leiteiros. Estes fatores, se ligam a sequências específicas localizadas nos promotores dos genes responsáveis pela produção da proteína e ativam a transcrição. Portanto, é sugerido que esse gene também tenha influência no aumento do rendimento da quantidade de proteína do leite (Brym et al., 2004).

Estudo de expressão gênica global realizado em tecido muscular de bovinos Nelore, observou o gene *STAT5A* como diferencialmente expresso em animais que apresentavam alto conteúdo de gordura intramuscular (Cesar et al., 2015).

### 3.4.8 Proteína Interativa 2 do HIV-1 (HTATIP2)

O *HTATIP2*, também conhecido como *TIP30* ou *CC3* desempenha um papel inibitório na regulação da importação nuclear, e pode funcionar como um regulador negativo, competindo com substratos de importação nuclear para ligação de receptores de transporte nuclear (Ito et al., 2003).

O papel inibitório do produto do gene *HTATIP2,* pode facilitar sua ação como um repressor tumoral, devido a sua regulação negativa estar associada ao desenvolvimento de vários tipos de câncer ou à indução de metástases agressivas (Shtivelman, 1997; Xiao et al., 1998; King & Shtivelman, 2004; Zhao et al., 2007; Kavanagh et al., 2008).

Embora a função celular especifica do *HTATIP2* permaneça desconhecida, sua ação está envolvida na adaptação metabólica às alterações na disponibilidade de glicose. O silenciamento da expressão de *HTATIP2* em células tumorais, como a MCF-7, que apresentam altos níveis de glicólise e respiração mitocondrial, melhora a flexibilidade metabólica, ou seja, aumenta a atividade mitocondrial para produzir energia e atender à necessidade de sobrevivência e proliferação celular durante a restrição de glicose (Chen e Shtivelman, 2010).

Estudos em camundongos observaram que o *HTATIP2* está envolvido no metabolismo lipídico sendo responsável pela partição entre armazenamento lipídico e oxidação. Este gene parece influenciar na síntese de ácidos graxos em hepatócitos, assim como nas células, reduzindo a oxidação de ácidos graxos e, o silenciamento da expressão de *HTATIP2* estimula o uso de substratos, como ácidos graxos e aminoácidos (Liao et al., 2014).

Zhang et al. (2011), observaram que o *HTATIP2* forma um complexo com acil-CoA sintase de cadeia longa 4 (Acsl4), necessário para a fusão da membrana da vesícula celular. Embora a significância desta interação para o metabolismo lipídico não seja clara, a Acsl4 desempenha um papel crítico na oxidação de ácidos graxos e na biossíntese de lipídios (Killion et al., 2018).

Estudo genômico recente, realizado em camundongos, descreveu o gene *HTATIP2* como candidato na regulação do ganho de peso, gordura e controle glicêmico associado ao metabolismo de zinco. Os autores relatam que a anulação do transportador de zinco 7 (*znT7.*-KO) em camundongos, acompanhada da expressão

reduzida de *HTATIP2* podem exercer um efeito sinérgico sobre o metabolismo lipídico no tecido adiposo, determinado um fenótipo magro aos camundongos. No entanto, o mecanismo subjacente a este fenótipo não é atualmente entendido e merece estudos adicionais (Huang et al., 2019).

Estudo de transcriptoma realizados em bovinos Nelore divergentes para a característica de conteúdo de gordura intramuscular relatou o gene *HTATIP2* como diferencialmente expresso em animais que apresentavam alto conteúdo de gordura intramuscular (Cesar et al., 2015).

### 3.5 Expressão gênica

As análises de expressão gênica, atualmente, são realizadas por várias técnicas que visam a identificação global dos transcritos dentro da célula estudada, dentre elas, o método do microarranjo é responsável por determinar os níveis de expressão de milhares de genes ao mesmo tempo (Schena et al., 1995; Tang et al., 2011). Outra técnica muito utilizada recentemente, é o RNA-Seq, devido sua alta sensibilidade na detecção de novos transcritos e identificação de diferentes isoformas, além de identificar polimorfismos de forma eficaz e com baixo custo (Marioni et al., 2008; Cánovas et al., 2010). Estas técnicas colaboram para a identificação global de genes diferencialmente expressos em diversas espécies relacionadas às características de qualidade da carne (Piorkowska et al., 2015; Molik e Gurgul, 2015; Fonseca et al., 2017).

Atualmente, para quantificação dos níveis de transcritos de mRNA, o método da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), é o mais eficiente devido à sua acurácia, sensibilidade e reprodutibilidade (Nygard et al., 2007). Ao contrário do RNA-Seq e microarranjo, que visam a análise global dos transcritos, esta técnica é gene específica e pode ser utilizada na validação de genes encontrados a partir de outras técnicas de análise da expressão gênica global (Yuan et al., 2006), além de ser uma das metodologias mais utilizadas para investigação da expressão gênica em laboratórios de biotecnologia (Regitano & Coutinho, 2001).

A qRT-PCR permite a amplificação e quantificação simultâneas dos ácidos nucleicos, permitindo que cada ciclo seja monitorado durante a fase exponencial da reação, e assim, pode-se determinar a quantidade inicial do alvo com maior precisão

(Ahmed, 2002). O *Cycle Threshold* (CT) é o ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, ou seja, é neste ponto que é possível a quantificação exata e reprodutível baseada na emissão da fluorescência (Novais; Pires-Alves, 2004). No decorrer da amplificação, quanto mais rápido o sinal fluorescente atinge o CT na fase exponencial da reação, maior é a quantidade da sequência-alvo na amostra original, permitindo, deste modo, a quantificação (Valasek e Repa, 2005).

A qRT-PCR é uma técnica altamente sensível, que permite a quantificação de transcritos raros e pequenas alterações no padrão da expressão gênica (Pfaffl, 2001), e que apresenta ainda muitos benefícios em relação a outros métodos de quantificação da expressão gênica, dos quais se destacam, por exemplo, a possibilidade de detecção de uma única cópia de um transcrito específico e não requer manipulação pós-amplificação (Wong e Medrano, 2005).

Dessa forma, a análise de expressão de genes usando qRT-PCR se tornou importante em pesquisas que envolvem o metabolismo animal, uma vez que é considerada uma poderosa ferramenta na quantificação da expressão gênica, sendo importante para a identificação de regiões do genoma que influenciam as características de importância econômica em bovinos (Livak; Schmittgen, 2001; Ahn et al., 2014; Fonseca et al., 2015; Huang et al., 2017; Schering et al., 2017).

### 3.6 Expressão Proteica

A proteômica é uma área de pesquisa que envolve a análise global de proteínas celulares usando várias tecnologias, como eletroforese em gel bidimensional (2-DE) e espectrometria de massa, podendo compor diversas áreas do conhecimento, com o objetivo de analisar os sistemas biológicos (Espindola et al., 2010).

A proteômica está relacionada a um conjunto de tecnologias, com objetivo separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas, desde organelas subcelulares, até ecossistemas (Isfor et al., 2002; Valledor e Jorrin, 2011).

As proteínas controlam grande parte dos diversos processos celulares, podendo atuar na forma de enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (Aebersold e Mann, 2003). Entretanto, nenhuma das técnicas existentes é completamente capaz de quantificar todas as proteínas presentes em um

determinado tecido ou extrato. A eficiência da técnica dependerá não somente das propriedades do material e do objetivo do estudo, mas também de fatores que podem prejudicar a identificação de proteínas como, a abundância de proteínas e o nível de expressão (Lippolis e Reinhardt, 2008).

As metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas, de modo geral, nos tipos *bottom-up* ou *top-down*. O *bottom-up*, também conhecido como *shotgun*, inclui separação dos peptídeos obtidos após digestão das soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massas (MS). O *top-down*, diferentemente, é um procedimento no qual as proteínas intactas, e não os peptídeos, são submetidas à análise por MS. As abordagens *bottom-up* possuem muitas vantagens, como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos (Barbosa et al., 2012).

A MS é utilizada quando o objetivo final é a identificação da proteína, quantificação ou determinação estrutural. Neste caso, são necessárias algumas etapas prévias que incluem redução e alquilação das proteínas, a digestão enzimática das proteínas, geralmente com tripsina, em peptídeos, seguido de um processo *clean up/desalting* das amostras, ou seja, uma purificação dos peptídeos. A MS é um dos mais modernos métodos para a identificação de proteínas, uma vez que, oferece alta sensibilidade e capacidade para identificação de proteínas de alto rendimento, sem requerer um conhecimento prévio da existência de uma proteína em uma amostra, como exigido, por exemplo, na técnica de *Western blot*. Além disso a MS requer quantidades menores de material e tem uma eficiência maior quando comparada a outros métodos convencionais (Aebersold e Mann, 200 Aebersold e Mann., 20033; Colantonio e Chan, 2005).

A cromatografia líquida seguida por espectrometria de massa (LC-MS) é uma técnica química analítica que combina as capacidades de separação física de cromatografia líquida (ou HPLC) com as capacidades de análise de massa/carga da espectrometria de massas (MS). Enquanto a cromatografia líquida separa misturas com múltiplos componentes, a espectrometria de massa fornece identidade estrutural dos componentes individuais com alta especificidade molecular e sensibilidade de detecção. O método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) é a conexão de dois MS em série,

e é capaz de fornecer informação sobre a sequência de aminoácidos nos fragmentos peptídicos da proteína original. O primeiro MS fornece informações de massa sobre cada peptídeo tríptico e o segundo MS desintegra cada peptídeo e fornece uma medida dependente de tempo e massa que é usada para determinar o aminoácido que foi removido e, desse modo, informar a sequência de aminoácidos para cada peptídeo (Jamesdaniel et al., 2009). Os espectros MS e MS/MS são adquiridos e armazenados para correspondência utilizando bases de dados de sequências de proteínas, e o resultado é a identificação dos peptídeos e, consequentemente, das proteínas (Aebersold e Mann., 2003).

Dessa forma, a proteômica pode contribuir para a identificação de possíveis marcadores, conjuntamente às técnicas genômicas e transcriptômicas e, proporcionar melhor conhecimento dos mecanismos que controlam o metabolismo lipídico e qualidade da carne.

Uma vez que o produto final da expressão gênica são proteínas, este estudo pode fornecer informações sobre as modificações pós-traducionais ocasionadas nessas moléculas (Salvato & Carvalho, 2010). Diversos estudos proteômicos vêm sendo realizados com o intuito de melhorar a qualidade da carne (Bouley et al 2004; Shen et al., 2012; Zhou et al., 2019).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das amostras

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal-SP (nº005622/17). Os animais utilizados para o experimento (n=189) pertenciam à fazenda São Marcelo, membro do programa de Melhoramento Genético animal *Cia do Melhoramento*, localizada no município de Tangará da Serra, MT. Os bovinos da raça Nelore, com idade média de 24 meses, são oriundos do mesmo grupo de contemporâneos e foram criados em pastagens e mantidos em confinamento, para terminação, sob condições idênticas de nutrição por um período máximo de 100 dias antes do abate. O abate foi realizado em planta frigorífica comercial de acordo com o artigo nº 110 do RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil 1968).

Durante a esfola, foram coletadas amostras de tecido muscular (*longissimus thoracis*) para extração de RNA total e análise de espectrometria de massa. As amostram foram acondicionadas em tubo falcon estéril, contendo solução estabilizadora (RNA later - BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente congeladas a -80 °C. Após 24 horas de resfriamento da carcaça, entre 0 a 4°C, durante o processo de corte e desossa, foram separadas amostras de tecido muscular (*longissimus thoracis)* na região entre a 12ª e a 13ª costela de cada meia carcaça esquerda para as análises de marmoreio e lipídios totais.

**4.2 Análise de Marmoreio e Lipídios Totais**

A análise de marmoreio foi realizada por meio da classificação visual, usando o *Quality and Yield Grade* (2000) do USDA, que varia de 0 a 10, onde 0 = ausente, 1 = praticamente desprovido; 2 = traços; 3 = ligeiro; 4 = pequeno; 5 = modesto; 6 = moderado; 7 = ligeiramente abundante; 8 = moderadamente abundante; 9 = abundante, e 10 = muito abundante. Os lipídios totais das amostras foram quantificados conforme o método de Bligh e Dyer (1959). As amostras de carne do músculo *Longissimus thoracis* com aproximadamente 3,0 g foram transferidos para um erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Após a homogeneização das amostras com bastões de vidro, os frascos foram colocados em uma mesa horizontal de agitação (HITACHI Micro Centrífuga de Alta Velocidade modelo CF16RN himac) por 30 min. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução aquosa de sulfato de sódio a 1,5% e as amostras foram agitadas por mais dois minutos, transferidas para tubos de falcão de 50 mL e então centrifugadas a 1.000 × g por dois minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o restante foi passado através de papel de filtro para separar os fragmentos de carne da solução que continha os lipídios extraídos. As amostras foram filtradas em cilindros de medição de 25 mL. O valor do filtrado foi mantido para ser utilizado no cálculo do lipídio total e 5 mL foram transferidos para um béquer pré-pesado de 50 mL, seco em estufa, resfriado em dessecador por pelo menos 24 h, colocado em estufa a 110 ° C até evaporação completa do solvente, resfriada num exsicador (O / N) e pesada novamente. As diferenças no peso inicial do copo (sem

amostra) e peso final (com amostra após evaporação completa do solvente) foram usadas para determinar a concentração lipídica total das amostras.

Após a obtenção dos resultados, os fenótipos dos animais utilizados no experimento, foram pré-corrigidos para os efeitos fixos de grupo de contemporâneos e a covariável idade do animal ao abate, uma vez que os animais foram abatidos em dias diferentes. Os GC foram definidos como safra e fazenda ao nascimento e grupo de manejo e fazenda ao sobreano. As soluções dos efeitos fixos foram obtidas utilizando um banco de dados com 3755 e 4855 animais para marmoreio e conteúdo de lipídios, respectivamente. Foi utilizado um modelo animal uni-característica por meio do *software* AIREMLF90 (Misztal et al., 2014). O modelo na forma matricial é representado como:

$$y = X\beta + Zu + e,$$

onde **y** é o vetor de observações (marmoreio ou lipídios), **β** é o vetor dos efeitos sistemáticos (GC e idade ao abate), **u** é o vetor dos efeitos genéticos aditivos aleatórios, **e** é o vetor dos efeitos residuais aleatórios e **X** e **Z** são matrizes de incidências conhecidas que associam **β** e **u**, respectivamente, a **y**.

Após as análises de correções para os efeitos fixos foram identificados dois grupos de animais (12 por grupo), com fenótipos extremos para cada uma das características, que foram utilizadas nas análises de expressão gênica e proteica diferencial (Tabela 1).

**Tabela 1:** Número de animais (N), médias ajustadas, desvios-padrão (DP), valores mínimos e máximos para marmoreio (Escore) e lipídios totais (%) de amostras musculares de bovinos Nelore com caraterísticas extremas para qualidade de carne.

| | N | MÉDIAS | DP | MÍNIMOS | MÁXIMOS | P-VALOR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Marmoreio Alto** | 12 | 4,00 | 0,27 | 3,60 | 4,40 | <0,01 |
| **Marmoreio Baixo** | 12 | 1,90 | 0,18 | 1,70 | 2,10 | |
| | | | | | | |
| **Lipídios Alto** | 12 | 1,19 | 0,11 | 1,04 | 1,35 | <0,01 |
| **Lipídios Baixo** | 12 | 0,50 | 0,03 | 0,44 | 0,57 | |

## 5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 5.1 Escolha dos genes

Por meio de uma revisão de literatura aprofundada dos trabalhos publicados em periódicos, foram selecionados os genes encontrados com maior frequência entre os

estudos, relacionados à análise de marmoreio por meio de escore visual e conteúdo de lipídios. Os genes selecionados foram: *FABP4, SCD, DGAT1, DGAT2 e PPARG* para marmoreio e *SREBF1, LPL, ACACA, BARX2, EGR1, CDS1, STAT5A* e *HTATIP2* para conteúdo de lipídios (Tabela 2 e 3, respectivamente).

