

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NA FASE DE CRIA SOBRE
A COEXPRESSÃO DE GENES TRANSCRITOS NO
MÚSCULO *Longissimus thoracis* DE BEZERROS F1
ANGUS X NELORE À DESMAMA**

Henrique Gonçalves Reolon

Zootecnista

**D
I
S
S.**

/

**R
E
O
L
O
N**

**H.
G.**

**2
0
2
5**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NA FASE DE CRIA SOBRE
A COEXPRESSÃO DE GENES TRANSCRITOS NO
MÚSCULO *Longissimus thoracis* DE BEZERROS F1
ANGUS X NELORE À DESMAMA**

Henrique Gonçalves Reolon

Orientador: Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

2025

R424e

Reolon, Henrique Gonçalves

Efeito da suplementação na fase de cria sobre a coexpressão de genes transcritos no músculo Longissimus thoracis de bezerros F1 Angus x Nelore à desmama / Henrique Gonçalves Reolon. -- Jaboticabal, 2025

74 p. : il., tabs.

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

Orientador: Rogerio Abdallah Curi

1. Bos indicus. 2. Creep-feeding. 3. Rutrigenômica. 4. Qualidade de carne. 5. Transcriptoma. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

A pesquisa revela mecanismos biológicos envolvidos na deposição de músculo e gordura em bovinos suplementados na fase de cria, contribuindo para avanços na nutrição animal. Além disso, as evidências fornecidas auxiliam técnicos a traçarem estratégias mais eficientes para a produção de carne de maior valor agregado, beneficiando a cadeia produtiva e fortalecendo a competitividade da pecuária nacional.

Potential impact of this research

The research reveals the biological mechanisms involved in the deposition of muscle and fat in cattle supplemented during the cow-calf phase, contributing to advances in animal nutrition. In addition, the evidence provided helps technicians to devise more efficient strategies for producing meat with greater added value, benefiting the production chain and strengthening the competitiveness of national livestock.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NA FASE DE CRIA SOBRE A COEXPRESSÃO DE GENES TRANSCRITOS NO MÚSCULO *Longissimus thoracis* DE BEZERROS F1 ANGUS X NELORE À DESMAMA

AUTOR: HENRIQUE GONÇALVES REOLON**ORIENTADOR: ROGERIO ABDALLAH CURI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Genética e Melhoramento Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ROGERIO ABDALLAH CURI**
Data: 20/02/2025 16:07:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ROGERIO ABDALLAH CURI (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutricao Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
 **GERMAN DARIO RAMIREZ ZAMUDIO**
Data: 20/02/2025 19:00:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. GERMÁN DARÍO RAMÍREZ ZAMUDIO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FZEA USP Pirassununga/SP

Documento assinado digitalmente
 **GUILHERME LUIS PEREIRA**
Data: 21/02/2025 14:51:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. GUILHERME LUIS PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutricao Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Henrique Gonçalves Reolon, filho de Ademir Paulo Reolon e Rosileia Gonçalves de Souza, nasceu em Cerejeiras – Rondônia em 16 de janeiro de 2000. Ingressou no curso Técnico em Agropecuária Integrado ao Ensino Médio no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – Campus Colorado do Oeste em fevereiro de 2015, obtendo o título de Técnico em Agropecuária em março de 2018. Iniciou o curso de Bacharelado em Zootecnia no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – *Campus* Colorado do Oeste em março de 2018, obtendo o título de Bacharel em Zootecnia em dezembro de 2022. Em janeiro de 2023 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), *Campus* Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi. Foi bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante a realização do curso de Mestrado.

EPÍGRAFE

“Tudo quanto te vir à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra nem projeto, nem ciência, nem sabedoria alguma”.

(Eclesiastes 9:10)

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Daiane Germini de Souza. A meu pai, Ademir Paulo Reolon e a minha mãe, Rosileia Gonçalves de Souza. E a meus irmãos Felipe Gonçalves Reolon e Aline Gonçalves Reolon.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela concessão e manutenção da minha vida, bem como pela saúde física e mental indispensável para a conclusão desta e de outras etapas, já vivenciadas, da minha jornada acadêmica.

A minha esposa Daiane, pelo amor, carinho e companheirismo em todas as etapas da minha vida nos últimos oito anos, sendo um apoio emocional indispensável.

A meus pais, Ademir e Rosileia, pelo amor, carinho e dedicação na educação minha e de meus irmãos, nos ensinando princípios e valores, os quais trago sempre comigo. Ademais, agradeço o apoio incondicional aos meus estudos, sendo essenciais para todos os meus êxitos.

A meus irmãos, Felipe e Aline, por todo o companheirismo e pela nossa união.

Aos meus colegas e amigos, principalmente àqueles do Instituto Federal de Rondônia - Campus Colorado do Oeste e do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNESP – Jaboticabal.

A todos os docentes e técnicos administrativos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – *Campus* Colorado do Oeste, por todos os conhecimentos transmitidos durante o curso Técnico em Agropecuária Integrado ao Ensino Médio e curso superior de Bacharelado em Zootecnia.

A todos os meus orientadores de iniciação científica, professor Dr. Túlio Otávio Jardim D’Almeida Lins, professora Dra. Lorryny Galoro da Silva, professor Dr. Eduardo Marostegan de Paula e professora Dra. Nedenia Bonvino Stafuzza, pelos ensinamentos e incentivo constante para continuidade na carreira acadêmica.

A todos pesquisadores e funcionários do Instituto de Zootecnia de Sertãozinho-SP, onde realizei grande parte das minhas iniciações científicas e desenvolvi ainda mais meu amor pela ciência animal.

A todos os docentes e demais servidores que atuam no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UNESP – Jaboticabal, em especial ao professor Dr. Guilherme Luis Pereira e ao meu orientador, professor Dr. Rogério Abdallah Curi, por toda atenção e ensinamentos ao longo dos últimos dois anos.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto, processo nº 19/22721-3.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa CAPES-PROEX.

A todos os supracitados, meu muito obrigado! Cada um de vocês foi essencial para que eu chegasse até aqui.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Produção de carne bovina no Brasil	2
2.2 Desenvolvimento dos tecidos muscular, adiposo e conjuntivo	3
2.3 Qualidade da carne.....	5
2.4 Suplementação de bezerros na fase de cria por meio de creep-feeding	7
2.5 Efeitos da dieta sobre a expressão gênica	9
2.6 Metabolismo lipídico em bovinos	11
2.7 Análises de coexpressão gênica.....	14
3 REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2 - Efeito da suplementação na fase de cria sobre a coexpressão de genes transcritos no músculo Longissimus thoracis de bezerros F1 Angus x Nelore à desmama.....	26
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Animais e tratamentos	28
2.2 Coleta de tecido muscular e análises de qualidade da carcaça e da carne	30
2.3 Análise estatística de dados de peso, ganho de peso, carcaça e carne	31
2.4 Extração e sequenciamento de RNA	31
2.5 Mapeamento das sequências no genoma de referência.....	32
2.6 Determinação dos módulos de coexpressão	32
2.7 Análises subsequentes complementares.....	34
3 RESULTADOS	35
3.1 Desempenho e qualidade da carcaça e da carne	35

3.2	Sequenciamento de RNA e mapeamento das reads no genoma de referência	35
3.3	Módulos de coexpressão	36
4	DISCUSSÃO	41
4.1	Módulo 1	41
4.1.1	Vias metabólicas e processos biológicos enriquecidos de destaque	42
4.1.2	Hubs genes de destaque	43
4.2	Módulos 2 e 3	45
4.2.2	Hubs genes de destaque	48
5	CONCLUSÃO	52
6	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICES	59

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NA FASE DE CRIA SOBRE A COEXPRESSÃO DE GENES TRANSCRITOS NO MÚSCULO *Longissimus thoracis* DE BEZERROS F1 ANGUS X NELORE À DESMAMA

RESUMO - Diferentes estratégias têm sido utilizadas para aumentar a deposição de gordura intramuscular na carne bovina produzida no Brasil, principalmente da raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos, visando melhorar a qualidade do produto final, entre os quais o *creep-feeding* (sistema de suplementação de bezerros na fase de cria). Inexistem pesquisas que avaliaram o efeito do *creep-feeding* sobre a coexpressão gênica no músculo de bovinos de corte. Desta forma, este estudo teve como objetivo analisar as diferenças na coexpressão gênica ao desmame de bovinos mestiços submetidos a diferentes tratamentos na fase de cria. Foram utilizados 48 bezerros mestiços Angus-Nelore, não castrados, meios-irmãos, mantidos a partir dos 30 dias de idade até o desmame em dois tratamentos (n=24/tratamento): grupo 1 ou controle (G1) – sem *creep feeding*; e grupo 2 (G2) – com *creep feeding*. Os animais foram desmamados aos 210 dias e, em seguida, terminados em confinamento por 180 dias recebendo dieta contendo 12,6% de volumoso e 87,4% de concentrado à base de milho. A partir de amostras do músculo *Longissimus thoracis* (LT) do lado esquerdo da carcaça, coletadas ao abate, foram analisadas características da carcaça e da carne de todos os animais do experimento. Os grupos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para peso à desmama – PD ($228,92 \pm 5,07$ vs $243,57 \pm 5,70$), espessura de gordura subcutânea – EGS ($12,96 \pm 0,83$ vs. $10,61 \pm 0,42$), porcentagem de lipídeos – %G ($4,95 \pm 0,20$ vs $5,80 \pm 0,23$) e índice de marmorização – IM ($321,50 \pm 13,65$ vs $366,11 \pm 12,39$). Entretanto, os pesos no início do experimento e ao abate (390 dias) não diferiram. A partir de alíquotas do LT de biópsias da meia carcaça direita, coletadas à desmama, foram gerados transcritos, por meio de RNA-Seq, de 12 indivíduos de cada grupo. A análise de coexpressão gênica foi conduzida considerando os transcritos das 24 amostras por meio do pacote CEMiTool v. 1.28.0 no ambiente do software R. A determinação dos módulos de genes coexpressos foi realizada utilizando os arquivos de: matriz de contagem (transcritos gênicos x amostras); anotação de amostras; conjuntos de genes de vias canônicas dos bancos de dados KEGG, WikiPathways e Reactome e de genes derivados da ontologia de Processos Biológicos do *Gene Ontology*; interações gênicas/proteicas para a espécie *Bos taurus*. Após a identificação dos módulos gênicos, foi conduzida a Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (*Gene Set Enrichment Analysis* – GSEA) para cada módulo de coexpressão. A análise de sobre representação (*Over Representation Analysis* – ORA) foi realizada para cada módulo, com as vias metabólicas e os processos biológicos, utilizando os pacotes clusterProfiler e enrichplot no ambiente do R. A rede de interação dos módulos, que é o resultado da integração das redes de coexpressão com dados de interactoma, foram identificados pelo CEMiTool; a partir desta análise o pacote retornou os genes *hubs* (genes com mais conexões dentro de cada módulo). Foram definidos sete módulos de coexpressão, dos quais cinco (M1, M2, M3, M4, e M6) tiveram atividades diferenciadas entre G1 e G2, identificadas por meio da Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes ($p.adjust < 0.002$). M1, M4, e M6 foram mais ativos no G1, enquanto M2 e M3 foram mais ativos no G2. Os módulos 1 (216 genes), 2 (145 genes) e 3 (76 genes) tiveram maior associação de

suas atividades com os tratamentos avaliados, constatado pelos valores de escore de enriquecimento normalizado (*Normalized Enrichment Score – NES*) da *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)*. Em cada um destes três módulos foram analisados os genes *hubs*, bem como as vias metabólicas e os processos biológicos enriquecidos. Os resultados encontrados mostraram que a falta de suplementação na fase de cria provocou o enriquecimento de processos biológicos como a Oxidação lipídica (GO:0034440), além de uma maior atividade de genes *hubs* como *CDKN1A*, *FOXO1* e *NAMPT*, os quais podem suprimir a miogênese e a adipogênese. Por outro lado a suplementação na fase de cria foi capaz de aumentar o peso à desmama, bem como a deposição das gorduras subcutânea e intramuscular ao abate. Neste contexto houve maior atividade dos genes *hubs* *ITGB6*, *REEP1*, *TPCN1*, *PPARA*, *PTPN11* e *MAP3K20*, além do enriquecimento de processos biológicos como Desenvolvimento do tecido muscular (GO:0060537) e Diferenciação de células de gordura (GO:0045444). Tais achados permitem concluir que a suplementação na fase de aleitamento foi capaz de refletir em aspectos do desempenho até a desmama, assim como da qualidade da carne, como o marmoreio, que é de expressão tardia. Ademais os genes *hubs* identificados, bem como as vias metabólicas e processos biológicos enriquecidos a partir dos módulos de maior correlação com os tratamentos, permitiram elucidar, ao menos em parte, os mecanismos biológicos envolvidos nestes processos fisiológicos.