**Tabela 2:** Genes diferencialmente expressos para marmoreio relatados em diversos trabalhos na literatura e seus respectivos autores.

| Gene | Autor | Método | Raça |
|---|---|---|---|
| ***FABP4*** | Komolka et al., 2016 | Microarray | Charolais x Holstein |
| | Lee et al., 2013b | RNA-Seq | Hanwoo |
| | Li et al., 2018 | RNA-Seq | Xinjiang brown |
| | Wang et al., 2009 | Microarray | Piedmontese x Hereford<br>Wagyu x Hereford |
| | Wang et al., 2005 | Microarray | Japanese Black |
| | De Jager et al., 2013 | Microarray | Piedmontese x Hereford<br>Wagyu x Hereford |
| ***SCD*** | Chen et al., 2015 | RNA-Seq | Fuzhou Yellow × Limousine × Wagyu |
| | Komolka et al., 2016 | Microarray | Charolais x Holstein |
| | De Jager et al., 2013 | Microarray | Piedmontese x Hereford<br>Wagyu x Hereford |
| | Li et al., 2018 | RNA-Seq | Xinjiang brown |
| | Wang et al., 2005 | Microarray | Japanese Black |
| | Wang et al., 2009 | Microarray | Piedmontese x Hereford<br>Wagyu x Hereford |
| ***DGAT1*** | Lee et al., 2013b | RNA-Seq | Hanwoo |
| | Pannier et al., 2010 | Genotipagem[1] | Diversas raças *Bos Taurus* |
| | Thaller et al., 2003 | PCR-RFLP[2] | Holstein e Charolais |
| ***DGAT2*** | Bong et al., 2010 | SAGE[3] | Korean |
| | De Jager et al., 2013 | Microarray | Piedmontese x Hereford<br>Wagyu x Hereford |
| | Li et al., 2018 | RNA-Seq | Xinjiang brown |
| ***PPARG*** | Lim et al., 2011 | Network[5]/qRT-PCR[4] | Hanwoo |
| | Yang et al., 2017 | qRT-PCR[4] | Gannan yaks |
| | Duarte et al., 2013 | qRT-PCR[4] | Wagyu e Angus |

[1] Genotipagem SNP específico, [2] Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição, [3] Análise em série da expressão genética, [4] PCR em tempo real, [5] Plataforma de análise visual para perfis abrangentes de expressão gênica e meta-análise.

**Tabela 3:** Genes diferencialmente expressos para lipídios totais relatados em diversos trabalhos na literatura e seus respectivos autores.

| Gene | Autor | Método | Raças |
|---|---|---|---|
| ***SREBF1*** | Lee et al., 2013a | RNA-Seq | Hanwoo |
| | Yang et al., 2017 | qRT-PCR[1] | Gannan yaks |
| ***LPL*** | De Jager et al., 2013 | Microarray | Piedmontese x Hereford<br>Wagyu x Hereford |
| | Lee et al., 2013a | RNA-Seq | Hanwoo |
| | Ding et al., 2012 | PCR–SSCP[2] | Wagyu e Angus |
| | Zhang et al., 2017 | RNA-Seq | Qinchuan |
| ***ACACA*** | Zhang et al., 2009 | PCR-RFLP[2] | Piedmontese x Hereford<br>Wagyu x Hereford |
| | Yang et al., 2017 | RNA-Seq | Gannan yaks |
| | Zhang et al., 2017 | RNA-Seq | Qinchuan |
| ***EGR1*** | Silva et al., 2019b | RNA-Seq | Nelore |
| ***BARX2*** | Silva et al., 2019b | RNA-Seq | Nelore |
| ***CDS1*** | Silva et al., 2019b | RNA-Seq | Nelore |
| ***STAT5A*** | Cesar et al., 2015 | RNA-Seq | Nelore |
| ***HTATIP2*** | Cesar et al., 2015 | RNA-Seq | Nelore |

[1] PCR em tempo real, [2]Polimosfismo de conformação de filamento único.

### 5.2 Extração do RNA Total

Para a extração de RNA total das amostras, foram utilizados 50 mg de tecido muscular, anteriormente armazenados em *RNA later* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e um *kit* para extração de RNA, *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), como descrito pelo protocolo do fabricante.

### 5.3 Verificação da concentração e integridade do RNA Total extraído

Por meio da leitura do espectrofotômetro *NanoDrop 1000 Spectrophotomether* (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA, 2007) foi determinada a concentração e a pureza do RNA total nos comprimentos de onda 260nm, 280 nm e 230 nm. Relações 260/280 próximas a 2 indicavam amostras mais puras, enquanto

relações menores poderiam indicar a presença de possíveis contaminantes como proteínas, substâncias residuais do processo de extração dos ácidos nucleicos e entre outros absorvidos no comprimento de 280 nm. A proporção 260/230 foi utilizada como medida secundária de pureza.

As razões estimadas para as amostras estudadas foram próximas a 2 (variando entre 1,8 a 2,1), sendo assim, o RNA extraído foi considerado um material de boa qualidade para continuação do experimento, por não serem detectada evidências de contaminações.

Por meio do aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent, Santa Clara, CA, EUA, 2009), o grau de degradação do RNA total foi avaliado por eletroferograma no qual foram observados os picos referentes ao RNA ribossomal 18S e 28S de cada amostra e o perfil de migração do RNA. Além disso, com o Bioanalyzer, determinou-se o índice RIN (*RNA integrity number*), que varia de 1 a 10 na escala de qualidade, sendo 10 o melhor (SCHROEDER et al., 2006).

Os valores de RIN (*RNA integrity number*) encontrados variaram entre 7,1 e 7,5 (Material suplementar figuras 1 e 2), com média de 7,2, confirmando que as amostras não estavam degradadas e que poderiam ser utilizadas na técnica de qRT-PCR.

A quantificação do RNA e a contaminação por DNA genômico foi determinada com Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 2010). As concentrações de RNA total para ambas características estudadas variaram de 112ng/uL a 703ng/uL. Os valores relativos à contaminação por DNA genômico foram insignificantes, não sendo detectáveis pelo Qubit em todas as amostras.

### 5.4 Síntese da primeira fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o *Kit* SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

## 6. PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

### 6.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados a partir de sequências de nucleotídeos de RNA mensageiro obtidas no RefSeq do *GeneBank*

(htpp://www.ncbi.nlm.nih.gov), para os 13 pares de oligonucleotídeos iniciadores estudados: *FABP4, SCD, DGAT1, DGAT2* e *PPARG* para a característica de marmoreio (Tabela 4) e *SREBF1, LPL, ACACA, BARX2, EGR1, CDS1, STAT5A e HTATIP2* para características de lipídios (Tabela 5). Outros três genes de referência foram escolhidos a fim de normalizar as reações: Beta Actina (*ACTB*), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) e hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) (Tabela 6).

O programa *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2019) foi utilizado para desenhar os iniciadores referentes aos genes alvo e referência. Os iniciadores foram selecionados por seu tamanho, o tamanho do *amplicon*, a proporção de citosina e guanina, *Melting Temperature* – TM e a inexistência de dímeros e *hairpins*. Posteriormente, os fragmentos desenhados foram submetidos ao programa *BLAST* do *NCBI* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), para confirmar similaridade unicamente com o gene de interesse. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6.

**Tabela 4**: Sequência dos oligonucleotideos iniciadores diretos (F) e reversos (R) utilizados na qRT – PCR para os genes alvo para a característica de marmoreio.

| GENE | Número de Acesso (NCBI*) | Sequência (5' – 3') | Tamanho do Amplicon (pb2) | TM do Amplicon (°C) |
|---|---|---|---|---|
| FABP4 F | | CTGCCACCAGAGTTTATGAGAGA | | |
| FABP4 R | NM_174314.2 | ACCAACATAACCATATCAAAATCAG | 54 | 75 |
| SCD F | | TGGTCAGCTCCCCTCATAGTAAG | | |
| SCD R | NM_173959.4 | GCTCACCACCATACCACCAAT | 57 | 78 |
| DGAT1-F | | GGCTCATCTTCTTCTACTGGCTCTT | | |
| DGAT1-R | NM_174693.2 | AACTCGCGGTCTCCAAACTG | 70 | 83 |
| DGAT2-F | | CCGACGCAGCAGGACATC | | |
| DGAT2-R | AY675174.1 | TTGGTCTTATGCTGGTCGAAGA | 61 | 83 |
| PPARG-F | | TCAGCTCCGTGGACCTTTCTAT | | |
| PPARG -R | NM_181024.2 | CGGTGGTGAAGGGCTTGAT | 60 | 82 |

*NCBI: (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/);[1] Temperatura De Melting; [2] Pares de base.

**Tabela 5**: Sequência dos oligonucleotideos iniciadores diretos (F) e reversos(R) utilizados na qRT – PCR para os genes alvo para a característica de lipídios.

| GENE | Número de Acesso (NCBI*) | Sequência (5' – 3') | Tamanho do Amplicon (pb[2]) | TM do Amplicon (°C[1]) |
|---|---|---|---|---|
| EGR1 F | NM_001045875.1 | GACAGCAGCCCCATCTACTCT | 61 | 84 |
| EGR1 R | | CCTTGTGGCTCAGGGAAGA | | |
| LPL F | NM_001075120.1 | TCCTGGAGTGACCGAATCTGT | 59 | 80 |
| LPL R | | TTGGCACCCAACTCTCATACAT | | |
| SREBF1-F | NM_001113302.1 | TTTCTTCGTGGATGGCAACTG | 62 | 85 |
| SREBF1-R | | CAGTGCTCGCTCCAAGAGATG | | |
| BARX2 -F | NM_001101266 | TGGCCTGCTCTTCCTGAAA | 60 | 83 |
| BARX2 -R | | GGCAGTTCCAAGGCACTGT | | |
| ACACA -F | NM_174224.2 | GACTGGGTTGAACGGTTGATG | 59 | 80 |
| ACACA -R | | CTGGCATACTGAGCCATTTCC | | |
| CDS1 -F | NCBI: XM_003586222.4 | CGCCTCTTGGTTGACTTCTC | 59 | 84 |
| CDS1 -R | | TGATGTCCGTGGGTACAGAAC | | |
| STAT5A -F | NM_001012673.1 | CTAAAGCAGTGGACGGATACG | 59 | 82 |
| STAT5A -R | | GCAGAGGCGCTCACAAACT | | |
| HTATIP2 -F | NM_001040563.1 | GTGAATGGCTGGTTAGGAAGTT | 58 | 81 |
| HTATIP2 -R | | CCACAGTTATCACTGGCACAGA | | |

*NCBI: (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/);[1] Temperatura De Melting; [2] Pares de base.

**Tabela 6**: Sequência dos oligonucleotideos iniciadores diretos (F) e reversos(R) utiliza dos na qRT – PCR para os genes de referência

| GENE | Número de Acesso (NCBI*) | Sequência (5' – 3') | Tamanho do Amplicon (pb[2]) | TM do Amplicon (°C[1]) |
|---|---|---|---|---|
| GAPDH-F | | CCGTTCGACAGATAGCCGTAA | | |
| GAPDH-R | NM_001034034 | CGACCTTCACCATCTTGTCTCA | 83 | 69 |
| BACTIN-F | | CAGCAAGCAGGAGTACGATGAG | | |
| BACTIN-R | NM_177945 | AAGGGTGTAACGCAGCTAACAGT | 83 | 85 |
| HPRT1 -F | | TGATGAAGGAGATGGGTGGC | | |
| HPRT1 -R | NM_001034035 | CCAACAGGTCGGCAAAGAAC | 83 | 81 |

*NCBI: (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/);[1] Temperatura De Melting; [2] Pares de base.

### 6.2 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

Todas as reações de qRT - PCR deste trabalho foram realizadas no aparelho *7500 Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), utilizando *kit SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Uma fase referente à curva de dissociação foi incluída em todas as reações para que sejam monitoradas: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 60 °C por 1 minuto, em um total de 40 ciclos. Através do programa *7500 software 2.0.*6 (Applied Biosystems Foster, Ca, USA, 2019) os dados foram analisados.

A determinação da concentração adequada dos oligonucleotídeos nas reações de qRT-PCR foi realizada por meio de diluições, onde as concentrações dos iniciadores diretos e reversos, variaram entre 100/100, 300/300 e 600/600 nanomolar (*forward/reverse*), respectivamente. Todas as reações foram realizadas em triplicatas, em placas de 96 poços seladas com adesivo óptico. Para isso, foram utilizados 100ng do pool de cDNA das amostras de tecido muscular para cada par de iniciadores.

Para a realização da titulação dos oligonucleotídeos iniciadores foram utilizadas nas reações 6,25ul de SYBR Green, 2,75ul de água ultrapura, 1ul de amostra, além de 1,25ul para cada iniciador (*primer*). As melhores concentrações dos *primers* foram estabelecidas por meio da análise da curva de dissociação (derivada negativa da taxa

de fluorescência, - Rn', em função da temperatura de desnaturação) observando a formação de um único pico referente a temperatura de *melting* (TM). Além disso, foram escolhidas as combinações com menores Ct e picos únicos, que indicam a ausência de produtos inespecíficos como dímeros ou *hairpins.*

A partir dos resultados gerados, foi possível estabelecer as melhores concentrações de oligonucleotídeos (Material suplementar figura 3, 4 e 5). Na tabela 7 estão listadas as concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas na amplificação dos genes em estudo.

**Tabela 7.** Melhores concentrações de oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvos (*FABP4, SCD, DGAT1, DGAT2, PPARG, SREBF1, LPL, ACACA, BARX2, EGR1, CDS1, STAT5A* e *HTATIP2*) e dos genes de referência (*GAPDH, ACTB, HPRT1*).

| **Titulação dos Genes:** | **Melhores concentrações de oligonucleotídeos F/R[1] (nM) [2]** |
|---|---|
| **Marmoreio** | |
| *FABP4* | 300/300 |
| *SCD* | 300/300 |
| *DGAT1* | 100/100 |
| *DGAT2* | 100/100 |
| *PPARG* | 100/100 |
| *SREBF1* | 100/100 |
| *LPL* | 100/100 |
| **Conteúdo de lipídios** | |
| *ACACA* | 300/300 |
| *BARX2* | 300/300 |
| *EGR1* | 600/600 |
| *CDS1* | 600/600 |
| *STAT5A* | 600/600 |
| *HTATIP2* | 300/300 |
| *GAPDH* | 300/300 |
| *ACTB* | 300/300 |
| *HPRT1* | 100/100 |

**[1]F:forward (diretos)/R: reverse (reversos); [2]nM: nanoMolar**

### 6.3. Curva padrão e eficiência de amplificação da PCR

Após a melhor concentração dos iniciadores a ser utilizada no experimento ser selecionada, foi realizada a construção da curva padrão para verificação da eficiência

de amplificação, por meio de uma diluição em série (2:1) das amostras de cDNA. Para a realização do cálculo, os valores do *threshold cycle* (Ct) são plotados em função do log da quantidade de molécula alvo. Assim, é obtida uma reta, na qual quanto maior a quantidade inicial de molécula alvo, menor será o valor do Ct. Uma boa reação deve ter uma eficiência entre 90% e 110%, o que corresponde a um coeficiente angular da curva padrão entre -3,58 e -3,10 (Livak e Schmittgen, 2001; Life Technologies, 2016). A eficiência de amplificação deve ser determinada a partir do coeficiente angular da curva padrão, chamado de *slope* (Bustin et al., 2009), por meio da equação:

$$\text{Eficiência da PCR} = 10^{(-1/slope)} - 1$$

Além disso, foram considerados o coeficiente de determinação ($r^2$) maior ou igual a 0,99, podendo assim, garantir uma pequena variação entre as réplicas técnicas, e a especificidade, que foi avaliada pela curva de desnaturação (RIRIE et al., 1997). Todas as amostras foram ensaiadas em 12,0ul de volume final; sendo 6,25 ul de Syber Green PCR Master Mix ®, concentrações do pool cDNA de tecido muscular variando de 6,25ng, 12,5ng, 25ng, 50ng, 100ng, 200ng, 400ng e a concentração ótima do oligonucleotídeos iniciadores determinada. Todos os genes analisados apresentaram eficiência dentro do limiar estabelecido (Material suplementar figura 6 e 7).

### 6.4 Escolha do Gene de Referência

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação a genes chamados de “controles endógenos” ou “genes de referência”. O gene de referência ideal é aquele cuja sua expressão não varia significativamente entre tecidos, estágio de desenvolvimento e tratamentos (Czechowski et al., 2005). Para certificarmos a estabilidade dos genes de referência escolhidos utilizamos o *software Expression Suite Software v1.0* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2019). Os valores correspondentes ao escore de variação menores que 1,5, são considerados satisfatórios (Expression Suite Software Help, 2016). O escore é uma medida de como os valores de Ct (*cycle threshold*) variam em comparação com os outros genes escolhidos como endógenos. Os valores dos genes GAPDH, BETA ACTINA, e HPRT1

para a característica de marmoreio foram respectivamente: 0,473, 0,461, 0,438 e para conteúdo de lipídios: 0,560, 0,487, 0,457, sendo assim, consideradas satisfatórias.

### 6.5 Método do Ct Comparativo (ΔΔ Ct)

Para o método do Ct comparativo, as amplificações dos genes alvo e de referência ocorreram em poços diferentes em uma mesma placa (96 poços). As reações foram realizadas em triplicatas, contendo branco e controle positivo, garantindo assim a detecção de possíveis problemas na corrida, uma vez que as amostras utilizadas possuem curvas de amplificação conhecidas. As condições de reações e equipamento utilizado, foram os mesmos exemplificados na titulação de oligonucleotídeos iniciadores. Os dados finais da reação de qRT - PCR foram transformados em valores de Ct (*cycle threshold*), representando assim o ciclo inicial de detecção do produto amplificado, anteriormente analisados pelo programa *Expression Suite Software v1.0* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA, 2019).