Palavras-chave: *Bos indicus*, *creep-feeding*, nutrigenômica, qualidade de carne, transcriptoma

EFFECT OF SUPPLEMENTATION IN THE COW-CALF PHASE ON THE COEXPRESSION OF GENES TRANSCRIBED IN THE *Longissimus thoracis* MUSCLE OF F1 ANGUS X NELLORE CALVES AT WEANING

ABSTRACT - Various strategies have been used to increase the deposition of intramuscular fat in beef produced in Brazil, mainly from the Nelore breed (*Bos indicus*) and its crossbreeds, with the aim of improving the quality of the final product, including creep-feeding (a system of supplementation for calves during the calving phase). There is no research evaluating the effect of creep-feeding on gene coexpression in beef muscle. The aim of this study was to analyze the differences in gene coexpression at weaning in crossbred cattle subjected to different treatments in the cow-calf phase. 48 male, uncastrated, half-brother F1 Angus-Nelore calves were used and were maintained from 30 days of age until weaning in two treatments (n=24/treatment): Group 1 or control (G1) - without creep-feeding; G2 - with creep-feeding. The animals were weaned at 210 days of age and finished 180 days on a diet containing 12.6% roughage and 87.4% corn-based concentrate. Carcass and meat characteristics of all animals in the study were analyzed using samples of *longissimus thoracis* (LT) muscle from the left side of the carcass collected at slaughter. The groups showed significant differences ($p < 0.05$) for weaning weight - WW (228.92 ± 5.07 vs. 243.57 ± 5.70), backfat thickness - BFT (12.96 ± 0.83 vs. 10.61 ± 0.42), lipid percentage - %G (4.95 ± 0.20 vs. 5.80 ± 0.23) and marbling index - MI (321.50 ± 13.65 vs. 366.11 ± 12.39). However, the weights at the beginning of the experiment and at slaughter (390 days) were not different. From LT aliquots of right half carcass biopsies collected at weaning, transcriptomes were generated using RNA-Seq of 12 individuals from each group. Gene coexpression analysis was performed considering the transcripts of the 24 samples using the CEMITool v. 1.28.0 package in the R software environment. Co-expressed gene modules were determined using the following files: count matrix (gene transcripts x samples); sample annotation; sets of canonical pathway genes from the KEGG, WikiPathways, and Reactome databases and genes derived from the Gene Ontology Biological Processes ontology; gene/protein interactions for the species *Bos taurus*. After identifying the gene modules, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed for each co-expression module. The Over Representation Analysis (ORA) was performed for each module, with the metabolic pathways and biological processes, using the clusterProfiler and enrichplot packages in the R environment. The interaction network of the modules, resulting from the integration of the coexpression networks with the interactome data, was identified by CEMiTool; from this analysis, the package returned the hub genes (genes with the most connections within each module). Seven coexpression modules were defined, five of which (M1, M2, M3, M4, and M6) had different activities between G1 and G2, identified using Gene Set Enrichment Analysis ($p_{\text{adjust}} < 0.002$). M1, M4 and M6 were more active in G1, while M2 and M3 were more active in G2. Modules 1 (216 genes), 2 (145 genes) and 3 (76 genes) had a greater association of their activities with the treatments evaluated, as verified by the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) Normalized Enrichment Score (NES) values. In each of these three modules, the hub genes were analyzed, as well as the metabolic pathways and biological processes enriched. The results showed that the lack of supplementation in the rearing phase led to an increase in biological

processes such as lipid oxidation (GO:0034440), as well as increased activity of hub genes such as CDKN1A, FOXO1 and NAMPT, which can suppress myogenesis and adipogenesis. On the other hand, supplementation during the rearing phase was able to increase weaning weight, as well as subcutaneous and intramuscular fat deposition at slaughter. In this context, there was greater activity of the hub genes *ITGB6*, *REEP1*, *TPCN1*, *PPARA*, *PTPN11* and *MAP3K20*, as well as enrichment of biological processes such as Muscle tissue development (GO:0060537) and Fat cell differentiation (GO: 0045444). These findings lead us to conclude that supplementation during the suckling phase was able to affect aspects of performance until weaning, as well as meat quality, such as marbling, which is expressed later. In addition, the hub genes identified, as well as the metabolic pathways and biological processes enriched from the modules with the highest correlation with the treatments, made it possible to elucidate, at least in part, the biological mechanisms involved in these physiological processes.

Keywords: *Bos indicus*, Creep-feeding, nutrigenomics, meat quality, transcriptome

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gene Set Enrichment Analysis; Heatmap do valor NES, onde cor e circunferência indicam o escore de enriquecimento de cada módulo em cada grupo experimental.....37
- Figura 2.** Over Representation Analysis, onde a cor da barra representa o valor de p ajustado e o tamanho representa o número de genes que enriquecem a via. M1(a), M2(b) e M3 (c).....38
- Figura 3.** Análise de sobre-representação, onde a cor da barra representa o valor de p ajustado e o tamanho representa o número de genes que enriquecem o processo biológico. M1(a), M2(b) e M3 (c).39
- Figura 4.** Redes de interação gênica dos módulos 1(A) 2(B) e 3(C).40
- Figura 5.** Distribuição dos hubs genes na lista ranqueada de genes da GSEA nos módulos 1(a), 2(b) e 3(c).41

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A quantidade e a qualidade da carne produzida por um bovino são influenciadas por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os extrínsecos, destaca-se a dieta do animal, que proporciona a maior possibilidade de manipulação e representa efeitos mais expressivos na composição do produto (Guerrero et al., 2013). Assim, o fornecimento de nutrientes em todas as etapas da vida do animal é imprescindível para se obter um bom desenvolvimento corporal, e um produto de elevada qualidade (Wicks et al., 2019).

A estratégia nutricional denominada *creep-feeding* consiste no fornecimento de uma alimentação suplementar, à base de grãos, exclusivamente para bezerros ainda em fase de aleitamento (Stewart, 2017) a fim de se obter indivíduos mais pesados ao desmame, acelerar a deposição das gorduras de cobertura e entremeada e, assim, encurtar o tempo de acabamento da carcaça para o abate, além de fornecer descanso para a matriz (Dantas et al., 2010). Neste sentido, a suplementação durante a fase de cria (nascimento ao desmame), leva a adaptações metabólicas diferentes em relação aos animais que são desmamados sem suplementação (Scheffler et al., 2014).

A prática do *creep-feeding* tem aumentado o ganho de peso dos animais ao desmame no Brasil (Valente et al., 2012; Lopes et al., 2016; Barros et al., 2015), bem como em outros países (Viñoles et al., 2013; Moriel et al., 2017). Ademais, de acordo com Stewart (2017), foi demonstrado, por meio de diversos estudos, que a suplementação durante o aleitamento aumenta a gordura intramuscular, entretanto, para manter este aumento, é necessário que os animais permaneçam sendo alimentados com dietas contendo grãos até o abate.

A gordura intramuscular (marmoreio) é a definição dada às manchas brancas de gordura presentes na carne magra do músculo (ElMasry et al., 2012). Para mensuração desta característica a avaliação visual tem sido a mais utilizada pela indústria da carne, entretanto, a análise química tem sido aplicada como o método padrão para determinação do teor de gordura entremeada (Cheng et al., 2015), sendo

este um importante indicador da qualidade da carne, já que está relacionado a aspectos sensoriais como aparência, sabor e suculência (ElMasry et al., 2012). O marmoreio é o resultado da adipogênese e lipogênese, que modulam o número e o tamanho das células adiposas intramusculares, respectivamente. Segundo Moriel et al. (2014), a alimentação com uma dieta de alto concentrado imediatamente após o desmame precoce aumenta a expressão muscular de genes relacionados ao crescimento, bem como de genes adipogênicos.

Na bovinocultura em geral, sobretudo em raças taurinas, ferramentas moleculares têm sido amplamente empregadas nas últimas décadas com o intuito de obter informações a respeito de genes, processos biológicos e vias metabólicas relacionadas às características de interesse econômico, bem como à diferentes tratamentos aos quais os animais são submetidos. Aliados aos estudos de identificação de genes diferencialmente expressos, análises de coexpressão gênica são utilizadas a fim de entender melhor a interação e o perfil de expressão dos genes associados aos fenótipos e tratamentos. Estas análises apontam genes diferencialmente expressos identificados em estudos prévios, bem como outros genes que não são diferencialmente expressos, mas que estão relacionados à característica de interesse (Hudson et al., 2012). Diante de todo o exposto, o objetivo desta dissertação é avaliar a coexpressão gênica de transcritos no músculo *Longissimus thoracis* de bezerros F1 Angus- Nelore criados com ou sem suplementação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de carne bovina no Brasil

O Brasil destaca-se como líder mundial na pecuária bovina, com um rebanho comercial que supera os 238,6 milhões de animais, sendo um dos maiores produtores de carne, alcançando mais de dez milhões de toneladas métricas de equivalente carcaça anualmente (IBGE, 2024). As exportações de carne bovina em 2023 ultrapassaram 2,29 milhões de toneladas, representando cerca de 3% do total das exportações brasileiras (ABIEC, 2024). O país exportou, em 2023, para 157 países

em todos os continentes, com um valor acumulado próximo a US\$ 10,55 bilhões (ABIEC, 2024). Embora os números representem uma grande produção, há espaço para avanços no setor, especialmente em decorrência de melhorias na produtividade e na qualidade da carne brasileira.

Aspectos como a não uniformidade na idade de abate dos animais e baixos percentuais de gordura de cobertura e intramuscular da carne impactam diretamente na textura e no sabor do produto, influenciando a satisfação do consumidor (Sarcinelli et al., 2007). Neste sentido, investir na eficiência produtiva e na qualidade da carne brasileira são estratégias benéficas tanto econômicas quanto ambientais.

Aproximadamente 80% do rebanho de corte no país é composto por zebuínos (*Bos indicus*), sendo a raça Nelore predominante nas regiões tropicais (Evangelista et al., 2019). O uso desta raça se deve à sua boa adaptação ao clima tropical do país, a resistência a doenças e ectoparasitoses, sua rusticidade e ao bom desempenho produtivo nessas condições. Contudo, os zebuínos possuem um baixo potencial genético para a deposição de gordura intramuscular (marmoreio), resultando em uma carne considerada inferior em termos de maciez e sabor. Para enfrentar esse desafio, é comum o uso de cruzamentos entre zebuínos x bovinos europeus (*Bos taurus*), uma vez que esses animais apresentam melhor desempenho e características de carcaça e qualidade de carne superiores em comparação aos zebuínos puros (Wood, 2020). Assim, essa estratégia é amplamente adotada para aumentar a produtividade e os ganhos, especialmente em sistemas de confinamento.

2.2 Desenvolvimento dos tecidos muscular, adiposo e conjuntivo

Os tecidos musculares dos bovinos representam de 55 a 60% do peso total das carcaças e a hiperplasia das fibras musculares (número de fibras) nos animais é determinada no segundo trimestre de gestação (Picard e Gagaoua, 2020). Por outro lado, de forma geral é descrito que a hipertrofia do tecido muscular (crescimento de fibras) ocorra de forma mais acentuada até a puberdade, sendo dependente da proporção de adesão de células satélites (até 50%) que ocorre neste período (Lawrence e Fowler, 2002; Cunningham et al., 2004). Células satélites, são pequenas

células miogênicas mononucleadas, fusiformes, dispostas paralelamente às fibras musculares dentro da lâmina basal que envolve as fibras (Junqueira e Carneiro, 2023). Essas células contribuem para o crescimento do músculo no feto e no período pós-natal e são quiescentes no indivíduo adulto. Têm potencial para, quando ativadas, se diferenciarem em mioblastos, o que é estimulado por altas taxas de IGF-1 e citocinas, entre outros (Junqueira e Carneiro, 2023). Tendo em vista que as células satélites são gradualmente inativadas ao longo da vida do animal, o estímulo logo no início do crescimento pós-natal é de relevante importância, podendo levar ao desenvolvimento do tecido muscular e, conseqüentemente, a possíveis aumentos no ganho de peso e no rendimento de carcaça.

Em geral, a taxa de deposição de músculo diminui, enquanto a taxa de deposição de gordura aumenta, portanto, após a puberdade, quando o crescimento muscular é pequeno, chega-se ao ponto onde o ganho de peso é composto, basicamente, por gordura (Owens et al., 1995). Entretanto, o desenvolvimento do tecido adiposo não é uniforme, havendo sítios e momentos distintos para a sua deposição (Pethick et al., 2004). A deposição de gordura na carcaça inicia-se pela interna (abdominal, renal-inguinal e pélvica), seguida da intermuscular (entre os grupos musculares), da subcutânea (de cobertura) e por fim da gordura intramuscular (marmoreio/entremeada). Desta forma, estas deposições ocorrem em períodos específicos do desenvolvimento e, portanto, devem ser, se de interesse, estimuladas, uma vez que a formação pode desacelerar com a idade. Cabe ressaltar que a hiperplasia do tecido adiposo intramuscular (adipogênese) ocorre durante o terço final de gestação e, também, durante um período pós-parto de aproximadamente 250 dias, com redução gradual do desenvolvimento de novas células (Du et al., 2015).

O crescimento dos adipócitos, tanto por hiperplasia como por hipertrofia, ocorre primariamente no tecido adiposo visceral seguido pelo intermuscular, subcutâneo e intramuscular. O crescimento desses tecidos ocorre por meio da proliferação dos pré-adipócitos, o que influencia a formação de novos adipócitos maduros (hiperplasia), e, por fim, pelo aumento do tamanho e capacidade de armazenamento de lipídeos nos adipócitos maduros, a hipertrofia (Gomide et al., 2013). A hiperplasia dos adipócitos ocorre principalmente durante o final do desenvolvimento fetal e início da vida do

animal (Zhu et al., 2007). Após o nascimento observa-se o aumento do número de adipócitos intramusculares, com alterações significativas na transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico, incluindo a adipogênese, a síntese/esterificação de ácidos graxos (lipogênese) e a oxidação de ácidos graxos (lipólise) que alteram a transcrição de genes do metabolismo lipídico (Jeong et al., 2013).

Simultaneamente à adipogênese ocorre a fibrogênese, fase em que se origina os primórdios do tecido conjuntivo, responsável pela conexão entre células e órgãos. Assim, os adipócitos e os fibroblastos surgem em paralelo durante o período fetal, pois são oriundos de uma mesma célula progenitora (Du et al., 2015). As células mesenquimais se diferenciam em fibroadipogênicas e então em fibroblastos ou adipócitos (Junqueira e Carneiro, 2023). Ambos os processos (adipogênese e fibrogênese) estão fortemente associados à estrutura dos músculos, com efeito posterior direto sobre aspectos organolépticos da carne. Favorecer a proliferação de linhagens miogênicas, além da diferenciação majoritária de células progenitoras fibroadipogênicas em adipócitos, é de fundamental importância para obter-se carnes de melhor qualidade, com maior teor de gordura entremeada e redução de tecido conjuntivo. Desta maneira, é possível produzir carnes com maciez e palatabilidade superiores (Duarte et al., 2013). Para tanto, proporcionar a oferta de nutrientes em quantidade e qualidade adequadas, durante períodos críticos da gestação e do pós-natal, apresenta efeitos importantes sobre o desempenho, desde o maior peso ao desmame (Bohnert et al., 2013) até carcaças com avaliação de qualidade superior (Shoup et al., 2015).

2.3 Qualidade da carne

Para o consumidor, os principais aspectos a serem considerados na compra de carne no varejo são, por ordem de importância, segurança alimentar (onde a origem e a marca do produto são fundamentais), tipo e tamanho de corte, coloração e gordura de cobertura ou subcutânea (Chardulo et al., 2013).

A deposição de gordura subcutânea na carcaça é condição de fundamental importância para a qualidade dos cortes cárneos de bovinos. Neste sentido,

frigoríficos exigem animais que apresentem cobertura de gordura de no mínimo três milímetros. Carcaças leves e com pouca gordura subcutânea estão mais sujeitas ao encurtamento das fibras pelo frio (*cold shortening*), resultando em menor maciez da carne, devido a queda rápida da temperatura durante o resfriamento (Tait et al., 2005; Chardulo et al., 2013). Quando destinados à produção de carne, os animais têm sido castrados com o objetivo principal de assegurar a deposição de gordura na carcaça, aumentando a gordura subcutânea. Esta é uma característica muito associada também à condição nutricional e o grupo genético utilizado para a produção de carne (Ladeira et al., 2016).

Entretanto, mais recentemente, com o aumento da utilização do cruzamento industrial na produção de carne nacional, a quantidade de gordura intramuscular tem recebido maior atenção do consumidor e da indústria, uma vez que animais zebuínos (predominantes no país) produzem carne com pouca, ou mesmo completa ausência de marmoreio (Rubiano et al., 2009). Nota-se, assim, a crescente utilização de animais cruzados, sobretudo Angus x Nelore, para a produção de carne com maior quantidade de gordura intramuscular e mais maciez, buscando agregar valor ao produto final e atender demandas de mercados interessados em carne de melhor qualidade.

Em bovinos, a deposição do tecido adiposo intramuscular é o resultado do manejo alimentar, nutrição, sexo, idade e genótipo (Pflanzer e de Felício, 2011). A gordura intramuscular é uma característica bastante valorizada em diversos países com consumidores mais exigentes, como Coréia, Japão, Austrália e Estados Unidos (Park et al., 2018) e mais recentemente no Brasil. A deposição de gordura intramuscular na carne pode influenciar positivamente nos atributos sensoriais incluindo sabor, suculência e maciez (Hocquette et al., 2010). Do contrário, com menos gordura intramuscular (marmoreio), tem-se prejuízo aos aspectos sensoriais. Isto ocorre porque à medida que se reduz a adipogênese do tecido intramuscular, estimula-se a fibrogênese, reduzindo o marmoreio, além de aumentar o conteúdo do tecido conjuntivo (Du et al., 2017).

A marmorização está intimamente relacionada com a satisfação do consumidor, e, a aceitação global, parece atingir um patamar considerado ótimo entre 3 e 7% de teor de lipídios na porção intramuscular (Hocquette et al., 2010). A

concentração de gordura intramuscular avaliada no *Longissimus thoracis* em animais Nelore pode variar com o grau de maturidade do indivíduo, atingindo comumente teores entre 2 e 3% (Oliveira et al., 2012; Baldassini et al., 2017), embora valores acima de 4% já tenham sido descritos na literatura (Pflanzer e de Felício, 2011). O teor de gordura e o perfil de ácidos graxos tem relação estreita com o sabor da carne (Calkins e Hodgen, 2007), mas também tem atraído o consumidor pelo seu possível efeito na saúde, já que alguns de seus ácidos graxos são apontados como benéficos (Hocquette et al., 2012).

Em laboratório, a quantidade de gordura intramuscular da carne bovina pode ser medida pelo método químico (Bligh e Dyer, 1959), por determinação da composição centesimal (AOAC, 2000) ou por meio de escores de marmorização de escalas variáveis, desenvolvida em países como os Estados Unidos (USDA, 1997) e Austrália (AUS-MEAT, 2018).

2.4 Suplementação de bezerros na fase de cria por meio de *creep-feeding*

A nutrição adequada nos primeiros meses após nascimento induz positivamente o metabolismo da glicose (pelo acoplamento do eixo somatotrópico) e causa efeitos a longo prazo na saúde e desempenho devido a alterações epigenéticas conhecidas como *imprinting* metabólico (Patel e Srinivasan, 2011). Este processo epigenético inclui modificações na expressão dos genes que não são explicadas por alteração na sequência do DNA e que podem ocorrer durante períodos de reprogramação genética como na embriogênese, em que tecidos, como o muscular e o adiposo são formados. Isto pode, também, ocorrer em um curto período pós-parto (entre 60 e 240 dias de idade, aproximadamente) (Arthington e Moriel, 2014; Zhang, 2015). Deste modo, a nutrição adequada, de alto valor energético, nestes períodos críticos pode favorecer o crescimento do tecido muscular, a deposição de gordura intramuscular, bem como, o desenvolvimento do trato reprodutivo, melhorando a qualidade da carcaça de machos e antecipando a puberdade em novilhas.

Neste sentido, manejos como a suplementação em *creep-feeding* durante a cria, bem como a desmama precoce seguida de suplementação energético-proteica a base de alimento concentrado, levam a adaptações metabólicas diferentes em relação aos animais que são desmamados de forma convencional (aos 210 dias de idade) (Scheffler et al., 2014). O *creep-feeding* consiste em fornecer alimentação suplementar, a base de grãos, para bezerros durante a fase de amamentação (Stewart, 2017) a fim de obter indivíduos mais pesados ao desmame, encurtando o tempo de acabamento da carcaça para o abate, além de fornecer descanso para a matriz (Dantas et al., 2010). Moisés et al. (2013) relataram que bezerros que receberam *creep-feeding* com amido apresentaram maior deposição de gordura na carcaça quando comparados com os animais que foram submetidos ao desmame precoce e receberam suplementação com amido e animais que foram desmamados de modo convencional sem *creep-feeding*. Ademais, de acordo com Stewart (2017) foi demonstrado em diversos estudos que o uso de *creep-feeding* aumenta a gordura intramuscular, e, para manter este aumento, é necessário que os animais continuem sendo alimentados com dietas à base de grãos após o desmame até o abate. Como principal base dessas adaptações metabólicas, podem estar os mecanismos epigenéticos que atuam na modulação, ativação ou silenciamento de genes em diferentes fases do desenvolvimento e/ou sob estímulos ambientais diferenciados (Chen e Riggs, 2011).

Embora o acetato seja um dos principais doadores de grupos acetil para a deposição de gordura intramuscular, a glicose oriunda de suplementos ricos em concentrado também são contribuidores importantes para a deposição de gordura de marmoreio (Smith et al., 2018). Portanto, no período de cria, o aporte correto de concentrado, principalmente rico em amido (grãos), favorece a proliferação e o crescimento dos adipócitos. Isso, devido ao incremento do metabolismo da glicose, o que pode levar ao aumento do marmoreio sem, contudo, aumentar gordura nas vísceras, o que contribui para qualidade geral da carne e para o maior rendimento de carcaça. Somando-se a isso, a elevação do nível de proteína na dieta dos animais pode também incrementar a deposição de gordura intramuscular. Foi proposto por Lopez et al. (2001) que maiores níveis de proteína bruta na dieta elevam a digestão e a absorção intestinal do amido, e promovem a elevação plasmática de insulina e

glicose, o que, por consequência, aumenta a deposição de tecido adiposo intramuscular, por favorecer precursores dos ácidos graxos.

2.5 Efeitos da dieta sobre a expressão gênica

A síntese de mRNA na expressão gênica é controlada, entre outros, pela ligação de fatores de transcrição em sequências específicas do DNA, no denominado controle genético, e pela metilação do DNA, modificações covalentes das histonas, interação dos mRNAs com micro-RNAs, nos controles epigenéticos (Menck e Sluys, 2017). É conhecido que muitos organismos podem responder a diferentes fatores ambientais/nutricionais, exibindo plasticidade fenotípica em decorrência de alterações nos padrões de expressão gênica (Zhang, 2015). Neste sentido, o fenótipo dos animais pode ser modificado por modulações nutricionais por meio de mecanismos biológicos, o que significa que as exposições dietéticas podem ter consequências para o crescimento e para a saúde (McKay e Mathers, 2011).