### 6.6 Análises Estatísticas

Após a obtenção dos valores de Ct obtidos por amostra, os dados foram analisados pelo programa *SAS University Edition* (https://www.sas.com/pt_br/software/universityedition/download-software.html). Uma média geométrica foi realizada dos dados de Ct gerados para os genes de referência, como indicado por Vandesompele et al., (2002). Um modelo linear misto foi ajustado para análise da expressão dos genes alvo, como sugerido por Steibel et al., (2009) como descrito a seguir:

$$Y_{gikr} = T_{ig} + D_{ik} + e_{gikr},$$

onde $Y_{gijk}$ = Ct obtido com o software do termociclador para o gene g (média geométrica dos genes de referência e o gene alvo), em poço da placa (réplica técnica) para a amostra de animal k de tratamento i; $T_{ig}$ representa o efeito do tratamento i na expressão do gene g. $D_{ik}$ é um efeito especifico de amostragem aleatória que capta as diferenças tal qual extração diferencial ou eficiências de amplificação entre as amostras. E $e_{gikr}$ que se refere ao valor de resíduo.

O modelo linear misto utilizado possui vantagem, uma vez que permite computar p-valor válidos com várias hipóteses de interesse (Steibel et al., 2009). Para as análises estatísticas no presente estudo, foi definido um valor de $p<0,10$ para indicar tendências a expressão gênica diferencial e valor de $p<0,05$ para indicar expressão gênica diferencial.

## 7. ESPECTROMETRIA DE MASSA

As análises de Espectrometria de Massas Avançada (LC-MS/MS) foram realizadas com o intuito de detectar proteínas diferencialmente expressas correspondentes aos genes diferencialmente expressos identificados pela técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) no presente estudo, uma vez que os mRNAs são traduzidos em proteínas, e estas são responsáveis pela caracterização final dos fenótipos dos animais.

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia abaixo:

### 7.1 Extração proteica das amostras

As amostras de tecido muscular foram inicialmente lavadas duas vezes com PBS. O tecido foi pesado, congelado em nitrogênio líquido e pulverizado em almofariz com auxílio de pistilo. A extração das proteínas foi realizada pela adição de tampão contendo uréia 8M, Tris-HCl 0,15M pH 8.8, detergente O.G. (1-S-Octyl-β-D-Thioglucopyranoside, Pierce) 0,5% e coquetel de inibidores de proteases 5% (Sigma), seguida de sonicação realizada em 3 ciclos de 1 minuto cada, com amplitude de 30 e descanso de 2 segundos. Foram adicionados 1 mL de tampão para cada 100 mg de tecido. O extrato proteico foi obtido após a centrifugação a 12.000xg por 5 min a 4°C.

Para as amostras de carne com alto e baixo marmoreio foram encontradas respectivamente concentrações médias de 13,21 mg/mL e 20,22 mg/mL de proteína, com máximo de 20,03 mg/mL e mínimo de 9,00 mg/mL para alto marmoreio, e 29,2 mg/mL e 10,8 mg/mL para baixo marmoreio. Já para as amostras de conteúdo de lipídios, as médias foram respectivamente para alto e baixo lipídios 12,45 mg/mL e 20,09 mg/mL com máximo de 14,90 mg/mL e mínimo de 11,00 mg/mL para alto lipídios e 29,60 mg/mL e 10,04 mg/mL para baixo lipídios.

### 7.2 Quantificação de Proteínas

Para a quantificação de proteínas, foi utilizado o método de Bradford com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA, preparadas a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/mL, Sigma). As amostras foram distribuídas nas microplacas em duplicatas de 1uL cada. A absorbância em 595 nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Por meio dos dados obtidos na quantificação, foi estimada a massa total de proteínas presentes nas amostras.

### 7.3 Preparação das amostras para análise proteômica

A preparação da amostra para a espectrometria de massas avançada consistiu basicamente de 3 etapas principais: i) redução e alquilação das proteínas, ii) digestão enzimática das proteínas com tripsina e iii) "*clean up/desalting*" das amostras. Para isso, foram utilizados 50 µg de cada amostra. Em resumo, as amostras foram submetidas ao processo de redução das pontes de dissulfeto das proteínas pela adição de DTT (ditiotreitol) na proporção 1mg DTT/mg proteína e incubação por 2 horas em temperatura ambiente seguida da alquilação pela adição de I.A. (iodoacetamida) na proporção 3 mg I.A./mg proteína e incubação por 1 hora em temperatura ambiente, no escuro. O volume das amostras foi diluído 5 vezes em solução de 0,1 M de bicarbonato de amônio pH ≥8,0 obtendo-se um volume final de 500 µL.

As amostras foram então incubadas com 1 µg de tripsina (Promega), à 37°C durante a noite. Previamente a aplicação das amostras no espectrômetro de massas, foi realizado o "*clean-up/ desalting*" das amostras, utilizando-se a coluna OASIS HLB Cartridge 1cc (Waters), conforme descrição do fabricante. Brevemente, a coluna foi equilibrada com solução acetonitrila 5% contendo ácido fórmico 0,1% e a eluição do material de interesse foi realizada com acetonitrila 80%. As amostras foram em seguida secas em *speed vac* e aplicadas em espectrômetro de massas, conforme descrito a seguir.

### 7.4 Análise por espectrometria de massas avançada

As amostras digeridas conforme descrito acima, foram analisadas em espectrômetro de massas OrbiTrap Fusion (ThermoScientific), que combina analisadores de massa de quadrupolo, OrbiTrap e íon trap em um único instrumento, oferecendo o máximo em flexibilidade e utilidade na aquisição de dados. Cerca de 1 µg de cada amostra foram injetados para análise. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo Computational Proteomics Analysis System – CPAS (Rauch et al., 2006). Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade foram então agrupados em proteínas, utilizando-se o algorítimo Protein Prophet, e foi gerada uma lista de identificações com taxa de erro inferior a 2.0%. Foi utilizado o banco de dados Bovine Proteome Uniprot (https://www.uniprot.org/proteomes/UP000009136), como referência.

### 7.5 Análise comparativa e quantificação

A contagem espectral ou *spectral counts*, definida como o número total de espectros identificados para uma proteína, é aceitável como uma medida semiquantitativa da abundância de proteínas em estudos proteômicos. As contagens espectrais, dentro de cada corrida, foram somados às contagens individuais de proteínas, e então divididas (normalizadas), pelas contagens totais em cada corrida. As contagens espectrais normalizadas foram divididas pelo comprimento da proteína e os valores foram multiplicados por 100.000, para fins de simplificação. O Teste t foi aplicado para comparar os diferentes grupos. Os critérios para seleção de proteínas reguladas, destacadas em cada experimento, foram: proteínas reguladas 1,33 vezes, para cima ou para baixo, com $p<0,05$ e proteínas detectadas em um único grupo em 3 ou mais amostras.

### 7.5 Análise de enriquecimento

Para a análise de enriquecimento funcional dos fatores de transcrição que atuam na regulação de genes e proteínas, foi utilizado o plug-in iRegulon para o software Cytoscape versão 3.2 (Shannon et al., 2003) , banco de dados MsigDB (http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp), Gene SigDB

(https://www.genesigdb.org/genesigdb/), GaneSH Clusters (http://bioinformatics.psb.ugent.be/software/details/GaneSh).

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Expressão Gênica Diferencial

#### 8.1.1 Marmoreio

Para a característica de marmoreio, a expressão dos genes FABP4, DGAT1, DGAT2, foram significativamente diferentes ($p<0,05$), enquanto o gene SCD mostrou expressão diferencial entre os grupos com um nível de significância de $p=0,0786$ (Tabela 7), indicando uma tendência.

**Tabela 7:** Expressão dos genes *FABP4, SCD, DGAT1, DGAT2 e PPARG* em carnes de alto e baixo marmoreio.

| GENE | GRUPO | Fold Change | ERRO PADRÃO | P – VALOR |
|---|---|---|---|---|
| FABP4 | ALTO | 1 | 0,37 | 0,0149 |
| | BAIXO | 0,51 | 0,37 | |
| SCD | ALTO | 1 | 0,19 | 0,0786 |
| | BAIXO | 0,92 | 0,19 | |
| DGAT1 | ALTO | 1 | 0,15 | 0,0085 |
| | BAIXO | 0,78 | 0,15 | |
| DGAT2 | ALTO | 1 | 0,20 | 0,0085 |
| | BAIXO | 0,74 | 0,20 | |
| PPARG | ALTO | 1 | 0,18 | 0,1756 |
| | BAIXO | 0,99 | | |

Todos os genes diferencialmente expressos apresentaram maior expressão no grupo de alto marmoreio, em relação ao grupo de baixo marmoreio (Figura 1).

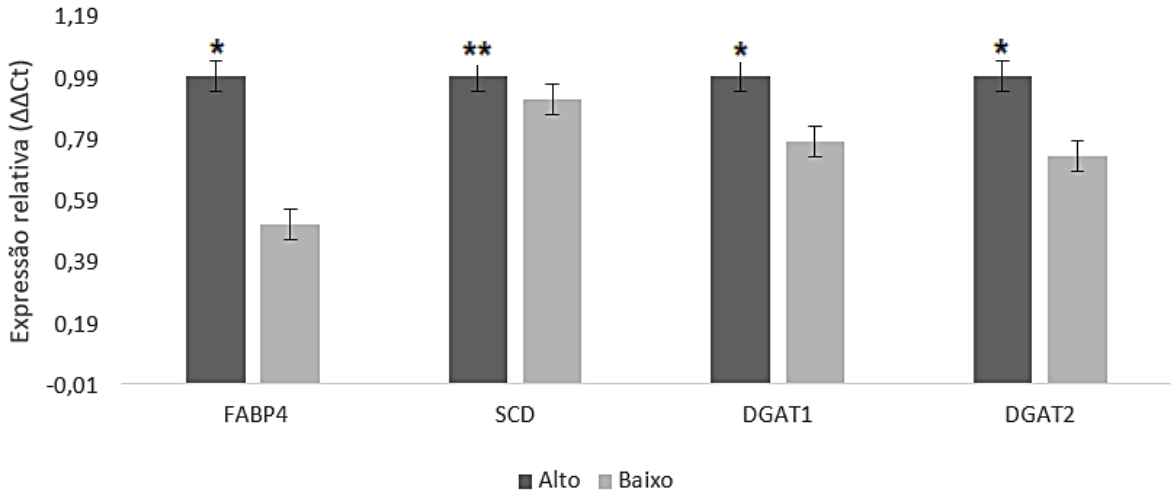



**Figura 1:** Expressão relativa dos genes alvo *FABP4, SCD, DGAT1 e DGAT2* em grupos extremos para marmoreio da carne a nível significância de 5%* e 10%**.

A proteína de ligação ao ácido graxo (*FABP4*) foi diferencialmente expressa em animais com alto marmoreio, evidenciando a ação do *FABP4* na deposição de gordura intramuscular. A *FABP4* é pertencente a uma família de proteínas envolvidas na absorção de ácidos graxos, transporte e metabolismo (Kaikaus et al., 1990). Os resultados corroboram com o encontrado em estudos de associação do gene *FABP4* e deposição de gordura intramuscular em bovinos (Michal et al., 2006; Pannier et a., 2010; Lee et al., 2013). Wang et al. (2009), encontraram diferença na expressão do gene *FABP4* nas primeiras fases da vida em bovinos das raças Wagyu, Piemontes e Hereford, em *músculo longissimus thoracis*, ressaltando a sua importância no desenvolvimento precoce de adipócitos em animais com potencial de marmorização. Komolka et al. (2016), também obtiveram maior expressão do gene FABP4 no *músculo longissimus thoracis* de animais cruzados (Charolês x Holstein Friesian) com alto teor de gordura intramuscular. Lim et al. (2014), em estudo com bovinos Wagyu, também detectaram maior presença do gene *FABP4* em tecido muscular (*músculo longissimus*) de animais do grupo com elevada marmorização. Li et al. (2018), trabalhando com tecido do *músculo longissimus thoracis* de bovinos da raça Xinjiang brown, encontraram diferença significativa na expressão do gene *FABP4* em animais com alto teor de gordura intramuscular.

O gene *SCD*, mostrou tendência a expressão diferencial (p<0,10), em animais com maior marmoreio. O Estearoil CoA Dessaturase (*SCD*) é uma enzima chave na

lipogênese e a inibição da sua atividade prejudica a síntese lipídica (Franck et al., 2011). O gene é altamente expresso em tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, glândula meibomiana, glândula harderiana e glândula prepucial sob condições dietéticas normais (Dobrzyn, 2006). Resultados semelhantes ao nosso foram encontrados por Wang et al. (2009), que em estudo de expressão gênica, relataram genes diferencialmente expressos, em tecido muscular, durante o desenvolvimento de gordura intramuscular (marmoreio) em bovinos taurinos cruzados (Wagyu vs Hereford), observando uma correlação forte e positiva (0.92) da expressão do gene *SCD* com o conteúdo de gordura intramuscular. Chen et al. (2015), por meio de análises trascriptomica do tecido muscular, em bovinos cruzados japoneses (*Bos taurus*), também identificaram maior expressão do gene *SCD* em animais com alto marmoreio. Estudos recentes, utilizando a técnica de RNAseq, identificaram genes diferencialmente expressos no músculo *longissimus thoracis* em bovinos da raça Xinjiang brown (*Bos taurus*), com alto teor de gordura intramuscular, mostrando que o gene *SCD* foi diferencialmente expresso para essa característica (Li et al., 2018).

Os genes *DGAT1* e *DGAT2* foram diferencialmente expressos em animais com maior escore de marmoreio no presente estudo. A diacilglicerol O-aciltransferase 1 e a diacilglicerol O-aciltransferase 2 são enzimas que catalisam a etapa final da via de síntese de triacilgliceróis, atuando na absorção de gordura intestinal, montagem de lipoproteínas, formação de tecido adiposo e lactação (Cases et al., 1998). Estudos de genotipagem mostraram que o gene *DGAT1* está associado com o escore de marmorização em bovinos em diversas raças taurinas (Pannier et al., 2010). Outros estudos de polimorfismos (PCR-RFLP) em bovinos holandeses observaram uma associação do gene *DGAT1* ao conteúdo de gordura intramuscular (Thaller et al., 2003). Li et al. (2013), trabalhando com polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) em uma população de bovinos de diversas raças (Angus, Charolais, Hereford, Limousin, e Simmental) na Suécia, revelaram que o gene *DGAT1* também está associado ao nível de marmormorização da carne. De Jager et al. (2013), observaram uma correlação entre um conjunto de genes responsáveis pela síntese e armazenamento de triacilglicerídeos (TAG) e o conteúdo de gordura intramuscular em Wagyu x Hereford e Piedmontese x Hereford cruzado (*Bos taurus*) e Brahman (*Bos indicus*). Esses autores relatam que o *DGAT2* teve correlação positiva com o conteúdo de

gordura intramuscular em bovinos Brahman. Li et al. (2018), em estudo de RNA-Seq com dois grupos de bovinos da raça Xinjiang brown divergentes para conteúdo de gordura intramuscular, encontraram diferença significativa na expressão do gene *DGAT2* em animais com alto teor de gordura intramuscular. Nossos resultados corroboram com os esses estudos, mostrando que *DGAT1* e *DGAT2* estão associados à deposição de gordura intramuscular.

O gene *PPARG* não teve expressão diferencial significativa entre os grupos divergentes para marmoreio em nossos resultados. O receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (*PPARG*) está envolvido no metabolismo lipídico no tecido muscular, responsável por promover a diferenciação dos adipócitos (Takahashi et al., 2005). Soret et al. (2016), em estudo de expressão gênica em bovinos Pirenaica (*Bos taurus*), com o objetivo de aumentar o conteúdo de gordura intramuscular manipulando a densidade de energia da dieta dos animais, observaram que o gene *PPARG* não diferiu entre os grupos experimentais do músculo *longissimus thoracis*. Assim como a raça Nelore, a raça Pirenaica, amplamente usada na Espanha, tem menor tendência em acumular conteúdo de gordura intramuscular ou marmoreio em relação as demais raças taurinas (Elzo, Johnson, Wasdin, & Driver, 2012; Zhao et al., 2012; Soret et al., 2016). De maneira oposta, Yang et al. (2017), em estudo de expressão gênica diferencial em tecido do músculo *longissimus thoracis* realizado em bovinos Gannan yaks, observaram que com o aumento do nível de energia na dieta, houve acréscimo na síntese de ácidos graxos, resultando na deposição de gordura intramuscular por meio da regulação positiva da expressão dos genes lipogênicos, como o *PPARG*. Duarte et al. (2013), em estudo de expressão gênica no músculo esternomandibular, comparando duas raças, Wagyu e Angus, com deposição de gordura intramuscular distintas, observaram maior expressão do gene *PPARG* em animais da raça Wagyu, que apresentam maior quantidade de gordura intramuscular.

### 8.1.2 Lipídios

Para a característica de conteúdo de lipídios, apenas os genes *BARX2 e STAT5A* diferiram significativamente entre os grupos extremos (Tabela 8).