No controle genético da expressão gênica, a expressão dos fatores de transcrição é dependente do tecido, do estágio de desenvolvimento e da situação fisiológica do organismo. Deste modo, a dieta pode ter um efeito significativo sobre a expressão de fatores de transcrição, que são proteínas-chave envolvidas na regulação da expressão gênica. Os fatores de transcrição são responsáveis por ligar-se a regiões específicas do DNA (regiões gênicas reguladoras – *enhancers* e *silencers*) e controlar a ativação ou inibição da transcrição de um outro grande número de genes (Marques e Baldini, 2017). Desta forma, têm uma importância diferenciada na construção do transcriptoma de um tecido.

Diferentes componentes da dieta, como nutrientes, compostos bioativos e metabólitos, podem modular a expressão de fatores de transcrição. De acordo com McNeel e Mersmann (2000), a disponibilidade de nutrientes pode influenciar a expressão de fatores de transcrição relacionados ao metabolismo. Como exemplo, tem-se o receptor- α ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- α), o primeiro fator de transcrição identificado como um potencial receptor de ácidos graxos (Benatti et al., 2004). O PPAR- α desempenha um papel na regulação de uma extensa rede de

genes envolvidos no metabolismo da glicose e de lipídios. Em modelos animais, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ω -6 e ω -3 são potentes indutores da oxidação de ácidos graxos e potentes supressores da síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis. É possível que os PUFA sejam ativadores de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) (Rodriguez et al., 1994; Juge-Aubry, et al., 1995; Power e Newsholme, 1997). Os PPAR e as proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT (C/EBP) são duas famílias de fatores de transcrição que desempenham papéis importantes na diferenciação de adipócitos e na lipogênese (Ladeira et al., 2016).

Nos últimos anos, surgiram cada vez mais evidências de que estímulos ambientais, como os nutricionais, podem modificar a metilação do DNA e, portanto, afetar a expressão de genes (Farias et al., 2015; Farkas et al., 2015; Day et al., 2015). Assim, a metilação do DNA, é considerada componente chave de uma rede epigenética complexa que afeta o transcriptoma de um determinado conjunto de células (Kucharski et al., 2008). A nutrição adequada nos primeiros meses após nascimento induz positivamente o metabolismo da glicose e causa efeitos a longo prazo na saúde e desempenho devido a alterações epigenéticas conhecidas como *imprinting* metabólico (Patel e Srinivasan, 2011). Este processo epigenético inclui modificações na expressão dos genes que não são explicadas por alteração na sequência do DNA e que podem ocorrer durante períodos de reprogramação genética como, por exemplo, nos terços médio e final da gestação, em que tecidos, como o muscular e o adiposo são formados. Isto pode, também, ocorrer em um curto período pós-parto (até 250 dias de idade, aproximadamente) (Arthington e Moriel, 2014; Zhang, 2015).

Existem evidências crescentes que sustentam que nutrientes podem modificar o padrão de metilação do DNA, seja em escala global ou em *loci* específicos (Jousse et al., 2011; Dudley et al., 2011; Altmann et al., 2012). São, até o momento, conhecidas três maneiras pelas quais a nutrição influencia os padrões de metilação do DNA, entre as quais, pelo fornecimento de substratos necessário para a metilação adequada do DNA; e pela provisão de cofatores que modulam a atividade enzimática das DNA metil transferases (DNMT). Como metil-doador universal para proteínas metiltransferase, a S-denosilmetionina (SAM) é sintetizada no ciclo da metionina a partir de vários precursores presentes na dieta (McKay e Mathers, 2011; Feil e Fraga, 2012). Todos estes precursores entram em pontos diferentes na via da metionina e contribuem para

a síntese líquida do SAM. Assim, a disponibilidade reduzida de SAM resulta na hipometilação global do DNA, e vice-versa (Zhang, 2015). É bem conhecido que as DNMTs exigem o SAM como um cofator para sua ativação total. Doadores de metila da dieta podem contribuir para modular a atividade das DNMTs alterando a concentração intracelular de SAM. Além de uma regulação indireta dos padrões de metilação do DNA por meio da modulação de SAM, vários outros compostos da dieta podem também influenciar diretamente a expressão ou atividade das DNMTs (Mukherjee et al., 2015).

2.6 Metabolismo lipídico em bovinos

A deposição da gordura intramuscular é oriunda de uma série de processos, como a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (adipogênese ou hiperplasia dos adipócitos), a lipogênese ou crescimento destas células (hipertrofia) e a oxidação lipídica ou lipólise (Pethick et al., 2004; Hausman et al., 2009).

O processo da adipogênese consiste na transformação de células tronco mesenquimais (CTM) em adipócitos maduros, em uma sequência de eventos que envolvem as etapas de determinação, proliferação e diferenciação (Hausman et al., 2009). Na fase da determinação, há o recrutamento de células progenitoras a pré-adipócitos, com a participação da Zfp423 (Zinc finger protein 423), um marcador precoce da adipogênese (Ghaben e Scherer, 2019). Em seguida, na segunda fase, os pré-adipócitos se proliferam, sendo imprescindível a atuação do gene *C/EBP* que induz a expressão do *PPARG* (PPAR gamma) (Hishida et al., 2009). De acordo com Duarte (2013), a proliferação acontece devido a uma cascata de autorregulação dos marcadores adipogênicos. A Zfp423 estimula o *PPARG* que, por sua vez, estimula o *C/EBPA*, que tem seus níveis aumentados dentro dos pré-adipócitos, causando um maior estímulo no *PPARG*, resultando, por conseguinte, em uma maior proliferação de adipócitos. Por fim, na fase da diferenciação, os pré-adipócitos se diferenciam em adipócitos maduros. Para que ela ocorra, é necessária a inibição da via sinalizadora do Wnt/ β -catenina, sendo indispensável a atuação dos fatores de transcrição *PPARG* e *C/EBPA* (Moseti et al., 2016). Após a expressão do *C/EBPA* e *PPARG*, há ação do elemento regulador de esterol ligado à proteína 1c (SREBP-1c), codificado pelo gene

SREBPF1. Esse fator de transcrição atua nos eventos terminais da diferenciação adiposa, uma vez que, no núcleo, ativa a transcrição de genes que codificam as enzimas lipogênicas (Tang e Lane, 2012), como FABP4 (proteína de ligação ao ácido graxo 4), adiponectina e leptina (Ladeira et al., 2016). É também nessa fase que os adipócitos passam a adquirir sensibilidade à insulina, fato esse relacionado ao aumento no número de receptores de insulina e transportadores de glicose (GLUT4) (Ladeira et al., 2016). Destaca-se que a expressão do gene *FABP4*, responsável pela codificação de proteínas relacionadas à absorção e transporte de ácidos graxos (AG), fatores envolvidos na deposição de gordura, ocorre principalmente nos adipócitos maduros (Pino et al., 2017). Assim, o acúmulo de FABP pode ser um indicativo do número de adipócitos no tecido muscular.

Na lipogênese, processo que tem como objetivo a hipertrofia dos adipócitos maduros formados durante a adipogênese, principalmente, pela incorporação de triglicerídeos, ocorre a síntese de ácidos graxos absorvidos da dieta ou da síntese *de novo* (Rollin et al., 2003). Os triglicerídeos são formados por ácidos graxos não esterificados (AGNE) e glicerol. O glicerol é obtido a partir da glicose, enquanto os AGNE podem ser obtidos pela síntese de novo, tendo a glicose ou o acetato como substrato, ou por meio de ácidos graxos advindos da dieta (Pethick et al., 2004). Na síntese de ácidos graxos decorrentes da dieta, eles são absorvidos pelo intestino grosso, reesterificados para triglicerídeos ou fosfolipídios e transportados pelos quilomícrons até o tecido alvo. Uma vez no tecido alvo, os triglicerídeos são hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL), resultando em ácidos graxos livres (Kersten, 2014) que serão transportados para dentro do adipócito pela proteína de ligação FABP4, visto que os ácidos graxos são hidrofóbicos e não se difundem pela membrana (Ladeira et al., 2018). Na absorção de ácidos graxos decorrentes da síntese de novo, há a carboxilação da molécula de acetil-CoA pela atividade da acetil-CoA carboxilase, codificada pelo gene *ACACA* (Pethick et al., 2004). Após sua carboxilação, o acetilCoA é transformado em uma molécula de malonil-CoA e, após uma série de reações, uma molécula de acetil-CoA é ligada a uma molécula de malonil-CoA, com o auxílio do complexo multienzimático, chamado de ácido graxo sintetase, que é codificado pelo gene *FASN* (Ladeira et al., 2016). Da mesma forma que na síntese de ácidos graxos absorvidos pela dieta, os ácidos graxos decorrentes

da síntese de novo são transportados para os adipócitos pela proteína de ligação FABP4. Após a síntese e/ou captação, os ácidos graxos ainda podem sofrer ação da enzima estearoil-CoA dessaturase (SCD), codificada pelo gene *SCD1*, responsável por transformar o ácido graxo saturado em insaturado, por meio da inserção de duplas ligações na cadeia (Ladeira et al., 2018). Ressalta-se que o gene *SCD1*, codificador da enzima SCD, é bastante estudado e os relatos na literatura demonstram que sua expressão é altamente influenciada pela dieta (Graugnard et al., 2009; Ladeira et al., 2014; Zhang et al., 2015; Teixeira et al., 2017). Nesse contexto, nota-se que o principal fator que controla a taxa de deposição de gordura é o status nutricional do animal, pois o acetato, ácido graxo volátil produzido na fermentação ruminal, é o notável precursor da síntese de ácidos graxos nos ruminantes (Shingfield et al., 2010). Além do acetato, a glicose também pode servir de precursor para síntese de ácido graxo, atuando como fonte de acetil-CoA, por meio da glicólise, seguindo da descarboxilação na mitocôndria.

O início do processo de lipólise é marcado pela ação das catecolaminas que se ligam aos receptores β -adrenérgicos, na superfície do adipócito, ativando a Adenil ciclase, responsável por quebrar a ATP em AMPc. O acúmulo de AMPc induz a ativação da proteína quinase que, por sua vez, ativa a lipase sensível e inicia a cascata lipolítica (Contreras et al., 2017). Após a ativação da lipase sensível, o triglicerídeo é mobilizado e, com isso, o ácido graxo que compõe este triglicerídeo é transportado pela albumina, na corrente sanguínea, até um tecido alvo. Uma vez no tecido alvo, o ácido graxo é transportado para dentro da célula por uma proteína transportadora, proteína de transporte de ácido graxo (FATP) ou a CD36. Dentro da célula, o ácido graxo recebe uma coenzima A (CoA) para que não escape, por meio da acil-CoA sintetase. Contudo, para que ocorra a oxidação lipídica, não basta que o ácido graxo esteja dentro da célula, é necessário que ele seja transportado para dentro da mitocôndria. Este processo ocorre por meio da carnitina palmitoiltransferase (CPT) que retira a unidade CoA do ácido graxo e adiciona uma carnitina. O ácido graxo: carnitina adentra a mitocôndria. Em seguida, a CPT retira a carnitina e adiciona o CoA novamente. Uma vez dentro da mitocôndria ocorrerá o processo de β -oxidação, que é o processo inverso da síntese, onde um ácido graxo será convertido em acetil-CoA.

Por exemplo, um palmitil-CoA (16C) liberará oito moléculas de acetil-CoA que entrarão no ciclo de Krebs e produzirão 3 NAD, 1 FAD e ATP (Contreras et al., 2017).

Entre os muitos genes supostamente envolvidos no metabolismo lipídico em bovinos, alguns como os fatores de transcrição *PPARG* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*) e *SREBF* (*Sterol Regulatory Element Binding Factor 1*) parecem ser particularmente relevantes, porém poucos estudos têm avaliado os efeitos de manejo e de dieta (como, por exemplo, a desmama precoce e o uso do *creep-feeding*) sobre a expressão destes e de outros fatores, especialmente em bovinos Nelore e cruzados.