**Tabela 8:** Expressão dos genes *SREBF1, LPL, ACACA, BARX2* e *EGR1* em carnes de alto e baixo lipídios.

| GENE | GRUPO | Fold Change[1] | ERRO PADRÃO | P – VALOR |
|---|---|---|---|---|
| SREBF1 | ALTO | 1 | 0,22 | 0,7366 |
| | BAIXO | 0,73 | 0,22 | |
| LPL | ALTO | 1 | 0,25 | 0,7109 |
| | BAIXO | 0,71 | 0,25 | |
| ACACA | ALTO | 1 | 0,21 | 0,9070 |
| | BAIXO | 0,90 | 0,21 | |
| BARX2 | ALTO | 1 | 0,21 | 0,0424 |
| | BAIXO | 1,09 | 0,21 | |
| EGR1 | ALTO | 1 | 0,31 | 0,8228 |
| | BAIXO | 0,69 | 0,31 | |
| CDS1 | ALTO | 1 | 0,30 | 0,4572 |
| | BAIXO | 0,63 | 0,31 | |
| STAT5A | ALTO | 1 | 0,16 | 0,0066 |
| | BAIXO | 1,16 | 0,16 | |
| HTATIP2 | ALTO | 1 | 0,20 | 0,1542 |
| | BAIXO | 1,01 | 0,21 | |

Os dois genes diferencialmente expressos encontrados, apresentaram maior expressão no grupo de baixo conteúdo de lipídios, em relação ao grupo de alto (Figura 2).

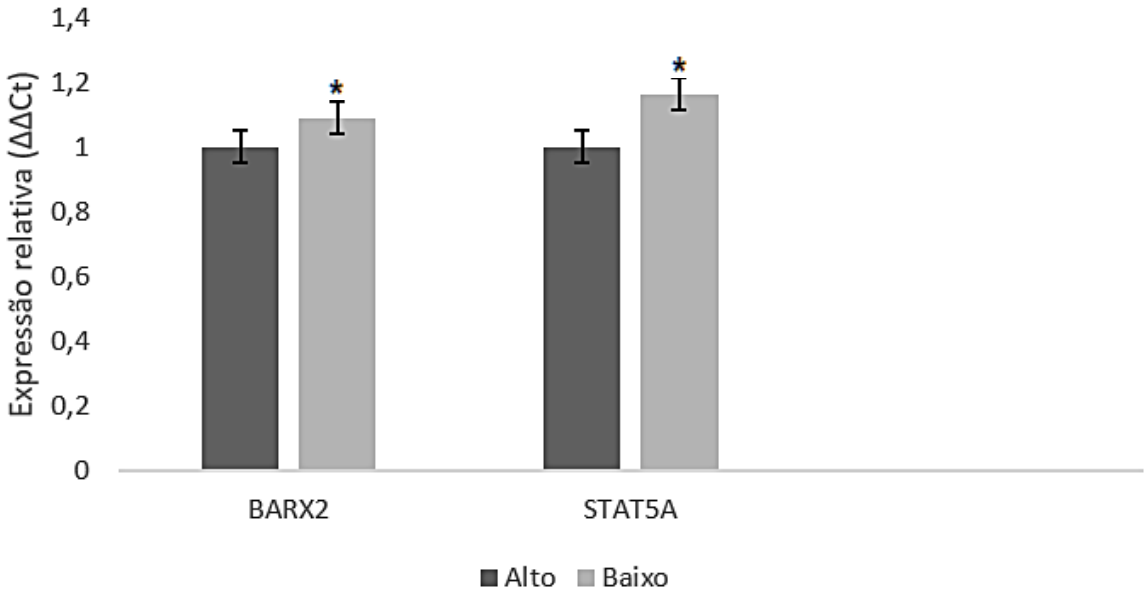


**Figura 2:** Expressão relativa dos genes alvos *BARX2* e *STAT5A* em grupos extremos para conteúdo de lipídios da carne a nível significância de 5%*.

O gene *SREBF1* não foi diferencialmente expresso entre os grupos divergentes para a característica de conteúdo de lipídios. A Proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBF1) desempenha importante função no metabolismo de triglicérides e glicose hepáticos (Ahmed e Byrne., 2007). Estudo com SNPs em bovinos Hanwoo mostrou um efeito significativo do gene *SREBF1*, também conhecido como *SREBP1*, na composição lipídica e conteúdo de gordura intramuscular (Lee et al., 2013).

Nossos resultados mostraram que a lipoproteína lipase (LPL), enzima envolvida no processo de diferenciação de adipócitos (Dani et al., 1990), não apresentou diferença significativa na expressão do gene para a característica de conteúdo de lipídios em bovinos Nelore. Nosso resultado diferiu dos de Ding et al. (2012) que, em análise de PCR–SSCP em bovinos da raça Iaque, encontrou uma forte associação do gene *LPL* em relação à deposição de gordura. Este gene controla o particionamento de TG (triglicerídeos) entre os tecidos adiposo e muscular, aumentando assim a deposição de gordura ou fornecimento de energia em forma de ácidos graxos para o crescimento muscular (Badaoui at al., 2007. Zhang et al. (2017), em trabalho com análise transcricional do tecido muscular *sternomandibularis,* em touros e novilhos chineses da raça Qinchuan, com conteúdo de gordura intramuscular divergentes, também observaram que gene *LPL* foi diferencialmente expresso, sugerindo importante papel nas vias de sinalização e contribuindo para melhorar a deposição de gordura.

A enzima lipogênica Acetil-CoA carboxilase-α (ACACA) está associada a síntese de lipídios em ruminantes e é considerada enzima regulatória, uma vez que as mudanças nas suas atividades influenciam na taxa de síntese de ácidos graxos, promovida pela ativação do gene *ACACA,* por meio da via da insulina (Saltiel e Kahn, 2001; Smith; Witkowki; Joshi, 2003). Entretanto, ao contrário de vários estudos anteriores, não encontramos diferença significativa na expressão do gene *ACACA* em grupos divergentes para a característica de conteúdo lipídios em bovinos da raça Nelore.. Zhang et al. (2010), em estudos com SNPs em bovinos cruzados (Hereford, Angus, Brangus, Beefmaster, Bonsmara e Romosinuano), observaram uma

associação significativa entre a expressão do gene *ACACA,* em tecido muscular *sternomandibularis*, em relação as características relacionadas a lipídios. Estudo realizado por Bong et al. (2012), mostraram que a castração regulou positivamente a expressão gênica lipogênica da acetil-COA carboxilase (*ACACA*) no músculo *longissimus thoracis* em bovinos coreanos. Esses resultados sugerem que a castração contribui para melhorar o efeito de marmoreio por meio do aumento da captação lipídica e da lipogênese, além de diminuir a lipólise (Bong et al., 2012). A divergência entre nosso resultado para este gene e os encontrados na literatura pode ter ocorrido devido ao fato de termos utilizado animais inteiros em lugar de castrados.

O gene *SREBF1*, conhecido também como *SREPF1*, é um fator importante na transcrição, e regula a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, como *ACACA* e *LPL*. Além disso, o gene *SREBF1* está envolvido na ativação da expressão do fator de transcrição *PPARG* (Fajas et al., 1998; Kim et al., 1998). A não expressão diferencial dos genes *SREBF1*, consequentemente *ACACA* e *LPL*, em animais divergentes da raça Nelore para a característica de conteúdo de lipídios, pode estar sendo influenciada por muitos fatores, como sexo, idade, nutrição e genética (Rule et al., 1997).

O gene *BARX2* apresentou maior expressão em animais com menor conteúdo de gordura intramuscular. Juntamente a fatores de transcrição expressos pelo músculo, o *BARX2* é responsável por regular processos iniciais de remodelação do citoesqueleto na diferenciação de mioblastos (Makarenkova et al., 2009). Resultado controverso encontrado por Silva et al. (2019b), em estudo do tecido muscular, por meio de RNA-Seq, em bovinos Nelore divergentes para conteúdo de gordura intramuscular, que observaram que o gene *BARX2* foi regulado positivamente em animais que continham maior teor de gordura intramuscular.

O gene *BARX2* também interage diretamente com os reguladores musculares positivos da miogênese (Meech et al., 2010), o que leva ao aumento na proporção de carne na carcaça e consequentemente, à diminuição da deposição de tecido adiposo e vice-versa (Arrigoni et al., 2004; Yokoo et al., 2010). Wang et al. (2014), em estudo realizado com duas raças suínas domésticas (Yorkshire e Landrace), submetidas à seleção intensiva para características de desenvolvimento e crescimento muscular, observaram, por meio do sequenciamento, cinco regiões no genoma que foram

selecionadas positivamente e que abrigavam genes relacionados ao crescimento muscular, dentre eles, o *BARX2.* Estudo de transcriptoma realizado com animais divergentes para a característica de área de olho de lombo (AOL) em bovinos Nelore encontrou expressão significativa do gene *BARX2* em animais com maior AOL (Silva et al., 2019). A expressão do *BARX2* em nosso estudo em animais com menor conteúdo de lipídios pode estar relacionada ao desenvolvimento muscular desses animais, evidenciando a importante função desse gene no crescimento muscular.

O gene fator de transcrição de resposta ao crescimento inicial 1 (*EGR1*), não foi diferencialmente expresso para a característica de conteúdo de lipídios em bovinos Nelore. Silva et al., (2019b), em estudo de transcriptoma do tecido muscular utilizando outra amostra de animais Nelore, divergentes para conteúdo de gordura intramuscular, encontraram diferença significativa na expressão do gene *EGR1,* em animais que continham maior teor de gordura intramuscular. O gene *EGR1* parece ter influência no controle da lipólise nos adipócitos, e uma das possíveis formas de induzir a expressão desse gene é por meio da insulina e nutrientes (Chakrabarti et al., 2013). Assim, o tempo de jejum dos animais até o momento de abate, pode estar influenciando nosso resultado, uma vez que a secreção da insulina, importante ativador de *EGR1*, em períodos de jejum, diminui e consequentemente, há o aumento da lipólise (González e Silva 2006).

O gene Diacilglicerol Síntese 1 (*CDS1*) não foi diferencialmente expresso entre os grupos divergentes para conteúdo de gordura intramuscular em nossos resultados. Segundo Qi et al. (2016), em descoberta recente, este gene está envolvido na regulação da expansão de gotículas lipídicas, agindo na regulação do nível de ácido fosfatídico no retículo endoplasmático. Nosso resultado está de acordo com o de Cesar et al. (2015), em estudo similar, que também não identificaram expressão diferencial para este gene, em animais da raça Nelore, em grupos divergentes para a característica de conteúdo de gordura intramuscular**.** Ao contrário, Silva et al. (2019b), em estudo de RNA-Seq, em tecido muscular, também com bovinos Nelore, encontraram expressão diferencial do *CDS1*, em animais com maior conteúdo de gordura intramuscular. A divergência de resultados pode estar relacionada a múltiplos fatores genéticos e ambientais, podendo afetar a deposição de gordura intramuscular em bovinos (Park, et al., 2018). De acordo com Mattos et al. (2000) e Souza et al.

(2008), a mesma base genética pode não ter os mesmos resultados em diferentes ambientes. Cabe ressaltar que no presente trabalho o fenótipo dos animais foi ajustado para efeitos de ambiente como grupos de contemporâneos e idade ao abate, enquanto que Silva et al. (2019b) utilizaram o fenótipo não ajustado. Apesar da importante influência do gene *CDS1* na formação de gotículas lipídicas, e consequentemente, no armazenamento de lipídios, a compreensão do crescimento de gotículas lipídicas ainda é incipiente, e mecanismos reguladores adicionais ainda precisam ser identificados (Qi et al. 2016).

Nossos resultados mostraram que o gene transdutor de sinal e ativador da transcrição 5A (*STAT5A*) foi mais expresso em animais com baixo conteúdo de lipídios. As proteínas STAT5 exercem um papel importante nas células adiposas, sendo altamente induzidas durante adipogênese (Stewart et al., 1999). Nosso resultado difere do de César et al. (2015) que, em análise de RNA-Seq em bovinos Nelores, identificaram o gene *STAT5A* como diferencialmente expresso em animais com alto conteúdo de gordura intramuscular. Estudo realizado por Stewart et al. (1999) em pré-adipócitos 3T3-L1 investigando a expressão de proteínas STAT, observaram que a expressão de STAT5A é aumentada na diferenciação e está fortemente correlacionada com o fenótipo de adipócito. Além disso, o autor sugere a STAT5A como um potencial indutor de genes específicos do tecido, o que contribui para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo dos adipócitos (Stewart et al., 1999).

O *STAT5A*, também pode inibir a expressão de muitos genes nos adipócitos, como o gene *SLC2A4* (GLUT4), relacionado à síntese dos ácidos graxos (Doerrler et al., 1994). Em camundongos com redução seletiva de *SLC2A4,* há uma redução na captação de glicose estimulada por insulina nos adipócitos e consequentemente na resistência a esse hormônio (Abel et al., 2001). Esses resultados sugerem que embora as proteínas STAT5 tenham importância na adipogênese, podem exercer efeitos negativos sobre a expressão de alguns genes e consequentemente na deposição de lipídios intramuscular (Floyd e Stephens, 2003).

O gene codificador da proteína Interativa 2 do HIV-1 (*HTATIP2*), não foi diferencialmente expresso para a característica de conteúdo de lipídios. A proteína Interativa 2 do HIV-1 está relacionada à regulação da importação nuclear, sendo importante na fase de transição e no metabolismo lipídico (King e Shtivelman, 2004;

Zhao et al., 2007; Kavanagh et al., 2008; Zhang et al., 2011). Nosso resultado difere do de César et al. (2015) que, em análise de RNA-Seq em bovinos Nelores, identificaram o gene *HTATIP2* como diferencialmente expresso em animais com alto conteúdo de gordura intramuscular. No entanto a real função do gene em células saudáveis relacionada ao metabolismo lipídico permanece desconhecida (Zhang et al. 2011). Não foram encontradas mais evidências na literatura sobre como a ação deste gene pode influenciar diferentemente na deposição de lipídios**.**

## 9. PROTEÔMICA

A quantificação das proteínas diferencialmente expressas foi realizada a fim de verificar se os genes selecionados na literatura, estavam sendo traduzidos em proteínas.

Por meio de análise de enriquecimento, foram encontradas as proteínas reguladas pelos fatores de transcrição estudados, as quais foram comparadas ao banco de dados do estudo de proteômica, a fim de verificar se apresentaram tradução diferencial.

O fator de transcrição *STAT5A*, mais expresso no grupo com baixo conteúdo de lipídeos, exerce um papel importante como regulador, nas células adiposas, sendo altamente induzido durante adipogênese, podendo inibir a expressão de muitos genes nos adipócitos. Dentre os genes regulados pelo *STAT5A* (Figura 8), as proteínas PRDM1 (PR domínio contendo proteína 1) e COL1A2 (Colágeno tipo I, alfa 2), apresentaram expressão diferencial significativa, ambos mais expressos nos grupos com alta deposição de gordura intramuscular ($p<0,05$), o que indica a ação inibitória do STAT5A sobre a expressão das proteínas *PRDM1* e *COL1A2.*

A proteína *PRDM1*, também conhecida por *BLIMP1* (a proteína 1 de maturação induzida por linfócitos B), atua como repressor da expressão da proteína Interferon-Beta (*IFNB1*), importante para a defesa contra infecções virais, diferenciação celular e nas defesas antitumorais (Keller et al., 1991). Já a proteína COL1A2, ou colágeno tipo 2, tem sido associada à maciez da carne em bovinos de diversas raças (Bailey et al., 2008; Blanco & Alonso, 2010; Zhang et al., 2011; Fonseca et al., 2017).