2.7 Análises de coexpressão gênica

Na bovinocultura em geral, sobretudo em raças taurinas, ferramentas moleculares têm sido amplamente empregadas nas últimas décadas com o intuito de obter informações a respeito de processos biológicos e vias metabólicas relacionadas às características de interesse econômico, bem como de acelerar os resultados de programas de melhoramento genético.

Estudo das funções de genes, ou genômica funcional, tem se tornado popular. Dentre algumas metodologias possíveis para este fim, a análise global de transcritos ou transcriptoma, que compreendem o conjunto de transcritos gerados por determinado tecido, tem se tornado comum. Este tipo de análise visa identificar RNAs que estão sendo expressos e em qual quantidade, principalmente, por técnicas que envolvem hibridização, como *microarrays*, ou análise base a base do transcrito sob de sequenciamento de próxima geração (NGS), o RNA-Seq (Wang et al., 2009).

A técnica de RNA-Seq ou sequenciamento de RNA consiste na análise dos transcritos parcial ou total, a nível de estrutura e expressão, a partir da conversão dos RNAs em bibliotecas de cDNA que em seguidas são sequenciadas, por meio de plataformas NGS. As sequências podem então ser alinhadas com genomas/transcritos de referência ou até mesmo montadas *de novo*, em casos de espécies animais que ainda não possuem genoma conhecido completamente. As

leituras curtas, oriundas de NGS, permitem o entendimento e localização de transições existente entre éxons e é capaz, também, de detectar variações na sequência, tal como polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (Cloonan et al., 2008). O RNA-Seq apresenta baixo *background* e elevado limite de detecção, contrastando com as limitações encontradas em técnicas baseadas em hibridização (microarranjos), permitindo a detecção de novos transcritos e *splicing* alternativo, com maior sensibilidade e maior poder de quantificação, além de apresentarem melhor custo-benefício, devido a grande quantidade de dados gerados (Zhao et al., 2014).

Aliados aos estudos de expressão gênica diferencial para a identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs), análises de coexpressão gênica são utilizadas a fim de melhor entender a interação e o perfil de expressão dos genes associados aos fenótipos e/ou tratamentos. Estas análises apontam DEGs identificados em estudos prévios, bem como outros genes que não são diferencialmente expressos, mas que estão relacionados à característica de interesse (Hudson et al., 2012).

Uma rede de coexpressão permite que sejam identificados grupos de genes fortemente correlacionados e associados a processos ou vias biológicas (Chowdhury et al., 2019). Segundo Van Dam et al. (2018) a construção e a análise de uma rede de coexpressão pode ser dividida em três etapas, sendo elas: (1) definição das relações entre genes, baseada em medidas de correlação ou informações mútuas entre cada par de genes; (2) construção de uma rede a partir das associações de coexpressão, onde cada nó representa um gene e cada aresta representa a presença e a força da relação de coexpressão; (3) agrupamento de genes coexpressos com base na semelhança no padrão de expressão em várias amostras, o resultado são grupos de genes coexpressos (módulos) em vez de apenas pares. Na condução de estudos de coexpressão gênica recomenda-se para a construção das redes e módulos de forma mais acurada, os mínimos de 20 amostras e cobertura de 10 milhões de *reads* por amostra (Van Dam et al., 2018).

Dentre as ferramentas disponíveis para análise de coexpressão genica, o pacote *Weighted Gene Coexpression Network Analysis – WGCNA* (Langfelder e Horvath, 2008) tem sido amplamente utilizado. Todavia, essa ferramenta envolve

fluxos de trabalho complexos, o que exige dos usuários um elevado grau de habilidade em bioinformática, além da necessidade de alto poder computacional (Cheng et al., 2020). Ainda de acordo com os autores, em contraste ao *WGCNA*, o pacote *CEMITool* (*CoExpression Modules Identification Tool*), desenvolvido por Russo et al. (2018), é mais eficiente na análise de coexpressão, já que possui *pipeline* automatizado, além de não exigir ampla experiência em bioinformática dos seus usuários.

A partir da definição dos módulos, com o objetivo de compreender melhor os dados, são realizadas análises funcionais e integrativas. Tal prática exigiria a combinação de diversos outros pacotes, porém o *CEMITool* além de identificar módulos de coexpressão, permite a análise automatizada dos mesmos (Russo et al., 2018). As ferramentas de análise fornecida pelo pacote são: a análise de sobre-representação, do inglês *Over-Representation Analysis – ORA*, usada para determinar se os genes de cada módulo estão enriquecidos em vias ou processos conhecidos; a análise de enriquecimento do conjunto de genes, do inglês, *Gene Set Enrichment Analysis – GSEA* (Subramanian et al., 2005), que permite a associação entre os módulos identificados e os fenótipos/tratamentos utilizados no estudo; e a integração de informações de coexpressão com dados de interação proteína-proteína, que permite identificar os principais genes reguladores ou centrais, do inglês, *hub gene*. Os genes centrais são aqueles que possuem um elevado número de conexões em uma rede de coexpressão. Essas redes geralmente incluem módulos com muitos genes, tornando essencial identificar quais genes dentro de cada módulo representam melhor seu comportamento. Por esta razão, os genes centrais desempenham um papel crucial (van Dan et al., 2018; Chowdhury et al., 2019).

Estudos de coexpressão nas raças Hanwoo (Lim et al., 2013) e Nelore (Diniz et al., 2019; Silva-Vignato et al., 2019), que consideraram a deposição de gordura na carcaça, o marmoreio e características voltadas à qualidade de carne, identificaram módulos gênicos significativos que continham genes, por vezes, não identificados como diferencialmente expressos. Na raça Nelore, Diniz et al. (2019), a partir de dados de RNA-Seq oriundos do *Longissimus thoracis*, encontraram módulos gênicos inseridos em vias relacionadas à sinalização AMPK, PPAR e glucagon/insulina. Dentre os módulos gênicos, foram pontuados genes já citados anteriormente como

DEGs: *EVOLV5* e *6*, *FASN*, *FABP4*, *ACACA* e *LIPE*, mas também genes, até então, não identificados em análises de expressão gênica diferencial como *PLIN1* (*perilipin 1*), *PDE3B* (*phosphodiesterase 3B*), *COL4A1* e *2* (*collagen type IV alpha 1 chain* e *alpha 2 chain*). Silva-Vignato et al. (2019) ao avaliarem o perfil de coexpressão gênica para as características área de olho de lombo e cobertura de gordura subcutânea em bovinos Nelore, sinalizaram os genes *EIF2AK2* (*eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2*) e *HADHA* e *HADHB* (*hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha* e *beta*), além de genes já bem conhecidos como *ACSL1*, *ACAT1* e a família de genes *SLC*.

Análises de coexpressão também mostraram genes codificadores de miRNA em associação a mRNA para a formação de grupos gênicos relativos a vias metabólicas importantes na determinação do fenótipo (Gonçalves et al., 2018; Oliveira et al., 2019). Os miRNA identificados em módulos relacionados a sinalização de AMPK, MAPK e insulina apresentaram padrão de coexpressão e regularam a expressão de uma série de genes-alvo como *SCD*, *CDS2* (*CDP-diacylglycerol synthase 2*), *FAR2* (*fatty acyl-CoA reductase 2*) e *PRKAG2* (*protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 2*) (Oliveira et al., 2019).

Diante dos dados apresentados fica evidente o potencial de aplicação do estudo de coexpressão gênica para entender a fisiologia por trás de características complexas, de difícil mensuração e de caráter quantitativo como é o caso da deposição de gordura intramuscular na carne de bovinos, bem como das alterações na expressão de genes e na fisiologia decorrentes de diferentes tratamentos aos quais os animais podem ser expostos. Desta forma, constitui-se em mais um meio para o melhor entendimento de características de importância econômica e de efeitos de tratamentos, apontando genes, mecanismos regulatórios e moduladores que ainda não foram descritos. A partir disso, poderá contribuir para a obtenção de produtos cárneos de qualidade superior e mais saudáveis para o mercado consumidor e auxiliar programas de seleção e melhoramento genético animal no Brasil e no mundo.

3 REFERÊNCIAS

- ABIEC (2024) Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. BeefReport: Perfil da Pecuária no Brasil. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2024-perfil-da-pecuaria-no-brasil/>. Acesso em 22 nov. 2024.
- Altmann S, Murani E, Schwerin M, Metges CC, Wimmers K, Ponsuksili S (2012) Maternal dietary protein restriction and excess affects offspring gene expression and methylation of non-SMC subunits of condensin I in liver and skeletal muscle. **Epigenetics** 7:239-252.
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis (17th ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- Arthington JD, Moriel P (2014) Impressão Metabólica De Bezerros Desmamados Precocemente: Efeitos no Desempenho Pós Desmama em Machos e Fêmeas. In **Anais...XVIII Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**. Uberlândia.
- AUS-MEAT (2018) **Handbook of australian beef processing**. The Aus-Meat language.
- Baldassini WA, Chardulo LAL, Silva JAV, Malheiros JM, Dias VAD, Espigolan R, Baldi FS, Albuquerque LG, Fernandes TT, Padilha PM (2017) Meat quality traits of Nellore bulls according to different degrees of backfat thickness: a multivariate approach. **Animal Production Science** 57:363-370.
- Barros LV, Paulino MF, Marques DEC, Cabral CHA, da Silva FG, Caldeira DSA, de Moura FH (2015) Supplementation of suckling beef calves on a creep-feeding system and nutritional evaluation of lactating beef dams. **Semina: Ciências Agrárias** 36:3431-3443.
- Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M (2004) Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition** 23: 281-302.
- Bligh EG, Dyer WJ (2016) A rapid method of total lipid extraction. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** 37:911-917
- Bohnert DW, Stalker LA, Mills RR, Nyman A, Falck SJ, Cooke RF (2013) Late gestation supplementation of beef cows differing in body condition score: effects on cow and calf performance. **Journal of Animal Science** 91:5485-5491.
- Calkins CR, Hodgen JM (2007) A fresh look at meat flavor. **Meat Science** 77:63-80.
- Chardulo LAL, Silveira AC, Vianello F (2013) Aspectos analíticos para avaliação da qualidade de carnes tropicais. In: Lima G., Vianello F (eds) **Qualidade, segurança e tecnologia de alimentos**. Viena: Springer, p. 53-62.
- Chen ZX, Riggs AD (2011) DNA methylation and demethylation in mammals. **Journal of Biological Chemistry** 286:18347-18353.
- Cheng CW, Beech DJ, Wheatcroft SB (2020) Advantages of CEMiTool for gene co-expression analysis of RNA-seq data. **Computers in Biology and Medicine** 125: 103975.

Cheng W, Cheng JH, Sun DW, Pu H (2015) Marbling analysis for evaluating meat quality: Methods and techniques. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 14:523-535.

Chowdhury HA, Bhattacharyya DK, Kalita JK (2019) (Differential) co-expression analysis of gene expression: a survey of best practices. **IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics** 17: 1154-1173.

Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, Gardiner BB, Faulkner GJ, Brown MK, et al. (2008) Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nature Methods** 5: 613-619.

Contreras GA, Strieder-Barboza C, Raphael W (2017) Adipose tissue lipolysis and remodeling during the transition period of dairy cows. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 8: 1-12.

Cunningham JG (2004) **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 596p.

Dantas CCO, Negrão FM, Geron LJV, Mexia AA (2010) O uso da técnica do Creep-feeding na suplementação de bezerros. **Pubvet** 4:899.

Day JJ, Kennedy AJ, Sweatt JD (2015) DNA methylation and its implications and accessibility for neuropsychiatric therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 55:591-611.

Diniz WJ, Mazzoni G et al (2019) Detection of co-expressed pathway modules associated with mineral concentration and meat quality in Nelore cattle. **Frontiers in Genetics** 10: 210.

Du M, Ford SP, Zhu MJ (2017) Optimizing livestock production efficiency through maternal nutritional management and fetal developmental programming. **Animal Frontiers** 7:5-11.

Du M, Wang B, Fu X, Yang Q, Zhu MJ (2015) Fetal programming in meat production. **Meat Science** 109:40-47.

Duarte MS, Paulino PVR, Das AK, Wei N, Serão NVL, Fu X, Harris SM, Dodson MV, Du M (2013) Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. **Journal of Animal Science** 91:2938-2946.

Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH (2011) Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. **PLoS One** 6:e21662.

ElMasry G, Barbin DF, Sun DW, Allen P (2012) Meat quality evaluation by hyperspectral imaging technique: an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 52:689-711.

Evangelista AF, Cavalcante DH, Fonseca WJL, Junior JB, Campelo JEG, Júnior SS (2019) Herdabilidade de características de crescimento em bovinos da raça Nelore utilizando métodos da Máxima Verossimilhança Restrita e Inferência Bayesiana. **Archivos de Zootecnia** 68:440-446.

Farias N, Ho N, Butler S, Delaney L, Morrison J, Shahrzad S, Coomber BL (2015) The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. **The Journal of Nutritional Biochemistry** 26:818-826.

Farkas SA, Befekadu R, Hahn-Strömberg V, Nilsson TK (2015) DNA methylation and expression of the folate transporter genes in colorectal cancer. **Tumor Biology** 36:5581-5590.

Feil R, Fraga MF (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature Reviews Genetics** 13:97-109.

Ghaben AL, Scherer PE (2019) Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 20:242–258.

Gomide LAM, Ramos EM, Fontes PR (2013) **Ciência e qualidade da carne**. Viçosa: Editora UFV, 197p.

Gonçalves TM, de Almeida Regitano LC et al (2018) Gene co-expression analysis indicates potential pathways and regulators of beef tenderness in Nellore cattle. **Frontiers in Genetics** 9: 441.

Graugnard DE, Piantoni P, Bionaz M, Berger LL, Faulkner DB, Looor JJ (2009) Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus × Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. **BMC Genomics** 10: 1-15.

Guerrero A, Velandia Valero M, Campo MM, Sañudo C (2013) Alguns fatores que afetam a qualidade da carne: da fazenda ao garfo. Revisão. **Acta Scientiarum Animal Sciences** 35: 335-347.

Hausman GJ, Dodson MV, et al (2009) Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. **Journal of Animal Science** 87:1218–1246.

Hishida T, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M (2009) The role of C/EBP δ in the early stages of adipogenesis. **Biochimie** 91:654–657.

Hocquette JF, Botreau R, Picard B, Jacquet A, Pethick DW, Scollan ND (2012) Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat Science** 92:197-209.

Hocquette JF, Gondret F, Baéza E, Médale F, Jurie C, Pethick DW (2010) Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal** 4:303-319.

Hudson NJ, Dalrymple BP, Reverter A (2012) Beyond differential expression: the quest for causal mutations and effector molecules. **BMC Genomics** 13:356.

IBGE (2024) Censo Agropecuário - Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas). Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Acesso em 22 nov. 2024.

Jeong J, Bong J, Kim GD, Joo ST, Lee HJ, Baik M (2013) Transcriptome changes favoring intramuscular fat deposition in the longissimus muscle following castration of bulls. **Journal of Animal Science** 91:4692-4704.

Jousse C, Parry L, et al. (2011) Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. **The FASEB Journal** 25:3271-3278.

Juge-Aubry CE, Gorla-Bajszczak A, Pernin A, Lemberger T, Wahli W, Burger AG, Meier CA (1995) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor: possible role of a leucine zipper-like heptad repeat. **Journal of Biological Chemistry** 270:18117-18122.

Junqueira LC, CARNEIRO J (2023) **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 592p.

Kersten S (2014) Integrated physiology and systems biology of PPAR α . **Molecular metabolism** 3: 354-371.

Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science** 319:1827-1830.

Ladeira MM, Santarosa LC, Chizzotti ML, Ramos EM, Neto OM, Oliveira DM, Carvalho JRR, Lopes LS, Ribeiro JS (2014) Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. **Meat Science** 96: 597-605.

Ladeira MM, Schoonmaker JP, Gionbelli MP, Dias JC, Gionbelli TR, Carvalho JRR, Teixeira PD (2016) Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. **International Journal of Molecular Sciences** 17:918.

Ladeira MM, Schoonmaker JP, Swanson KC, Duckett SK, Gionbelli MP, Rodrigues LM, Teixeira PD (2018) Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. **Animal** 12: 282-294.

Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC Bioinformatics** 9: 1-13.

Lawrence TLJ, Fowler VR (2002) Prenatal and postnatal growth. In: Lawrence TLJ (Eds.) **Growth of farm animals**. Wallingford UK: CABI Publishing, p. 193-215.

Lim D, Lee SH, Kim NK, Cho YM, Chai HH, Seong HH, Kim H (2013) Gene co-expression analysis to characterize genes related to marbling trait in Hanwoo (Korean) cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 26: 19.

Lopes SA, Paulino MF, Detmann E, Valente EEL, de Barros LV, Rennó LN, Martins LS (2016) Does supplementation of beef calves by creep feeding systems influence milk production and body condition of the dams? Tropical **Animal Health and Production** 48:1241-1246.

Lopez OR, Krehbiel C, Thomas M, Hallford D, Keisler D, Obeidat B, Hernández JA, Bryant W, Garcia M, Flores R (2001) Effect of increasing level of dietary protein on serum concentrations of metabolic hormones and mammary development in Holstein heifers consuming a moderate-energy diet. **Journal of Dairy Science** 84: 161.

Marques MV, Baldini RL (2017) Transcrição e Regulação Gênica. In: Menck CFM, SLUYS MAV (2017) **Genética Molecular Básica: dos Genes aos Genoma** (1 ed.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

McKay JA, Mathers JC (2011) Diet induced epigenetic changes and their implications for health. **Acta Physiologica** 202:103-118.

McNeel RL, Mersmann HJ (2000) Nutritional deprivation reduces the transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins in porcine adipocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry** 11:139-146.

Menck CFM, Sluys MAV (2017) **Genética molecular básica: dos genes ao genoma**. 1st ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 500p

Moisá SJ, Shike DW, Meteer WT, Keisler D, Faulkner DB, Looor JJ (2013) Yin yang 1 and adipogenic gene network expression in longissimus muscle of beef cattle in response to nutritional management. **Gene Regulation and Systems Biology** 7:71-83.

Moriel P, Johnson SE, Vendramini JMB, McCann MA, Gerrard DE, Mercadante VRG, Arthington JD (2014) Effects of calf weaning age and subsequent management systems on growth performance and carcass characteristics of beef steers. **Journal of Animal Science** 92:3598-3609.

Moriel P, Vendramini JM, Arthington JD, Aguiar AD, Caputti G (2017) Effects of crude protein level and degradability of limited creep-feeding supplements on performance of beef cow-calf pairs grazing limpoggrass pastures. **Livestock Science** 200:1-5.

Moseti D, Regassa A, Kim WK (2016) Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. **International Journal of Molecular Sciences** 17:1-24.

Mukherjee N, Kumar AP, Ghosh R (2015) DNA methylation and flavonoids in genitourinary cancers. **Current Pharmacology Reports** 1:112-120.

Oliveira EA, Sampaio AAM, Henrique W, Pivaro TM, Rosa BL, Fernandes ARM, Andrade AT (2012) Quality traits and lipid composition of meat from Nelore young bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. **Meat Science** 90:28-35.

Oliveira PS, Coutinho LL et al (2019) Co-expression networks reveal potential regulatory roles of miRNAs in fatty acid composition of Nelore cattle. **Frontiers in Genetics** 10: 651.

Owens FN, Gill DR, Secrist DS, Coleman SW (1995) Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. **Journal of Animal Science** 73:3152-3172.

Park SJ, Beak SH, Kim SY, Jeong IH, Piao MY, Kang HJ, Baik M (2018) Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle - A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 31:1043.

Patel MS, Srinivasan M (2011) Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of Nutrition and Metabolism** 58:18-28.

Pethick DW, Harper GS, Oddy VH (2004) Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 44:705-715.

- Pflanzer SB, de Felício PE (2011) Moisture and fat content, marbling level and color of boneless rib cut from Nellore steers varying in maturity and fatness. **Meat Science** 87:7-11
- Picard B, Gagaoua M (2020) Muscle fiber properties in cattle and their relationships with meat qualities: An overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 68:6021-6039.
- Pino LM, Arana A, Alfonso L, Mendizábal JA, Soret B (2017) Adiposity and adipogenic gene expression in four different muscles in beef cattle. **PloS One** 12: e0179604.
- Power GW, Newsholme EA (1997) Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. **The Journal of Nutrition** 127:2142-2150.
- Rodriguez JC, Gil-Gómez G, Hegardt FG, Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. **Journal of Biological Chemistry** 269:18767-18772.
- Rollin X, Médale F, Gutierrez S, Blanc D, Kaushik SJ (2003) Short- and long-term nutritional modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **British Journal of Nutrition** 89: 803-810.
- Rubiano GAG, Arrigoni MDB, Martins CL, Rodrigues É, Gonçalves HC, Angerami CN (2009) Performance, carcass traits and meat quality of young Canchim, Nellore and crossbred bulls. **Revista Brasileira de Zootecnia** 38:2490-2498.
- Russo PS, Ferreira GR et al (2018) CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. **BMC Bioinformatics** 19: 1-13.
- Sarcinelli MF, Venturini KS, Silva LD (2007) **Características da carne bovina**. Boletim Técnico - PIE-UFES:00807, Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo.
- Scheffler JM, McCann MA, Greiner SP, Jiang H, Hanigan MD, Bridges GA, Lake SL, Gerrard DE (2014) Early metabolic imprinting events increase marbling scores in fed cattle. **Journal of Animal Science** 92:320-324.
- Shingfield KJ, Bernard L, Leroux C, Chilliard Y (2010) Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal** 4: 1140-1166.
- Shoup, L. M., Wilson, T. B., González-Peña, D., Ireland, F. A., Rodríguez-Zas, S., Felix, T. L., & Shike, D. W. (2015). Beef cow prepartum supplement level and age at weaning: II. Effects of developmental programming on performance and carcass composition of steer progeny. **Journal of animal science**, 93(10), 4936-4947.
- Silva-Vignato B, Coutinho LL, Poleti MD, Cesar AS, Moncau CT, Regitano LC, Balieiro JC (2019) Gene co-expression networks associated with carcass traits reveal new pathways for muscle and fat deposition in Nelore cattle. **BMC Genomics** 20: 1-13.
- Smith SB, Blackmon TL, Sawyer JE, Miller RK, Baber JR, Morrill JC, Cabral AR, Wickersham TA (2018) Glucose and acetate metabolism in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues from steers infused with glucose, propionate, or acetate. **Journal of Animal Science** 96:921-929.

Stewart L (2017) Creep Feeding Beef Calves. UGA Cooperative Extension Bulletin 1315.

Subramanian A, Tamayo P et al (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 102: 15545-15550.

Tait Jr RG, Wilson DE, Rouse GH (2005) Predição de produtos de varejo e rendimentos de gordura aparável dos quatro cortes primários em gado de corte usando ultrassom ou dados de carcaça. **Journal of Animal Science** 83:1353-1360.

Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual Review of Biochemistry** 81:715-736.

Teixeira PD, Oliveira DM, Chizzotti ML, Chalfun-Junior A, Coelho TC, Gionbelli M, Paiva LV, Carvalho JRR, Ladeira MM (2017) Subspecies and diet affect the expression of genes involved in lipid metabolism and chemical composition of muscle in beef cattle. **Meat Science** 133: 110-118.

USDA (1997) United States standards for grades of carcass beef. US Dep. Agric. Available from: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3002979>.

Valente EEL, Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SDC, Barros LV, Cabral CHA, Duarte MDS (2012) Strategies of supplementation of female suckling calves and nutrition parameters of beef cows on tropical pasture. **Tropical Animal Health and Production** 44:1803-1811.

Van Dam S, Vosa U, van der Graaf A, Franke L, de Magalhaes JP (2018) Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. **Briefings in Bioinformatics** 19: 575-592.