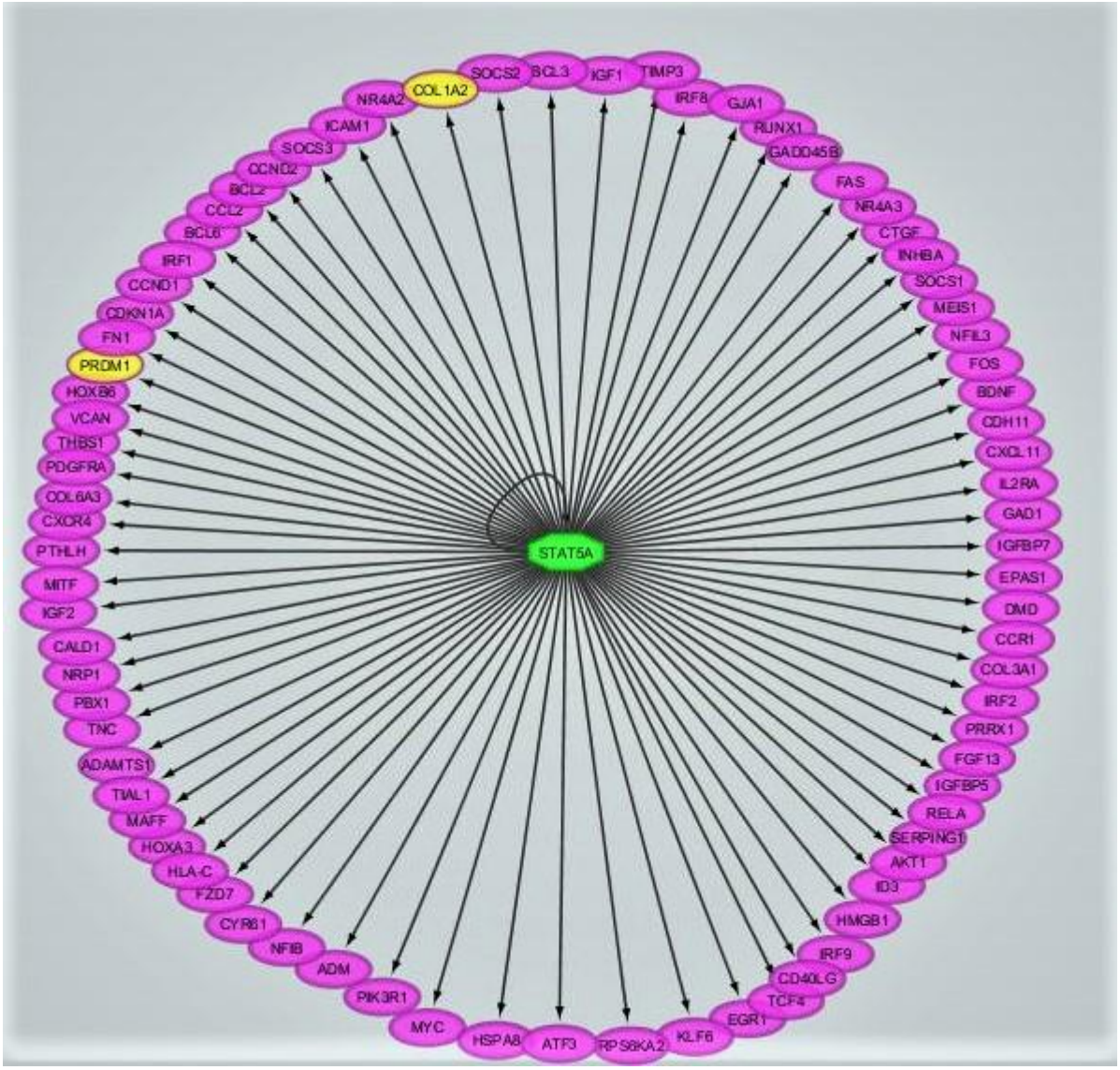



**Figura 8:** Proteínas reguladas (roxo) pelo fator de transcrição STAT5A (verde). Em amarelo destacam-se as proteínas diferencialmente expressas para conteúdo de lipídios (PRDM1 e CO1A2).

As proteínas traduzidas pelos demais genes que apresentaram expressão diferencial significativa, *FABP4, SCD, DGAT1, DGAT2*, *e BARX2,* não foram detectadas pela análise LC-MS/MS. A baixa correlação entre os níveis de expressão de mRNA e proteína, sugerem que os mecanismos de regulação gênica pós-transcricionais e traducionais, podem ter influenciado na produção final da proteína, não permitindo que os genes diferencialmente expressos fossem traduzidos em proteínas diferencialmente expressas (Lehninger, 2000).

Dentre os possíveis eventos pós-transcricionais pode haver ação dos RNAs de interferência (RNAi), importante mecanismo de silenciamento de genes pós-transcricional, que regula a expressão de genes codificadores de proteínas, por meio da eliminação do mRNA ou inibição da tradução (Hannon, 2002). As modificações pós-traducionais regulam a atividade da maioria das proteínas eucarióticas, e esses eventos, podem alterar as propriedades de uma proteína por clivagem proteolítica ou pela adição de um grupo modificador a um ou mais aminoácidos. As modificações pós-traducionais de uma proteína podem determinar seu estado de atividade, localização, *turnover* e interações com outras proteínas (Lehninger et al., 2000). Na sinalização, por exemplo, cascatas de quinase são ativadas e desativadas pela adição reversível e remoção de grupos fosfato (Cohen, 2000), e no ciclo celular, a ubiquitinação marca ciclinas para destruição em pontos de tempo definidos fazendo com que sejam encaminhadas ao proteossoma onde serão degradadas, sendo um importante mecanismo de controle de permanência da proteína no ciclo celular (Lehninger et al., 2000; Tyers e Jorgensen, 2000).

Outros fatores pós-traducionais que influenciam a correlação mRNA-proteína é a meia-vida das proteínas. As proteínas podem variar o seu tempo de vida útil em um turnover proteico (renovação de proteínas), que integra a síntese e degradação de proteínas variadas. Certas sequências de aminoácidos funcionam como sinais que determinam a localização celular, a modificação química e a meia-vida de uma proteína, e esta pode variar de alguns segundos a vários dias (Glickman & Ciechanover, 2002; Pratt et al., 2002).

Além das razões biológicas, estudos demonstraram uma correlação muito baixa entre os níveis de expressão de mRNA e proteína em diversas espécies (Gygi, et al., 1999; Greenbaum et al., 2003; Tian et al., 2004; Dhingra et a., 2005; Rogers et al., 2008). Isso pode ocorrer devido às divergências entre a concentração de mRNA e proteína e aos erros e ruídos nas tecnologias disponíveis, limitando a capacidade de identificação desses substratos (Greenbaum et al., 2003).

## 10. CONCLUSÃO

A expressão diferencial de genes relacionados à deposição de gordura intramuscular, mais encontrados na literatura, foram validados em uma população comercial de bovinos Nelore, representativa do sistema de criação do rebanho brasileiro, e foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes *FABP4, DGAT1, DGAT2, BARX2, STAT5A* e *SDC*. Além disso, as proteínas PRDM1 e CO1A2, reguladas pelo fator de transcrição *STAT5A* parecem exercer papel importante no processo de deposição de gordura intramuscular, podendo ser possíveis marcadores moleculares para o melhoramento dessa característica.

## 11. REFERÊNCIAS

ABEL, E. Dale et al., Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. **Nature**, v. 409, n. 6821, p. 729, 2001.

ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/>. Acessado em 08 de fevereiro de 2019.

ABU-ELHEIGA, Lutfi et al., Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. **Science**, v. 291, n. 5513, p. 2613-2616, 2001.

ABU-ELHEIGA, Lutfi et al., Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 9, p. 4011-4015, 1995.

AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198, 2003.

AHMED, F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 215 – 233, 2002.

AHMED, M.H; BYRNE, C.D. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Drug discovery today**, v. 12, n. 17-18, p. 740-747, 2007.

AHN, Jinsoo et al., Differential expressions of G0/G1 switch gene 2 and comparative gene identification-58 are associated with fat content in bovine muscle. **Lipids**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 2014.

ALBUQUERQUE, L. G.; MERCADANTE, M. E. Z.; ELER, J. P. Aspectos da seleção de Bos indicus para produção de carne. **B Indústr Anim**, v. 64, p. 339-348, 2007.

ALVES, D. D.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina - Uma Revisão. **Revista FZVA**, Uruguaiana, v.14, p.193-216, 2007.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Manuals & Protocols**. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/global/en/website-overview/ab-welcome.html>. Acesso em: 28 fev. 2019.

ARCHIBEQUE, S. L. et al., Fatty acid indices of Estearoil CoA Dessaturase do not reflect actual Estearoil CoA Dessaturase enzyme activities in adipose tissues of beef steers finished with corn-, flaxseed-, or sorghum-based diets. **Journal of animal science**, v. 83, n. 5, p. 1153-1166, 2005.

ARRIGONI, Mário De Beni et al. Desempenho, fibras musculares e carne de bovinos jovens de três grupos genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 1033-1039, 2004.

BADAOUI, B. et al. Identification of two polymorphisms in the goat lipoprotein lipase gene and their association with milk production traits. **Journal of Dairy Science,** v. 90, n. 6, p. 3012–3017, 2007.

BAILEY, Allen J.; PAUL, Robert Gordon; KNOTT, Lynda. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mechanisms of ageing and development**, v. 106, n. 1-2, p. 1-56, 1998.

BARBOSA, Eduardo Buzolin et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BAKHTIARIZADEH, Mohammad Reza; MORADI-SHAHRBABAK, Mohammad; EBRAHIMIE, Esmaeil. Underlying functional genomics of fat deposition in adipose tissue. **Gene**, v. 521, n. 1, p. 122-128, 2013.

BERGER, Joel; MOLLER, David E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 409-435, 2002.

BERTRAND, J. K. et al. Genetic evaluation for beef carcass traits. **Journal of animal science**, v. 79, n. suppl_E, p. E190-E200, 2001.

BIONAZ, Massimo et al., Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR research**, v. 2013, 2013.

BLANCO, M. R.; ALONSO, C. R. Collagen types I and III in bovine muscles: influence of age and breed. **Journal of muscle foods**, v. 21, n. 3, p. 417-423, 2010.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BONG, Jong Jing; CHO, Keun Kwang; BAIK, Myunggi. Comparison of gene expression profiling between bovine subcutaneous and intramuscular adipose tissues by serial analysis of gene expression. **Cell biology international**, v. 34, n. 1, p. 125-133, 2010.

BONG, Jin Jong et al., Differential expression of genes associated with lipid metabolism in longissimus thoracisvof Korean bulls and steers. **Meat science**, v. 91, n. 3, p. 284-293, 2012.

BOULEY, Julien; CHAMBON, Christophe; PICARD, Brigitte. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1811-1824, 2004.

BOYLE, Keith B. et al. The transcription factors Egr1 and Egr2 have opposing influences on adipocyte differentiation. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 5, p. 782, 2009.

BRANDSTETTER, A. M.; SAUERWEIN, H.; VEERKAMP, J. H.; GEAY, Y.; HOCQUETTE, J. F. Effects of muscle type, castration, age and growth rate on H-FABP expression in bovine skeletal muscle. **Livestock Production Science**, v. 75, n. 2, p. 199-208, 2002.

BRYM, Pawe; KAMIÑSKI, Stanis³aw; RUSC, A. New SSCP polymorphism within bovine STAT5A gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n. 4, p. 445-452, 2004..

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CARTER, John H. et al. Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 11, p. 6796-6805, 2007.

CANAVEZ, Flavio C. et al., Genome sequence and assembly of Bos indicus. **Journal of Heredity**, v. 103, n. 3, p. 342-348, 2012.

CASES, Sylvaine et al., Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 22, p. 13018-13023, 1998.

CÁNOVAS, A.; QUINTANILLA, R.; AMILLS, M.; PENA, R. N. Muscle transcriptomic profiles in pigs with divergent phenotypes for fatness traits. **BMC Genomics**, v. 11, n. 372, 2010.

CESAR, Aline SM et al. Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nellore cattle. **BMC genetics**, v. 15, n. 1, p. 39, 2014.

CESAR, Aline SM et al. Putative regulatory factors associated with intramuscular fat content. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128350, 2015.

CHAKRABARTI, Partha et al., Insulin inhibits lipolysis in adipocytes via the evolutionarily conserved mTORC1-Egr1-ATGL-mediated pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 33, n. 18, p. 3659-3666, 2013.

CHAWLA, Ajay et al., Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 798-800, 1994.

CHEN, D.; LI, W.; DU, M.; WU, M.; CAO, B. Sequencing and characterization of divergent marbling levels in the beef cattle (longissimus thoracismuscle) transcriptome. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 2, p. 158, 2015.

CHEN, Vivian; SHTIVELMAN, Emma. CC3/TIP30 regulates metabolic adaptation of tumor cells to glucose limitation. **Cell Cycle**, v. 9, n. 24, p. 4941-4953, 2010.

CLARK, Robert B. et al., The nuclear receptor PPARγ and immunoregulation: PPARγ mediates inhibition of helper T cell responses. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1364-1371, 2000.

COLANTONIO, David A.; CHAN, Daniel W. The clinical application of proteomics. **Clinica chimica acta**, v. 357, n. 2, p. 151-158, 2005.

COHEN, Philip. The regulation of protein function by multisite phosphorylation–a 25 year update. **Trends in biochemical sciences**, v. 25, n. 12, p. 596-601, 2000.

CUNDIFF, L. V. et al. Encyclopedia of Animal Science. **Beef Cattle: Breeds and Genetics (Pond WG and Bell AW, eds.). Cornell University, Ithaca**, 2004.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, vol. 139, p. 5-17, 2005

DA COSTA, Ana Sofia Henriques et al. Expression of genes controlling fat deposition in two genetically diverse beef cattle breeds fed high or low silage diets. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 118, 2013.

DANI, C.; AMRI, E. Z.; BERTRAND, B.; ENERBACK, S.; BJURSELL, G.; GRIMALDI, P.; AILHAUD, G. Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. **Journal of cellular biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 103-110, 1990.

DARNELL, James E. STATs and gene regulation. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1630-1635, 1997.

DE JAGER, N. et al. Gene expression phenotypes for lipid metabolism and intramuscular fat in skeletal muscle of cattle. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1112-1128, 2013.

DENG, Tingxian et al., Integrative Analysis of Transcriptome and GWAS Data to Identify the Hub Genes Associated With Milk Yield Trait in Buffalo. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 36, 2019.

DING, X. Z. et al. A novel single nucleotide polymorphism in exon 7 of LPL gene and its association with carcass traits and visceral fat deposition in yak (Bos grunniens) steers. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 1, p. 669-673, 2012.

DHINGRA, V.; GUPTA, M.; ANDACHT, T.; FU, Z. F. New frontiers in proteomics research: a perspective. **International journal of pharmaceutics**, v. 299, n. 1-2, p. 1-18, 2005.

DOBRZYN, A.; DOBRZYN, P. Estearoil CoA Dessaturase - a new player in skeletal muscle metabolism regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. Suppl 10, p. 31-42, 2006.

DOERRLER, William; FEINGOLD, Kenneth R.; GRUNFELD, Carl. Cytokines induce catabolic effects in cultured adipocytes by multiple mechanisms. **Cytokine**, v. 6, n. 5, p. 478-484, 1994.

DORAN, O. et al., A reduced protein diet induces Estearoil CoA Dessaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 3, p. 609-617, 2006.

DUARTE, M. S. et al. Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. **Journal of animal science**, v. 91, n. 6, p. 2938-2946, 2013.

ELZO, M. A.; JOHNSON, D. D.; WASDIN, J. G.; & DRIVER, J. D. Carcass and meat palatability breed differences and heterosis effects in an Angus–Brahman multibreed population. **Meat science**, v. 90, n. 1, p. 87-92, 2012.

ESPINDOLA, Foued Salmen et al., Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010

EXPRESSION SUITE SOFTWARE HELP; Expression Suite Software Version v.1.0, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, 2016. Disponível em: < https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/software-downloads/expressionsuite-software.html >. Acessado em 22 de fevereiro de 2019.

FAJAS, L; FRUCHART, JC; AUWERX, J. Transcriptional control of adipogenesis. **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 2, p. 165-173, 1998.

FERRAZ, José Bento Sterman; DE FELÍCIO, Pedro Eduardo. Production systems–An example from Brazil. **Meat science**, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

FRANCK, Niclas et al. Identification of adipocyte genes regulated by caloric intake. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 2, p. E413-E418, 2011.

FROHNERT, Brigitte I.; HUI, To Y.; BERNLOHR, David A. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 7, p. 3970-3977, 1999.

FONSECA, Larissa Fernanda Simielli et al. Expression of genes related to mitochondrial function in Nellore cattle divergently ranked on residual feed intake. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 2, p. 559-565, 2015.

FONSECA, Larissa Fernanda Simielli et al. Differences in global gene expression in muscle tissue of Nellore cattle with divergent meat tenderness. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 945, 2017.

GERBENS, FRANS. Genetic control of intramuscular fat accretion. **Muscle Development of Livestock Animals, Physiology, Genetics and Meat Quality**, p. 343-361, 2004.

GLATZ, J. F. C. et al., Cytoplasmic fatty acid binding protein: significance for intracellular transport of fatty acids and putative role on signal transduction pathways. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 48, n. 1, p. 33-41, 1993.

GLICKMAN, Michael H.; CIECHANOVER, Aaron. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological reviews**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOLDSTEIN, Joseph L.; DEBOSE-BOYD, Russell A.; BROWN, Michael S. Protein sensors for membrane sterols. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 35-46, 2006.

GOLDBERG, Ira J.; MERKEL, Martin. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. **Front Biosci**, v. 6, n. 6, p. D388-D405, 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, SC da. Bioquímica clínica de glicídeos. **Introdução a bioquímica clínica veterinária. 2ed. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre**, p. 153-207, 2006.

GREENBAUM, D.; COLANGELO, C.; WILLIAMS, K.; GERSTEIN, M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome biology**, v. 4, n. 9, p. 117, 2003.

GRINDFLEK, E. et al., Rapid communication: physical and genetic mapping of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPARγ) gene to porcine chromosome 13. **Journal of animal science**, v. 78, n. 5, p. 1391, 2000.

GYGI, Steven P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.

HANNON, Gregory J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244, 2002.

HARPER, G. S. et al., Biological determinants of intramuscular fat deposition in beef cattle: current mechanistic knowledge and sources of variation. **Meat Livest. Australia, Sydney**, 2001.

HEGARTY, Bronwyn D. et al., Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory elementbinding protein-1c. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 3, p. 791-796, 2005.

HERRING, B. Paul; KRIEGEL, Alison M.; HOGGATT, April M. Identification of Barx2b, a serum response factor-associated homeodomain protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 14482-14489, 2001.