Viñoles C, Jaurena M, De Barbieri I, Do Carmo M, Montossi F (2013) Effect of creep feeding and stocking rate on the productivity of beef cattle grazing grasslands. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 56:279-287.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10: 57-63.

Wicks J, Beline M, Gomez JFM, Luzardo S, Silva SL, Gerrard D (2019) Muscle energy metabolism, growth, and meat quality in beef cattle. **Agriculture** 9: 195.

Wood JD (2020) The influence of carcass composition on meat quality. In Jones SM (Eds) **Quality and grading of carcasses of meat animals**. CRC Press.

Zhang H, Zhang X et al (2015) Effects of dietary energy level on lipid metabolism-related gene expression in subcutaneous adipose tissue of Yellow breed × Simmental cattle. **Animal Science Journal** 86: 392-400.

Zhang N (2015) Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. **Animal Nutrition** 1:144-151.

Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X (2014) Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PLoS One** 9: e78644.

Zhu MJ, Du M, Hess BW, Means WJ, Nathanielsz PW, Ford SP (2007) Maternal nutrient restriction upregulates growth signaling pathways in the cotyledonary artery of cow placentomes. **Placenta** 28:361-368.

CAPÍTULO 2 - Efeito da suplementação na fase de cria sobre a coexpressão de genes transcritos no músculo *Longissimus thoracis* de bezerros F1 Angus x Nelore à desmama

RESUMO – A dieta do animal é o fator extrínseco com maior influência no desempenho e na qualidade da carne. Um aspecto importante na qualidade desse produto é a deposição de gordura intramuscular, que é fortemente influenciada pela nutrição nos estágios iniciais da vida. Portanto, é essencial entender as mudanças fisiológicas resultantes da suplementação de bezerros. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar a coexpressão gênica no desmame de bezerros cruzados expostos a diferentes protocolos nutricionais durante a fase de cria. Quarenta e oito bezerros F1 Angus-Nelore machos, não castrados, meio-irmãos foram divididos em dois grupos: G1 (n = 24) – sem *creep-feeding*; G2 (n = 24) – *creep-feeding*. Após o desmame (210 dias), todos foram mantidos em confinamento por 180 dias sob as mesmas condições. O peso ao desmame, a espessura da gordura subcutânea e o marmoreio foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos ($G2 > G1$). Os transcriptomas foram gerados a partir de biópsias coletadas ao desmame do músculo *Longissimus thoracis* da metade direita da carcaça, por meio de RNA-Seq, de 12 indivíduos de cada grupo. A análise de coexpressão gênica foi realizada utilizando o pacote CEMITool no ambiente do *software* R. Foram encontrados sete módulos (M) de genes coexpressos, dos quais cinco (M1, M2, M3, M4 e M6) mostraram uma diferença de atividade entre G1 e G2 (p ajustado $< 0,002$). Dentre esses, os módulos 1 (216 genes), 2 (145 genes) e 3 (76 genes) tiveram maior associação de suas atividades com os tratamentos avaliados. Em cada um destes três módulos foram identificados e analisados os genes *hubs*, bem como as vias metabólica e os processos biológicos enriquecidos. Os resultados encontrados mostraram que a falta de suplementação na fase de cria provocou o enriquecimento de processos biológicos como a Oxidação lipídica (GO:0034440), além de uma maior atividade de genes hubs como *CDKN1A*, *FOXO1* e *NAMPT*, os quais podem suprimir a miogênese e a adipogênese. Por outro lado, a suplementação nesta fase foi capaz de aumentar o peso à desmama, bem como a deposição das gorduras subcutânea e intramuscular ao abate. Neste contexto houve maior atividade dos genes hubs *ITGB6*, *REEP1*, *TPCN*, *PPARA*, *PTPN11* e *MAP3K20*, além do enriquecimento de processos biológicos como Desenvolvimento do tecido muscular (GO:0060537) e Diferenciação de células de gordura (GO: 0045444). Estes achados permitiram concluir que a suplementação de bezerros na fase de aleitamento é capaz de refletir em aspectos do desempenho até a desmama, assim como da qualidade da carcaça e da carne produzidas. Ademais, os genes *hubs* identificados, bem como as vias metabólicas e processos biológicos enriquecidos a partir dos módulos de maior correlação com os tratamentos, permitiram elucidar, ao menos em parte, os mecanismos biológicos envolvidos nestes processos fisiológicos.

Palavras-chaves: *Bos indicus*, *creep-feeding*, nutrigenômica, qualidade de carne, transcriptoma

1 INTRODUÇÃO

A quantidade e a qualidade da carne produzida por um bovino são influenciadas por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os extrínsecos, destaca-se a dieta do animal, que proporciona a maior possibilidade de manipulação e representa efeitos mais expressivos na composição do produto (Guerrero et al., 2013). Assim, o fornecimento de nutrientes em todas as etapas da vida do animal é imprescindível para se obter um bom desenvolvimento corporal, e um produto de elevada qualidade (Wicks et al., 2019).

A estratégia nutricional conhecida como *creep-feeding* consiste em fornecer alimentação suplementar e privativa para bezerros, que pode ser de grãos ou de forragem, durante a fase de aleitamento (Stewart, 2017) a fim de se obter indivíduos mais pesados ao desmame, acelerar a deposição das gorduras de cobertura e entremeada e, assim, encurtar o tempo de acabamento da carcaça para o abate, além de fornecer descanso para a matriz (Dantas et al., 2010). Neste sentido, a suplementação durante a fase de cria (do nascimento ao desmame), leva a adaptações metabólicas diferentes em relação aos animais que são desmamados de forma convencional (sem suplementação) (Scheffler et al., 2014).

A prática do *creep-feeding* tem aumentado o ganho de peso dos animais ao desmame no Brasil (Valente et al., 2012; Barros et al., 2015; Lopes et al., 2016), bem como em outros países (Viñoles et al., 2013; et al., 2017). Ademais, de acordo com Stewart (2017), foi demonstrado, por meio de diversos estudos, que a suplementação durante o aleitamento aumenta a gordura intramuscular, entretanto, para manter este aumento, é necessário que os animais permaneçam sendo alimentados com dietas contendo grãos até o abate.

A gordura intramuscular (marmoreio) é a definição dada às manchas brancas de gordura presentes na carne magra do músculo (ElMasry et al., 2012). Para mensuração desta característica a avaliação visual tem sido a mais utilizada pela indústria da carne, entretanto, a análise química tem sido aplicada como o método padrão para determinação do teor de gordura entremeada (Cheng et al., 2015), sendo este um importante indicador da qualidade da carne, já que está relacionado a

aspectos sensoriais como aparência, sabor e suculência (ElMasry et al., 2012). O marmoreio é o resultado da adipogênese e lipogênese, que modulam o número e o tamanho das células adiposas intramusculares, respectivamente. Segundo Moriel et al. (2014), a alimentação com uma dieta de alto concentrado imediatamente após o desmame precoce aumentou a expressão muscular de genes relacionados ao crescimento, bem como de genes adipogênicos.

Na bovinocultura em geral, sobretudo em raças taurinas, ferramentas moleculares têm sido amplamente empregadas nas últimas décadas com o intuito de obter informações a respeito de genes, processos biológicos e vias metabólicas relacionadas às características de interesse econômico, bem como à diferentes tratamentos aos quais os animais são submetidos. Aliados aos estudos de identificação de genes diferencialmente expressos, análises de coexpressão gênica são utilizadas a fim de entender melhor a interação e o perfil de expressão dos genes associados aos fenótipos e tratamentos. Estas análises apontam genes diferencialmente expressos identificados em estudos prévios, bem como outros genes que não são diferencialmente expressos, mas que estão relacionados à característica de interesse (Hudson et al., 2012).

Diante da importância de se entender os mecanismos moleculares relacionados a influência da suplementação de bezerros sobre a quantidade e a qualidade da carne produzida, bem como a escassez de estudos sobre as diferenças na coexpressão gênica neste contexto, este estudo teve como objetivo analisar a coexpressão gênica ao desmame no músculo de bovinos mestiços criados com ou sem *creep-feeding*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e tratamentos

Foram utilizados 48 bovinos cruzados F1 Angus-Nelore. Estes animais eram todos machos, não castrados (inteiros) e meio irmãos, ou seja, eram filhos de um

mesmo touro da raça Aberdeen Angus (*Bos taurus*). Suas mães (da raça Nelore – *Bos indicus*), apresentavam peso corporal de 414 ± 45 kg. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil (Protocolo número 013689/19).

A parte inicial do experimento a campo (fase de cria) foi conduzido em fazenda comercial, de agosto de 2019 a janeiro de 2020. Durante a maior parte da fase de cria (a partir dos 30 dias de idade até a desmama – aproximadamente 210 dias), estes animais foram submetidos a dois tratamentos diferentes, com 24 animais em cada um: grupo 1 ou controle (G1) – sem suplementação em *creep-feeding* (desmama convencional); grupo 2 (G2) – com suplementação em *creep-feeding*. No sistema de cria do tipo *creep-feeding* os animais foram mantidos com suas respectivas mães no mesmo piquete, porém com acesso exclusivo a suplemento correspondente à aproximadamente 1% do peso corporal. As matrizes foram estratificadas de acordo com a data e número de partos (primíparas ou multíparas) e distribuídas em dois piquetes de capim *Brachiaria* de 20 hectares. O ajuste da quantidade de suplemento fornecido por animal foi feito semanalmente com base na predição de desempenho usando um sistema de avaliação e formulação de dieta. O suplemento que foi oferecido aos animais do G2 (em *creep-feeding* na fase de cria – 30 a 210 dias de vida) foi constituído na matéria seca (MS) de 22% de proteína bruta (PB) e 65% de nutrientes digestíveis totais (NDT), a base de milho moído (44,8%), farelo de soja (40,4%) e núcleo mineral (14,8%). Após o desmame, ocorrido em média aos 210 dias de vida, os animais dos dois tratamentos foram levados à confinamento, onde permaneceram por aproximadamente 180 dias. Foram alojados em baias coletivas cobertas (três animais/baia com 10 m² por animal), com piso de concreto. Os dois grupos de animais receberam a mesma dieta, formulada com o software Ração Lucro Máximo RLM 3.3 (Lanna et al., 2011), utilizando o sistema ESALQ Tropicalized NRC, *ad libitum*, dividida em duas partes iguais (duas vezes ao dia) às 8:00 e 16:00. A dieta continha 12,6% de forragem e 87,4% de concentrado à base de milho. Os animais foram pesados, após jejum de 16 horas, no início da fase de cria (peso inicial – PI), ao final da desmama (peso à desmama – PD) e ao término do período de confinamento (peso final – PF). A partir de PI e PD foi calculado o ganho de peso

médio diário 1 (GPMD1: do início da fase de cria à desmama) e a partir de PF e PD foi calculado o GPMD2 (da desmama até o final do confinamento).

2.2 Coleta de tecido muscular e análises de qualidade da carcaça e da carne

No desmame, amostras do músculo *Longissimus thoracis* (LT) foram coletadas por biópsia de 12 animais selecionados aleatoriamente de cada um dos dois tratamentos. Para biópsia realizada na altura da 13ª costela, a região torácica foi tricotomizada e um anestésico local (lidocaína 2%, 4mg/kg) foi administrado por via subcutânea. Após a limpeza do local, uma incisão de 1 cm foi feita e uma agulha de biópsia *Bergstrom* esterilizada foi usada para obter aproximadamente 1 g de tecido muscular, que foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido e posteriormente em um *ultrafreezer* a -80°C.

Após o período de confinamento (180 dias), os 48 animais foram transportados para um frigorífico comercial e abatidos, após jejum de sólidos por 16h, por atordoamento e secção da veia jugular. Após o abate, as carcaças foram identificadas, lavadas, divididas em duas metades. As meias-carcaças foram pesadas individualmente para obtenção do peso da carcaça quente (PCQ) e resfriadas em câmara fria por aproximadamente 24 h a 1°C. Decorrido o resfriamento, as carcaças foram retiradas da câmara e pesadas. Após a pesagem, o músculo LT da meia carcaça-esquerda foi separado do restante da carcaça e antes de ser desossado foram avaliados, entre a 12ª e 13ª vertebra torácica, a espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho de lombo (AOL). Amostras (bifes de contrafilé) do LT entre as 12ª e 13ª costelas da meia-carcaça esquerda foram coletadas e utilizadas para a condução em laboratório de análises físico-químicas de qualidade: índice de marmorização (IM), lipídeos totais/porcentagem de gordura (%G) e força de cisalhamento aos sete e 14 dias de maturação (FC7 e FC14).