HERTZEL, Ann V. et al., Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid binding protein null and transgenic mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 2006.

HOCQUETTE, J. F.; BAUCHART, D. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, n. 1, p. 27-48, 1999.

HOCQUETTE, J. F; GRAULET, B; OLIVRECRONA, T. Lipoprotein lipase activity and mRNA levels in bovine tissues. **Comparative Biochemistry and Phisicology Part B: Biochemistry and Molecular Biology,** v. 121, n. 2, p. 201-2152, 1998.

HUANG, L. et al. Subcongenic analysis of a quantitative trait locus affecting body weight and glucose metabolism in zinc transporter 7 (znt7)-knockout mice. **BMC genetics**, v. 20, n. 1, p. 19, 2019.

ISFORT, Robert J. Proteomic analysis of striated muscle. **Journal of Chromatography B**, v. 771, n. 1-2, p. 155-165, 2002.

ITO, Mitsuhiro et al. TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis. Cancer research, v. 63, n. 24, p. 8763-8767, 2003.

JAMESDANIEL, Samson; SALVI, Richard; COLING, Donald. Auditory proteomics: methods, accomplishments and challenges. Brain research, v. 1277, p. 24-36, 2009.

JEONG, J. et al., Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus thoracismuscle of Korean cattle steers. **Journal of animal science**, v. 90, n. 6, p. 2044-2053, 2012.

JEONG, J. et al. Transcriptome changes favoring intramuscular fat deposition in the longissimus muscle following castration of bulls. **Journal of animal science**, v. 91, n. 10, p. 4692-4704, 2013.

JOO, S. T.; KIM, G. D.; HWANG, Y. H.; RYU, Y. C. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. **Meat Science,** v. 95, n. 4, p. 828836, 2013.

KAIKAUS, R. M.; BASS, N. M.; OCKNER, R. K. Functions of fatty acid binding proteins. **Experientia**, v. 46, n. 6, p. 617-630, 1990.

KAVANAGH, K. L. et al. Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 24, p. 3895, 2008.

KAWAI, Masanobu et al. Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARγ pathway. **Journal of molecular endocrinology**, v. 38, n. 1, p. 19-34, 2007.

KELLER, Andrew D.; MANIATIS, Tom. Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. **Genes & development**, v. 5, n. 5, p. 868-879, 1991.

KELLEY, David E.; GOODPASTER, Bret H.; STORLIEN, Len. Muscle triglyceride and insulin resistance. **Annual review of nutrition**, v. 22, n. 1, p. 325-346, 2002.

KILLION, Elizabeth A. et al. A role for long-chain acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) in diet-induced phospholipid remodeling and obesity-associated adipocyte dysfunction. **Molecular metabolism**, v. 9, p. 43-56, 2018.

KIM, Jae Bum et al. ADD1/SREBP1 activates PPARγ through the production of endogenous ligand. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 95, n. 8, p. 4333-4337, 1998.

KIM, Ki-Han. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. **Annual review of nutrition**, v. 17, n. 1, p. 77-99, 1997.

KIM, Nam Kuk et al. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat Science**, v. 80, n. 4, p. 1068-1073, 2008.

KIM, Nam-Kuk et al. Proteome analysis of the m. longissimus thoracisbetween fattening stages in Hanwoo steer. **BMB reports**, v. 42, n. 7, p. 433-438, 2009.

KING, Frank W.; SHTIVELMAN, Emma. Inhibition of nuclear import by the proapoptotic protein CC3. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 16, p. 7091-7101, 2004.

KIRCHGESSNER, T. G. et al., Genetic and developmental regulation of the lipoprotein lipase gene: loci both distal and proximal to the lipoprotein lipase structural gene control enzyme expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 3, p. 1473-1482, 1989.

KOMOLKA, Katrin et al. Gene expression profile of Musculus longissimus dorsi in bulls of a Charolais× Holstein F2-cross with divergent intramuscular fat content. **Genomics data**, v. 7, p. 131-133, 2016.

KLIEWER, Steven A. et al., Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 9, p. 4318-4323, 1997.

LAW, Ronald E. et al., Expression and function of PPARγ in rat and human vascular smooth muscle cells. **Circulation**, v. 101, n. 11, p. 1311-1318, 2000.

LEE, Seung-Hwan et al., Identification of marbling-related candidate genes in M. longissimus thoracisof high-and low marbled Hanwoo (Korean Native Cattle) steers. **BMB reports**, v. 41, n. 12, p. 846-851, 2008.

LEE, Yoonseok et al., Novel single nucleotide polymorphisms of bovine SREBP1 gene is association with fatty acid composition and marbling score in commercial Korean cattle (Hanwoo). **Molecular biology reports**, v. 40, n. 1, p. 247-254, 2013a.

LEE, Hyun-Jeong et al. Comparative transcriptome analysis of adipose tissues reveals that ECM-receptor interaction is involved in the depot-specific adipogenesis in cattle. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66267, 2013b.

LEMAY, Danielle G.; HWANG, Daniel H. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. **Journal of lipid research**, v. 47, n. 7, p. 1583-1587, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839 p.

LI, N.; ZHANG, Y.; LI, H. P.; HAN, L.; YAN, X. M.; LI, H. B.; DU, W.; ZHANG, J.; YU, Q. Differential expression of mRNA-miRNAs related to intramuscular fat content in the longissimus thoracisin Xinjiang brown cattle. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0206757, 2018.

LI, Ting et al. Ectopic overexpression of porcine DGAT1 increases intramuscular fat content in mouse skeletal muscle. **Transgenic research**, v. 22, n. 1, p. 187-194, 2013a.

LI, Xin et al. Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. **Meat science**, v. 94, n. 2, p. 153-158, 2013b.

LIM, Dajeong et al., Identification of candidate genes related to bovine marbling using protein-protein interaction networks. **International journal of biological sciences**, v. 7, n. 7, p. 992, 2011.

LIM, Dajeong et al. Characterization of genes for beef marbling based on applying gene coexpression network. **International journal of genomics**, v. 2014, 2014.

LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A. Centennial paper: proteomics in animal science. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 9, p. 2430-2441, 2008.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LUCHIARI FILHO, Albino. **Pecuária da carne bovina**. A. Luchiari Filho, 2000.

MAN, Weng Chi et al., Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. **Journal of lipid research**, v. 47, n. 9, p. 1928-1939, 2006.

MAKARENKOVA, Helen P. et al., O Barx2 controla a fusão de mioblastos e promove a ativação mediada por MyoD do gene α-actina de músculo liso. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 22, p. 14866-14874, 2009.

MAO, Yanwei et al. Qualidade da carne com diferentes teores de gordura intramuscular e análise proteômica utilizando marca isobárica para quantificação relativa e absoluta de proteínas diferencialmente expressas. **Meat science**, v. 118, p. 96-102, 2016.

MARIONI, J. C.; MASON, C. E.; MANE, S. M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, v. 18, p. 1509–1517, 2008.

MARSHALL, DM et al. Genética da qualidade da carne. **A genética do gado.** p. 605-636, 1999.

MATARESE, Valerie; BERNLOHR, D. A. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid-and retinoic acid-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 28, p. 14544-14551, 1988.

MATTOS, D.; BERTRAND, J. K.; MISZTAL, I. Investigation of genotype× environment interactions for weaning weight for Herefords in three countries. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 8, p. 2121-2126, 2000.

MEDINA-GOMEZ, Gema; GRAY, Sarah; VIDAL-PUIG, Antonio. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) and PPARγcoactivator-1 (PGC1). **Public health nutrition**, v. 10, n. 10A, p. 1132-1137, 2007.

MEECH, Robyn et al. The homeodomain protein Barx2 promotes myogenic differentiation and is regulated by myogenic regulatory factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8269-8278, 2003.

MEECH, R.; GOMEZ, M.; WOOLLEY, C.; BARRO. M.; HULIN, J.A.; WALCOTT, E.C.; DELGADO, J.; MAKARENKOVA, H.P. The Homeobox Transcription Factor Barx2 Regulates Plasticity of Young Primary Myofibers. **PLoS ONE** v. 5, n. 7, p. e11612, 2010.

MEECH, Robyn et al. Barx2 is expressed in satellite cells and is required for normal muscle growth and regeneration. **Stem cells**, v. 30, n. 2, p. 253-265, 2012.

MEEGALLA, Rupalie L.; BILLHEIMER, Jeffrey T.; CHENG, Dong. Concerted elevation of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 298, n. 3, p. 317-323, 2002.

MICHAL, J. J. et al., The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal genetics**, v. 37, n. 4, p. 400-402, 2006.

MISZTAL, I.; LEGARRA, Andres; AGUILAR, I. Using recursion to compute the inverse of the genomic relationship matrix. Journal of dairy science, v. 97, n. 6, p. 3943-3952, 2014.

MOLIK, K.; GURGUL, A. Genome-wide RNA-Seq analysis of breast muscles of two broiler chicken groups differing in shear force. **Animal Genetics**, v.47, n.1, p. 68-80, 2015.

MAGNABOSCO, C. de U. et al. **Catálogo de linhagens do germoplasma zebuíno: raça Nelore**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1997.

NTAMBI, J. M. Regulation of Estearoil CoA Dessaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **Journal of Lipid Research**, Rockville, v. 40, n. 9, p. 1549-1558, 1999.

NTAMBI, James M.; MIYAZAKI, Makoto. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 2, p. 91-104, 2004.

NOVAIS, Caroline M.; PIRES-ALVES, Melissa; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

NYGARD, Ann-Britt et al., Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. **BMC molecular biology**, v. 8, n. 1, p. 67, 2007.

OKA, A. et al., Genetic effects on fatty acid composition of carcass fat of Japanese Black Wagyu steers. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 4, p. 1005-1011, 2002.

O'QUINN, T. G. et al. Consumer assessment of beef strip loin steaks of varying fat levels. Journal of Animal Science, v. 90, n. 2, p. 626-634, 2012.

PARK, Seung Ju et al. Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle—a review. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 7, p. 1043, 2018.

PANNIER, L. et al. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred Bos taurus cattle. **Meat science**, v. 85, n. 3, p. 515-518, 2010.

PAZ, CCP de; LUCHIARI FILHO, A. Melhoramento genético e diferenças de raças com relação à qualidade da carne bovina. **Pecuária de corte**, v. 101, p. 58-63, 2000.

PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

PICARD, Brigitte et al. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect. **PeerJ**, v. 6, p. e4891, 2018.

PICKWORTH, C. L. et al., Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. **Journal of animal science**, v. 89, n. 2, p. 355-366, 2011.

.

PIORKOWSKA, K.; ŻUKOWSKI, K.; NOWAK, J.; POŁTOWICZ, K.; ROPKA-MOLIK, K.; GURGUL, A. Genome-wide RNA-Seq analysis of breast muscles of two broiler chicken groups differing in shear force. **Animal Genetics**, v.47, n.1, p. 68-80, 2015.

POLETI, Mirele D. et al. Longissimus thoracismuscle label-free quantitative proteomic reveals biological mechanisms associated with intramuscular fat deposition. **Journal of proteomics**, v. 179, p. 30-41, 2018.

PONCE-CASTAÑEDA, M. V.; LÓPEZ-CASILLAS, F.; KIM, K. Acetyl-coenzyme A carboxylase messenger ribonucleic acid metabolism in liver, adipose tissues, and mammary glands during pregnancy and lactation. **Journal of dairy science**, v. 74, n. 11, p. 4013-4021, 1991.

PRATT, Julie M. et al. Dynamics of Protein Turnover, a Missing Dimension in Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 8, p. 579-591, 2002.

QI, Yanfei et al., CDP-diacylglycerol synthases regulate the growth of lipid droplets and adipocyte development. **Journal of lipid research**, v. 57, n. 5, p. 767-780, 2016.

RAUCH, A. et al. Computational Proteomics Analysis System (CPAS): an extensible, open-source analytic system for evaluating and publishing proteomic data and high throughput biological experiments. Journal of proteome research, v. 5, n. 1, p. 112-121, 2006.

REGITANO, LC de A.; COUTINHO, L. L. Biologia molecular aplicada à produção animal. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2001.

RESTLE, João et al., Características de carcaça e da carne de vacas de descarte de diferentes genótipos Charolês x Nelore, terminadas em confinamento. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, 2003.

ROGERS, S.; GIROLAMI, M.; KOLCH, W.; WATERS, K. M.; LIU, T.; THRALL, B.; WILEY, H. S. Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic

expression profiles using coupled cluster models. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 2894-2900, 2008.

ROLLIN, Xavier et al., Short-and long-term nutritional modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 803-810, 2003.

RULE, D. C.; MACNEIL, M. D.; SHORT, R. E. Influence of sire growth potential, time on feed, and growing-finishing strategy on cholesterol and fatty acids of the ground carcass and longissimus muscle of beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 6, p. 1525-1533, 1997.

SALVATO, Fernanda et al. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. Ciência Rural, p. 727-734, 2010.

SALTIEL, Alan R.; KAHN, C. Ronald. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799, 2001.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 467, 1995.

SCHERING, Lisa et al., Increased expression of thyroid hormone responsive protein (THRSP) is the result but not the cause of higher intramuscular fat content in cattle. **International journal of biological sciences**, v. 13, n. 5, p. 532, 2017.

SCHOONJANS, Kristina et al., PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **The EMBO journal**, v. 15, n. 19, p. 5336-5348, 1996.

SCOLLAN, Nigel et al. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. **Meat science**, v. 74, n. 1, p. 17-33, 2006.

SHACKELFORD, S. D. et al. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. **Journal of animal science**, v. 72, n. 4, p. 857-863, 1994.

SHAHIDI, F. Lipid-derived flavors in meat products. **Meat Processing: Improving Quality (Ed. J. Kerry, J. Kerry and D. Ledward). Woodhead Publishing Ltd, Cambridge**, p. 105-121, 2002.

SHANNON, Paul et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHEN, Ning et al. An early response transcription factor, Egr-1, enhances insulin resistance in type 2 diabetes with chronic hyperinsulinism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 16, p. 14508-14515, 2011.

SHEN, Wen-Jun et al., Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5528-5532, 1999.

SHEN, Y. N. et al., Proteome analysis of bovine longissimus thoracismuscle associated with the marbling score. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 25, n. 8, p. 1083, 2012.

SHTIVELMAN, Emma. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. **Oncogene**, v. 14, n. 18, p. 2167, 1997.

SILVA, D. B. S et al. Transcriptome profiling of muscle in Nelore cattle phenotypically divergent for the ribeye muscle area. **Genomics**, v. 1, p. 1, 2019.

SILVA, D. B. S et al. Prediction of hub genes associated with intramuscular fat content in Nelore cattle. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 520, 2019b.

SMITH, S.; WITKOWSKI, A.; JOSHI, A. K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. **Progress in lipid research**, v. 42, n. 4, p. 289-317, 2003.

SORET, B. et al., Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. **animal**, v. 10, n. 12, p. 2018-2026, 2016.

SOUZA, J. C. et al. Tendências ambientais e genéticas para características produtivas de bovinos da raça Nelore. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 16, n. 2, p. 85-90, 2008.

SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. **European journal of medical research**, v. 2, n. 11, p. 457-464, 1997.

STEIBEL, Juan Pedro et al. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification qRT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146-152, 2009.

STEPHENS, Jacqueline M.; MORRISON, Ron F.; PILCH, Paul F. The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 18, p. 10441-10444, 1996.

STEWART, William C. et al. Regulation of signal transducers and activators of transcription (STATs) by effectors of adipogenesis: Coordinate regulation of STATs 1, 5A, and 5B with peroxisome proliferator-activated receptor-γ and C/AAAT enhancer

binding protein-α. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1452, n. 2, p. 188-196, 1999.

STOECKLIN, E. et al., Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 69, n. 1-6, p. 195-204, 1999.

TAKAHASHI, N.; GOTO, T.; KUSUDO, T.; MORIYAMA, T.; KAWADA, T. The structures and functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). **Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine**, v. 63, n. 4, p. 557-564, 2005.

TANG, F.; LAO, K.; SURANI, M. A. Development and applications of single-cell transcriptome analysis. **Nature methods**, v. 8, n. 4s, p. S6, 2011.

TANTIA, Madhu S. et al., DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (Bos indicus) and buffalo (Bubalus bubalis) breeds. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 1, p. 32, 2006.

TEGLUND, Stephan et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 841-850, 1998.

TIAN, Qiang et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 960-969, 2004.

TIZIOTO, Polyana Cristine et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological genomics**, v. 45, n. 21, p. 1012-1020, 2013.

THALLER, G. et al., DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal genetics**, v. 34, n. 5, p. 354-357, 2003.

THIEL, Gerald; CIBELLI, Giuseppe. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. Journal of cellular physiology, v. 193, n. 3, p. 287-292, 2002.

THOMPSON, J. M. The effects of marbling on flavour and juiciness scores of cooked beef, after adjusting to a constant tenderness. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, n. 7, p. 645-652, 2004.

TYERS, Mike; JORGENSEN, Paul. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 1, p. 54-64, 2000.

UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE 2000. **United States Standards for Grades of Feeder Cattle**. Secretary of Agriculture, Washington, United States. Retrieved on 26 Novembror 2017, Disponível em: .

VALASEK, Mark A.; REPA, Joyce J. The power of real-time PCR. **Advances in physiology education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VALLEDOR, Luis; JORRÍN, Jesús. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 1-18, 2011.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative qRT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 2002.

VEERKAMP, J. H.; VAN MOERKERK, H. T. B. Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. In: **Cellular Fatty Acid-Binding Proteins II**. Springer, Boston, MA, 1993. p. 101-106.

VURAL, Burcak et al., Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome. **Cardiovascular Pathology**, v. 17, n. 6, p. 392-398, 2008.

WANG, Y. H. et al., Transcriptional profiling of muscle tissue in growing Japanese Black cattle to identify genes involved with the development of intramuscular fat. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 45, n. 8, p. 809-820, 2005.

WANG, Hong; ECKEL, Robert H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 2, p. E271-E288, 2009.

WANG, Yong Hong et al. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 119-130, 2009.

WANG, Linjie et al., Molecular characterization and different expression patterns of the FABP gene family during goat skeletal muscle development. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 1, p. 201-207, 2015.

WANG, Zhen et al., A genome-wide scan for selection signatures in Yorkshire and Landrace pigs based on sequencing data. **Animal genetics**, v. 45, n. 6, p. 808-816, 2014.

WINTER, Andreas. **Genomic characterization of genes encoding diacylglycerol acyltransferase activity in cattle and swine**. 2003. Tese de Doutorado. Technische Universität München.

WONG, Marisa L.; MEDRANO, Juan F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

WOOD, J. D. et al. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. **Meat science**, v. 78, n. 4, p. 343-358, 2008.

XIAO, Hua et al. A cofactor, TIP30, specifically enhances HIV-1 Tatactivated transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2146-2151, 1998.

YAMASHITA, Atsushi et al., Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. **Progress in lipid research**, v. 53, p. 18-81, 2014.

YANG, Chao et al., The response of gene expression associated with lipid metabolism, fat deposition and fatty acid profile in the longissimus thoracismuscle of Gannan yaks to different energy levels of diets. PloS one, v. 12, n. 11, p. e0187604, 2017.

YIN, Liya; ZHANG, Yanqiao; HILLGARTNER, F. Bradley. Sterol regulatory element-binding protein-1 interacts with the nuclear thyroid hormone receptor to enhance acetyl-CoA carboxylase-α transcription in hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19554-19565, 2002.

YELLATURU, Chandrahasa R. et al., Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP)· SREBF1complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31726-31734, 2009.

YOKOO, M.J.; LOBO, R.B.; ARAÚJO, F.R.C.; BEZERRA, L.A.F.; SAINZ, R.D.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic associations between carcass traits measured by real-time ultrasound and scrotal circumference and growth traits in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 52-58, 2010.

YU, Yi-Hao; GINSBERG, Henry. The role of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) in energy metabolism. **Annals of medicine**, v. 36, n. 4, p. 252-261, 2004.

YUAN, G.C; MA, P; ZHONG, W; LIU, J.L. Statistical assessment of the global regulatory role of histone acetylation in Saccharomyces cerevisiae. **Genome Biology**, v. 7, p. R70, 2006.

ZEMBAYASHI, M. et al., Effect of breed type and sex on the fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular lipids of finishing steers and heifers. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 11, p. 3325-3332, 1995.

ZHANG, Shu et al., DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition 1. **Animal genetics**, v. 39, n. 1, p. 62-70, 2008.

ZHANG, Qiankun et al. Differentially expressed proteins during fat accumulation in bovine skeletal muscle. **Meat science**, v. 86, n. 3, p. 814-820, 2010a.

ZHANG, Shu et al., Associations of polymorphisms in the promoter I of bovine acetyl-CoA carboxylase-α gene with beef fatty acid composition. **Animal genetics**, v. 41, n. 4, p. 417-420, 2010b.

ZHANG, Y.; ZAN, L.; WANG, H. B. Rastreamento de genes candidatos relacionados ao caráter de maciez em bovinos da raça Qinchuan por genoma. **Relatórios de biologia molecular**, v. 38, n. 3, p. 2007-2014, 2011.

ZHANG, Chengliang et al. A novel TIP30 protein complex regulates EGF receptor signaling and endocytic degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9373-9381, 2011.

ZHANG, Ying-Ying et al. Transcriptome analysis of mRNA and microRNAs in intramuscular fat tissues of castrated and intact male Chinese Qinchuan cattle. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0185961, 2017.

ZHANG, WeiWei et al. Transcription factor EGR1 promotes differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by regulating MyoG gene expression. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 1, p. 350-362, 2018.

ZHAO, Jian et al. TIP30/CC3 expression in breast carcinoma: relation to metastasis, clinicopathologic parameters, and P53 expression. **Human pathology**, v. 38, n. 2, p. 293-298, 2007.

ZHAO, S. M. et al. Differential expression of lipid metabolism related genes in porcine muscle tissue leading to different intramuscular fat deposition. **Lipids**, v. 44, n. 11, p. 1029, 2009.

ZHAO, Su-Mei et al. Expression levels of candidate genes for intramuscular fat deposition in two Banna mini-pig inbred lines divergently selected for fatness traits. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 783-789, 2012.

ZHOU, Bing et al. Proteomic analysis reveals that lysine acetylation mediates the effect of antemortem stress on postmortem meat quality development. Food chemistry, v. 293, p. 396-407, 2019

## 12 MATERIAL SUPLEMENTAR

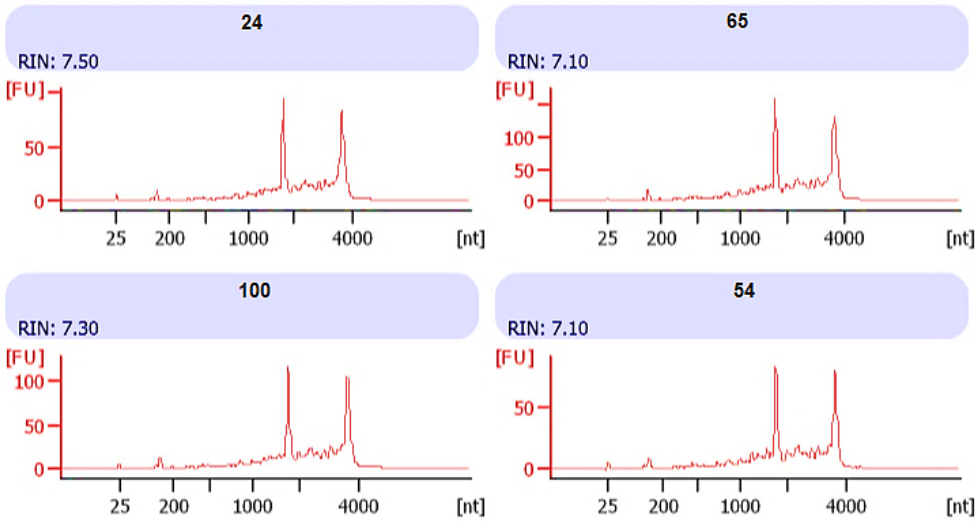



**Figura 1**: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas para a característica de marmoreio.

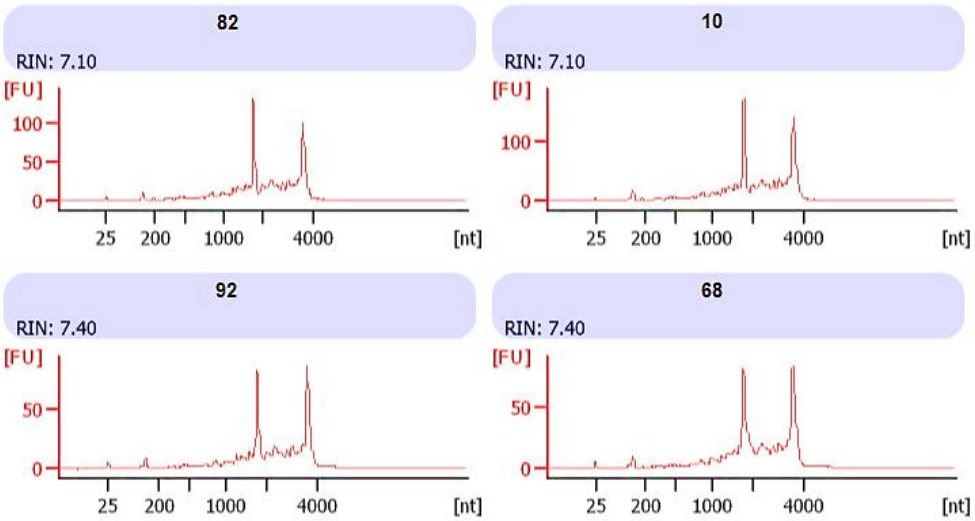



**Figura 2**: Eletroferograma e RIN obtidos para algumas amostras de RNA total extraídas para a característica de lipídios.

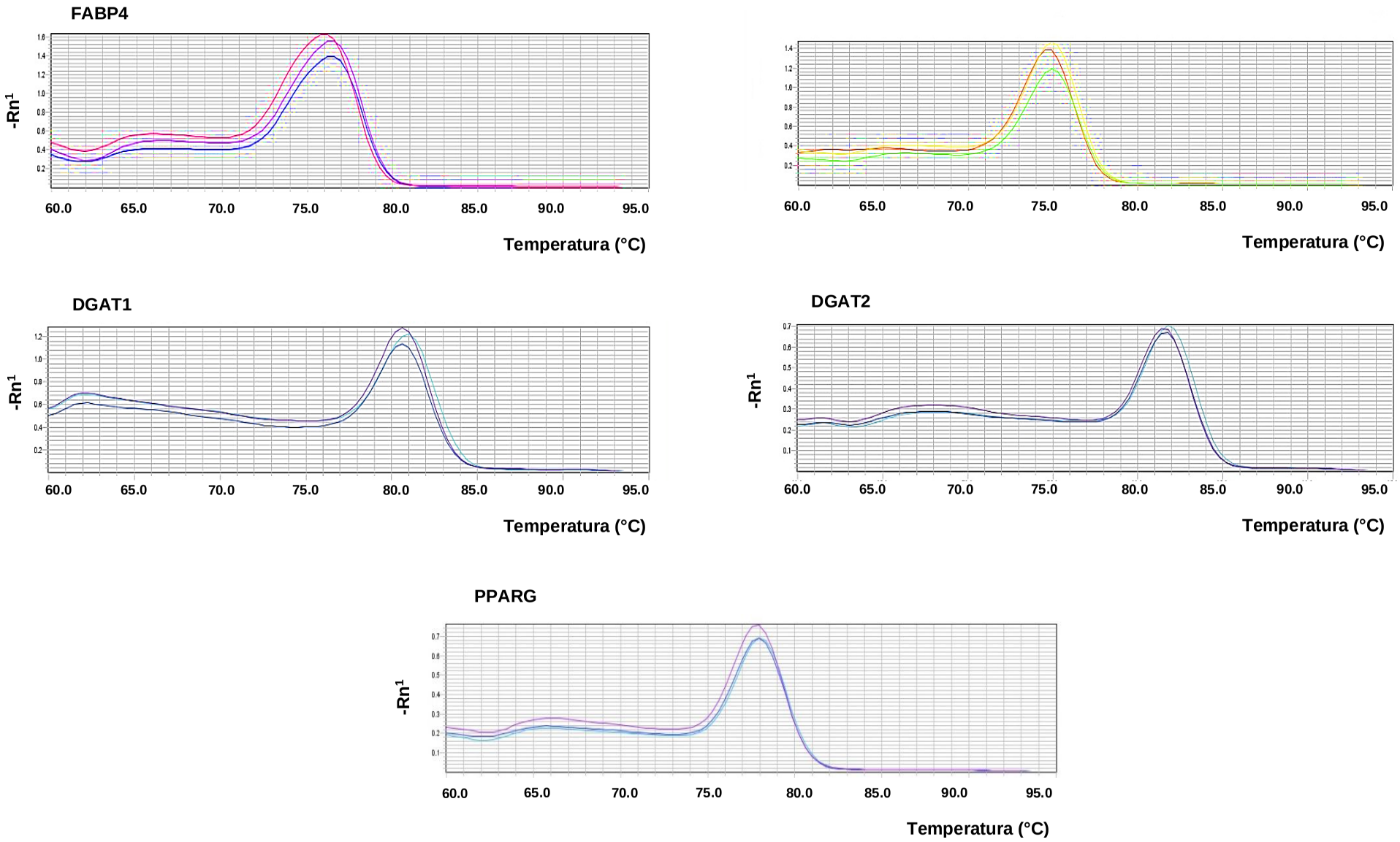



**Figura 3.** Validação dos oligonucleotídeos através do padrão de dissociação obtido após RT-qPCR. Amplificação dos cDNAs de um pool de cDNA dos genes alvos relacionados a marmorização: FABP4, SCD, DGAT1, DGAT2, PPARG

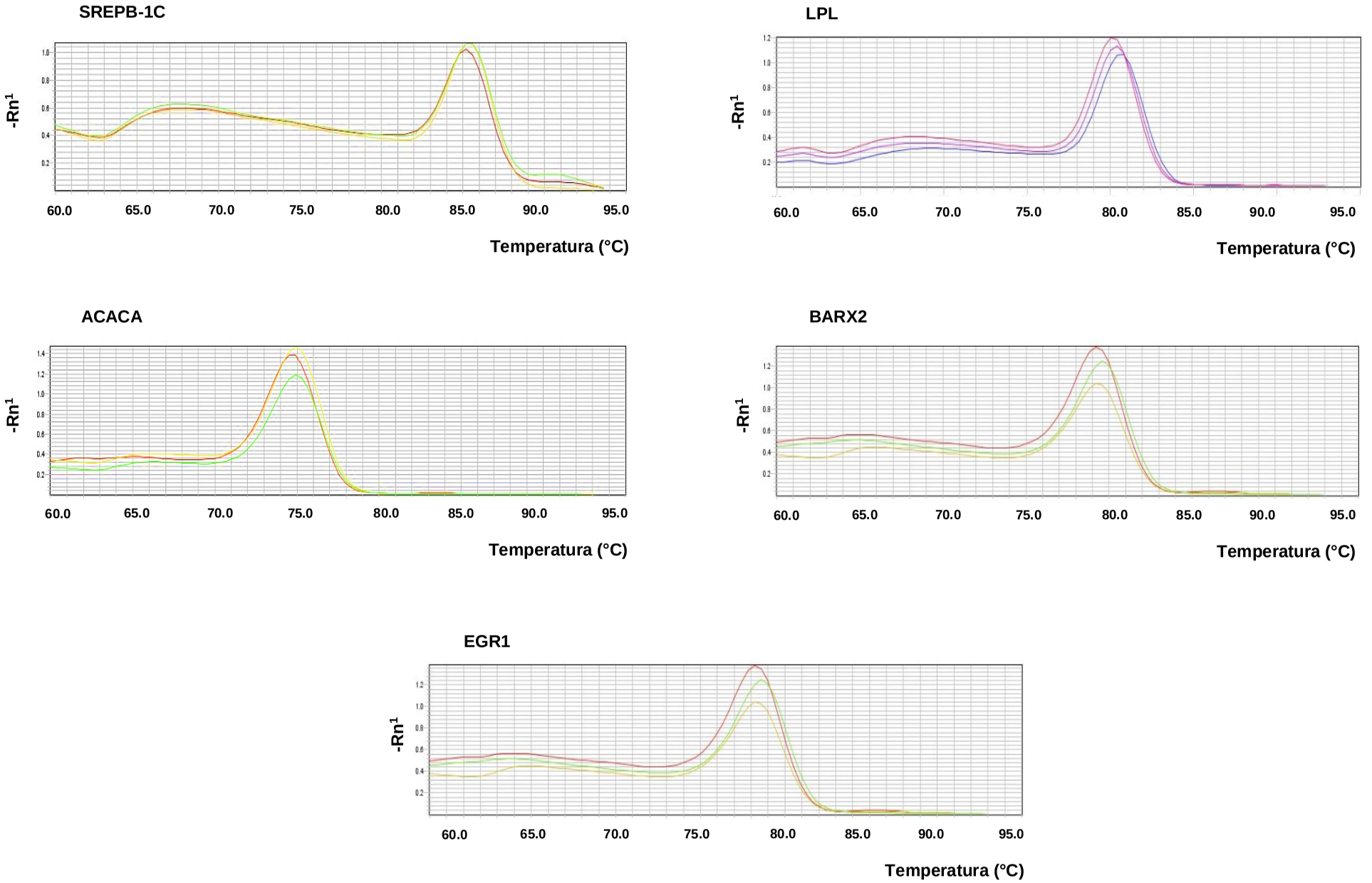



**Figura 4.** Validação dos oligonucleotídeos através do padrão de dissociação obtido após RT-qPCR. Amplificação dos cDNAs de um pool de cDNA dos genes alvos relacionados a lipídios: SREBP-1C, LPL, ACACA, BARX2, EGR1.

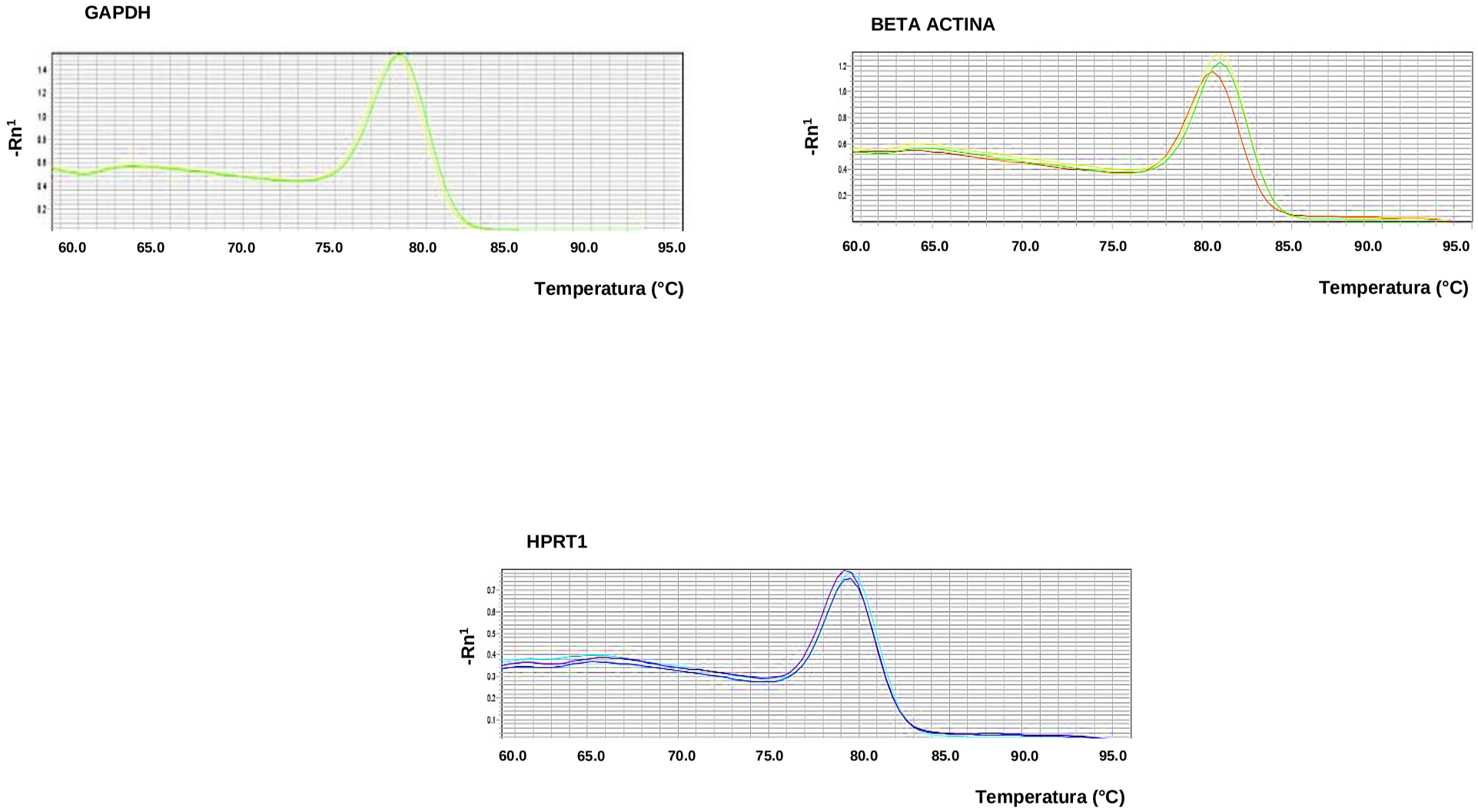
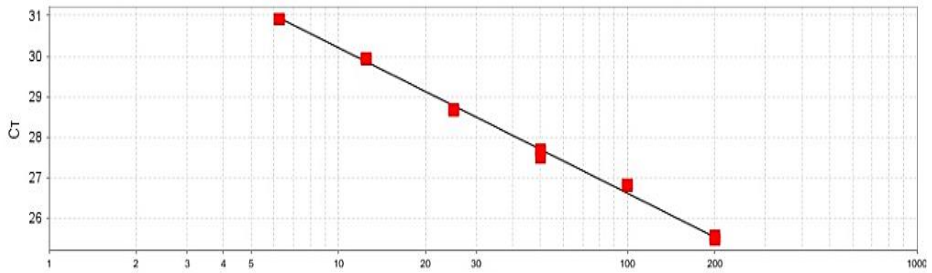
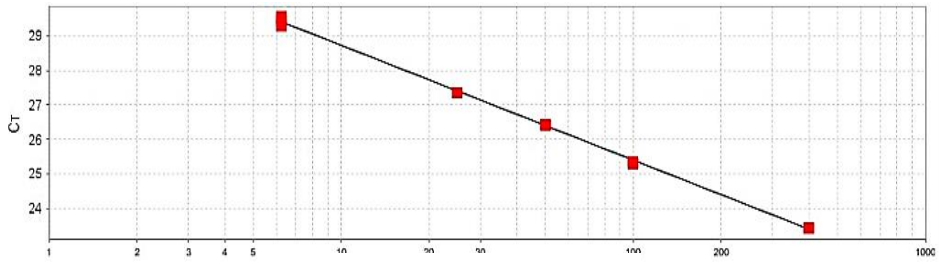
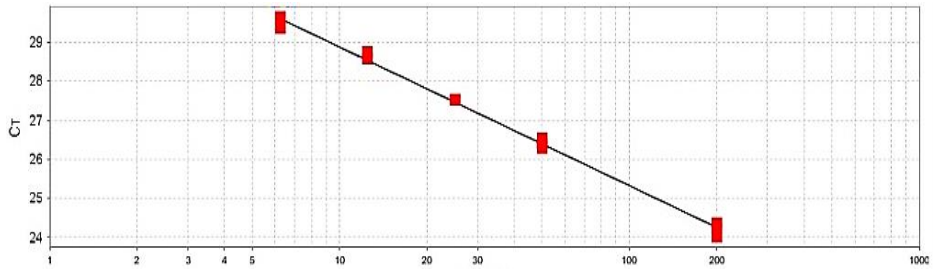
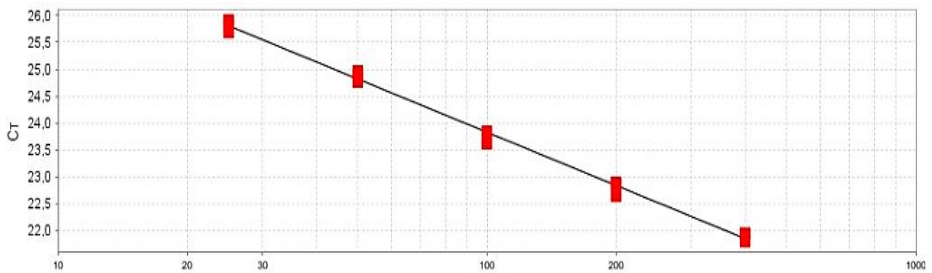



**Figura 5.** Validação dos oligonucleotídeos através do padrão de dissociação obtido após RT-qPCR. Amplificação dos cDNAs de um pool de cDNA dos genes de referência: GAPDH, BETA ACTINA e HPRT1, EGR1.



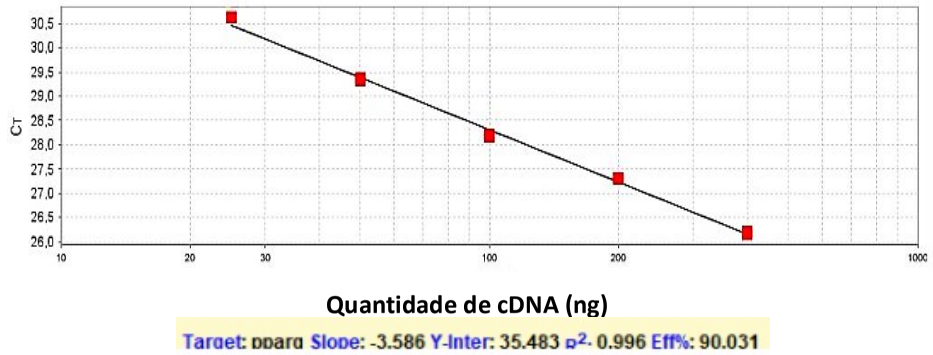
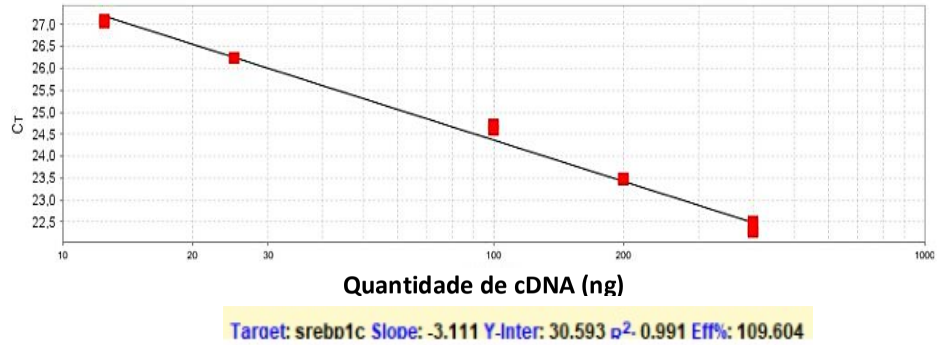
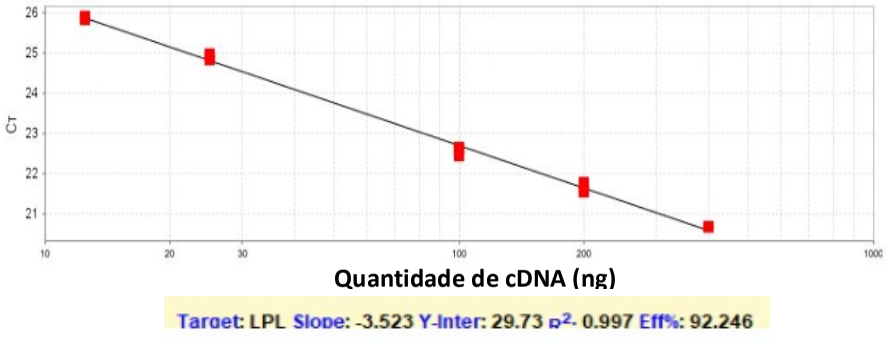
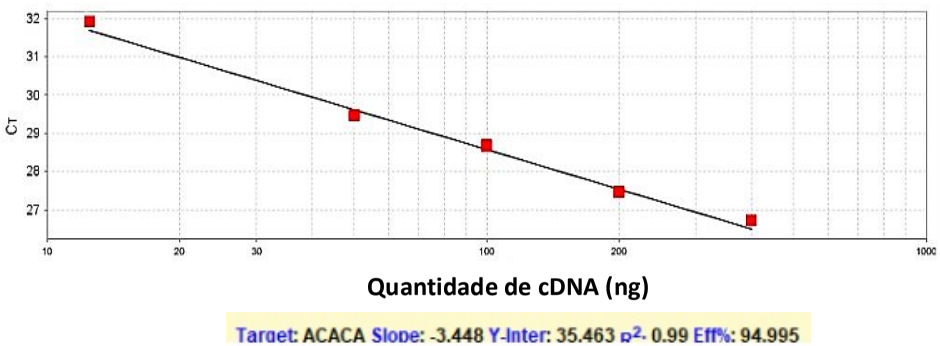
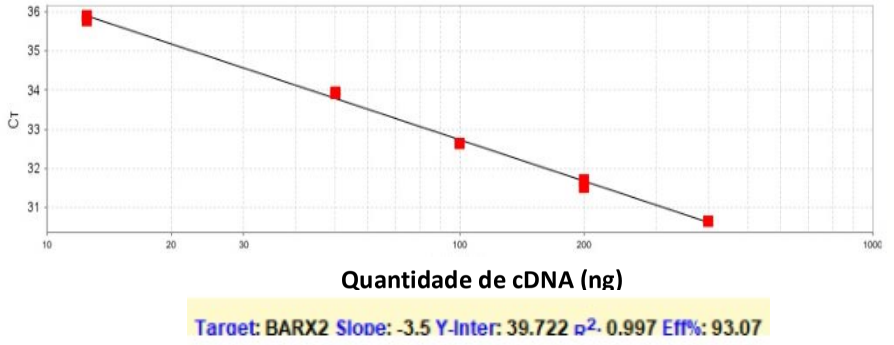




**Figura 6.** Curva de diluição dos FABP4, SCD, DGAT1, DGAT2, PPARG



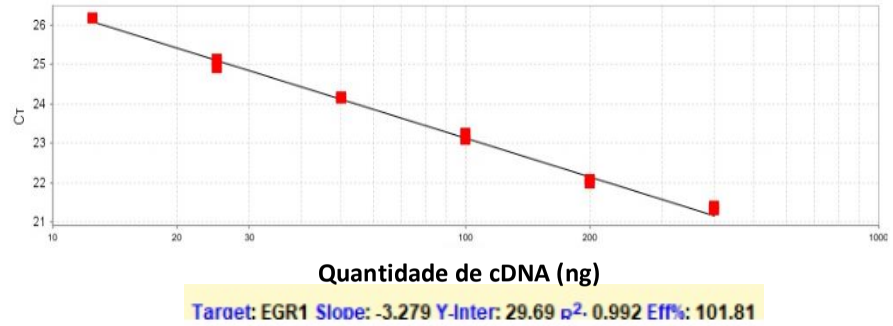
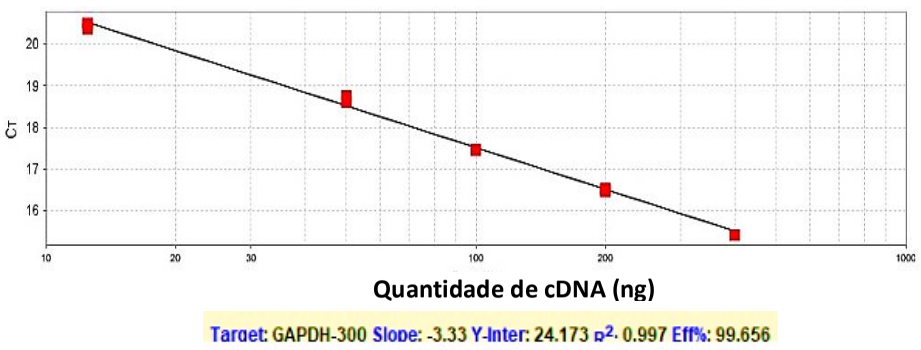
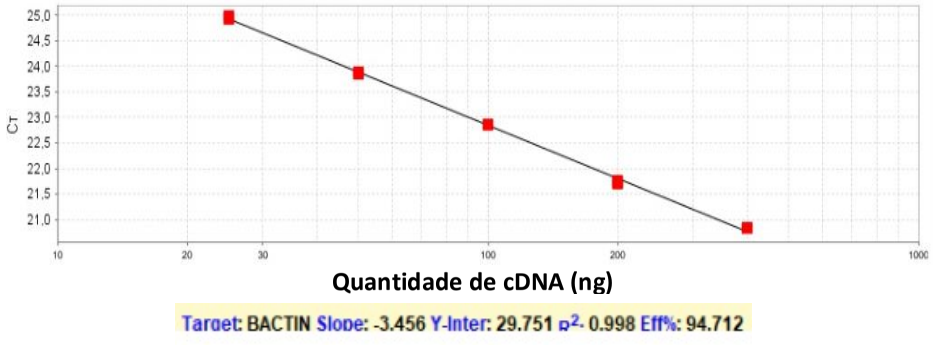




**Figura 7.** Curva de diluição dos SREBP-1C, LPL, ACACA, BARX2, EGR1



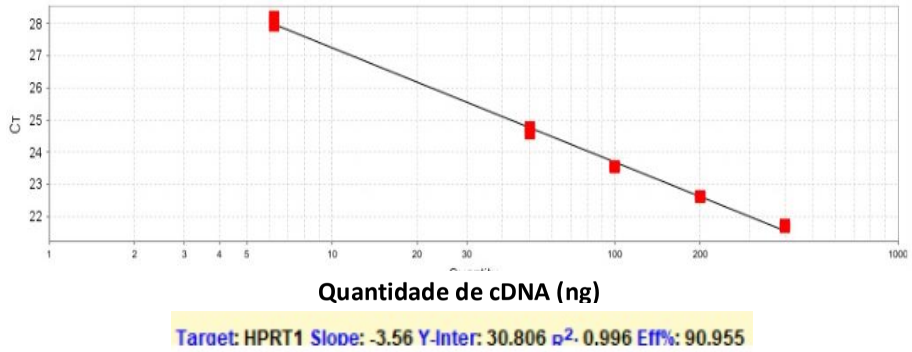




**Figura 8.** Curva de diluição dos genes GAPDH, BETA ACTINA, e HPRT1