Informações adicionais sobre as análises de carcaça e qualidade da carne utilizadas neste estudo podem ser encontradas em Ramírez-Zamudio et al. (2023).

2.3 Análise estatística de dados de peso, ganho de peso, carcaça e carne

Os dados relacionados à peso e ganho de peso e às características de carcaça e da carne – PI (kg), PD (kg), GPMD1 (kg), PF (kg), GPMD2 (kg), PCQ (kg), AOL (cm²), EGS (mm), IM (escore), %G (%), FC7 e FC14 (kg) – para os 48 animais (n = 24/grupo) foram analisados quanto à presença de informações discrepantes (*outliers*), homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos. Na sequência, os dados foram expressos por médias e seus respectivos erros padrão. Não foram necessárias transformações nas variáveis para providenciar uma aproximação da distribuição normal. As médias dos dois tratamentos foram comparadas por Teste t. Estas análises foram conduzidas com o auxílio do *software* R.

2.4 Extração e sequenciamento de RNA

Após a extração do RNA total, foram preparadas 24 bibliotecas genômicas, compostas por 12 amostras de cada grupo/tratamento (G1: sem *creep-feeding* e G2: com *creep-feeding*) coletadas no desmame. O RNA total das amostras foi extraído individualmente de 100 mg de músculo LT utilizando TRIzol[®] (Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e sua qualidade foi analisada em um Bioanalyzer 2100[®] (Agilent, EUA). Um número mínimo de integridade do RNA (RIN) ≥ 7 foi adotado para garantir a qualidade adequada do RNA total. RNAs com cauda poli-A, principalmente o mRNA, foram purificados a partir de RNA total usando esferas com oligos-dT.

As bibliotecas de cDNA de cada amostra foram preparadas e multiplexadas usando o kit TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina, EUA) a partir de 2 µg de RNA total, de acordo com o guia TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, EUA). O Bioanalyzer 2100[®] (Agilent, EUA) foi utilizado para estimar o tamanho médio das bibliotecas e PCR quantitativa (RT-qPCR), utilizando o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, EUA), para quantificá-las. A clusterização e o sequenciamento foram realizados em uma lane utilizando o kit HiSeq2500 v4 2x100 pb (Illumina, EUA) para produzir leituras de extremidade pareadas (*paired-end reads* – PE) de 100 pb. O

sequenciamento foi realizado na plataforma HiSeq 2500 ® (Illumina, EUA) com uma cobertura mínima de 16 milhões de *reads* por amostra.

2.5 Mapeamento das sequências no genoma de referência

Os dados de sequenciamento gerados pela plataforma HiSeq System Illumina foram convertidos para o formato FastQ e separados por biblioteca (dados multiplexados) utilizando o programa Casava 1.8.2 (Illumina, EUA). O *software* FastQC v.0.11.9 (Andrews, 2022) foi utilizado para analisar a qualidade das leituras brutas. Sequências adaptadoras e sequências de baixa qualidade foram removidas utilizando o Fastp v.0.23.1 (Chen et al., 2018). Após esta etapa, a qualidade das leituras foi reavaliada pela visualização combinada de todas as saídas do FastQC usando o programa MultiQC v.1.13 (Ewels et al., 2016) para confirmar o incremento da qualidade. Em seguida, as *reads* foram mapeadas no genoma de referência bovino (*Bos taurus* – ARS-UCD1.3), disponível em: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index/ (acessado em 19 de agosto de 2021), por meio do programa STAR v.2.7.20 (Dobin et al., 2013). O mapeamento foi realizado de forma independente para cada amostra/biblioteca. Para cada biblioteca foi gerado um arquivo com extensão *.bam*, que continha o alinhamento dos fragmentos ao genoma de referência. As *reads* mapeadas foram contadas utilizando o programa featurecounts v.2.0.3 (Liao et al., 2014). Apenas leituras de sequências pareadas (*paired-end reads*: *PE reads*) mapeadas em local único do genoma (*uniquely PE reads*) foram utilizadas nas análises de coexpressão gênica.

2.6 Determinação dos módulos de coexpressão

A determinação dos módulos de genes coexpressos foi realizada utilizando o pacote CEMiTool v. 1.28.0 (Russo et al., 2018) no *software* R. Os arquivos de entrada utilizados foram: (i) a matriz de contagem (transcritos gênicos x amostras); (ii) o de anotação de amostras, que indicava a distribuição das amostras dentro de cada tratamento; (iii) o de conjuntos de genes de vias canônicas dos bancos de dados KEGG, WikiPathways e Reactome, e de genes derivados da ontologia de Processos

Biológicos do *Gene Ontology* (GO), todos disponíveis em <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>; e (iv) o arquivo de interações gênicas/proteicas (interactoma) para a espécie *Bos taurus*, obtidos no banco de dados STRING (dados de interação - <https://string-db.org/cgi/download>), versão 12,0.

Na primeira etapa, o pacote efetuou uma filtragem automática dos genes de entrada. É assumida uma distribuição gama inversa dos genes e são selecionados os genes com base em um valor de p ; foi utilizado $p = 0,01$. Também foi aplicado o filtro de transformação de estabilização da variância (VST). O pacote ainda remove, por padrão, 25% dos genes com a expressão média mais baixas nas amostras (Russo et al., 2018). Na etapa seguinte, foram determinados os valores de correlação entre cada par de genes presentes no arquivo de expressão (neste estudo foi aplicada a correlação de *Pearson*).

O parâmetro *network_type* do pacote foi alterado de *unsigned* para *signed*. Tal parâmetro foi utilizado pois, de acordo com Van Dam et al. (2018), uma rede *unsigned* considera valores absolutos de correlação, ou seja, dois genes com correlação negativa são considerados coexpressos. Porém este gene correlacionado negativamente também é coexpresso positivamente com outros genes distintos, que se agrupam no mesmo módulo. Nesse sentido, os autores afirmam que uma rede *signed*, onde os valores de correlação são escalonados de 0 a 1, resolve este problema e cria redes em que módulos biologicamente significativos são melhor separados.

O conjunto de parâmetros aplicados no pacote CEMITool do programa R encontra-se apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros aplicados no pacote CEMITool do R para análise de coexpressão.

Parâmetro	Descrição	Valor
apply_vst		TRUE
beta	Value of beta chosen	16
cor_method	Correlation method	pearson

diss_thresh	Dissimilarity threshold to be used as cutoff on hierarchical clustering	0.8
filter		TRUE
filter_pval	p-value used on filtering	0.1
merge_similar	Should similar modules be merged?	TRUE
min_ngen	Minimum number of genes per module	30
network_type		signed
n_mods	Number of modules returned by CEMiTool	7
phi	Area under curve / Total area in the Beta vs R squared graph	0.656
r2	Determination coefficient. Reflects the "scale-freeness" of the resulting network	0.84

2.7 Análises subsequentes complementares

A Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (*Gene Set Enrichment Analysis* – GSEA) para cada módulo de coexpressão foi executada utilizando o algoritmo GSEA incorporado no CEMiTool. Essa análise permitiu identificar a associação coletiva de genes de um módulo com os tratamentos aplicados no estudo (Mishra et al., 2014).

A análise de sobre representação (*Over Representation Analysis* – ORA) foi realizada com as vias (*pathways*) KEGG, Reactome e WikiPathways, além dos Processos Biológicos do *Gene Ontology*, utilizando os pacotes clusterProfiler v. 4.10.1 (Wu et al., 2021) e enrichplot v. 1.22.0 no ambiente do *software* R; os termos que possuíam valores de p ajustados (para taxas de descoberta falsa – FDR) $\leq 0,05$ foram definidos como significativamente enriquecidos. A partir desta análise foi possível verificar se os genes de cada módulo estavam enriquecidos em vias ou processos conhecidos.

As redes de coexpressão geralmente incluem módulos com muitos genes, tornando essencial prospectar quais genes dentro de cada módulo representam melhor seu comportamento. Para esse propósito, foram identificados os genes centrais, do inglês *hubs genes*. As interações nos módulos, que é o resultado da integração das redes de coexpressão com dados de interactoma, foram identificados

pelo CEMITool; a partir dessa análise o pacote retornou os principais *genes hubs* (genes com mais conexões dentro de cada módulo).

3 RESULTADOS

3.1 Desempenho e qualidade da carcaça e da carne

Em relação ao desempenho, diferenças significativas foram observadas entre os grupos durante a fase de cria. Para PD, os animais do G2 (*creep-feeding*) foram mais pesados do que os animais G1 (sem *creep-feeding*) ($243,57 \pm 5,70$ vs. $228,92 \pm 5,07$; $p < 0,05$). O ADG1 foi maior em G2 em comparação com G1 ($1,03 \pm 0,03$ vs. $0,93 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos para PI, PF, GPMD2 e PCQ.

No que diz respeito às características relacionadas à qualidade da carcaça e da carne, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos para AOL, FC7 e FC14. Por outro lado, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) para EGS, %G e IM. Para todas as três características relacionadas à deposição de gordura na carcaça, os animais do G2 (com *creep-feeding*) apresentaram valores médios mais altos do que os animais do G1 (sem *creep-feeding*) – EGS ($12,96 \pm 0,83$ vs. $10,61 \pm 0,42$), %G ($5,80 \pm 0,23$ vs. $4,95 \pm 0,20$) e IM ($366,11 \pm 12,39$ vs. $321,50 \pm 13,65$).

Informações detalhadas sobre os resultados obtidos neste estudo para desempenho e análises de carcaça e qualidade da carne podem ser encontradas em Ramírez-Zamudio et al. (2023).

3.2 Sequenciamento de RNA e mapeamento das *reads* no genoma de referência

A concentração média do RNA total obtido para as 24 amostras extraídas foi de $260,27 \text{ ng}/\mu\text{L}$. As razões 260/280nm e 260/230nm foram de aproximadamente 1,9. As contaminações por DNA genômico foram em média de 1,04% (mínimo 0,73% e máximo 1,11%). O número de integridade do RNA (RIN) médio foi de 7,6 (mínimo 7,0

e máximo 8,0). Desta forma, foi confirmado que as amostras estavam integras (todos os valores de RIN acima de 7) e livres de contaminantes, apropriadas para o sequenciamento.

No total foram obtidas 241,2 milhões de *paired-end reads* (*PE reads*: 2x100 pb), das quais 230,5 milhões foram mapeadas em local único do genoma (*uniquely PE reads*). A cobertura alcançada pelo sequenciamento foi de 37X (cobertura para todos os transcritos de todas as amostras). Em média, foram obtidas 9,6 milhões de *uniquely PE reads* por amostra, o que correspondeu a 95,56% do total de *PE reads* geradas.

As *reads* foram mapeadas em 27.607 genes (codificantes e não codificantes de proteínas). Entretanto, considerando a contagem maior ou igual a três (*uniquely PE reads* ≥ 3) em pelo menos 12 amostras, o número total de genes considerados expressos e, portanto, utilizados no arquivo de contagem de entrada da análise de coexpressão, foi de 16.604.

3.3 Módulos de coexpressão

Um total de 631 genes foram inferidos em sete módulos (M1, M2, M3, M4, M5, M6 e não correlacionado), organizados de forma decrescente quanto a número de genes por módulo, com 216, 145, 76, 70, 67, 44 e 13 genes, respectivamente (Apêndice A). Os módulos 1, 2 e 3 tiveram maior associação de suas atividades com os tratamentos aplicados, o que foi constatado pelos valores de escore de enriquecimento normalizado (*Normalized Enrichment Score – NES*) da *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). O NES representa o valor normalizado da representação de um conjunto específico de genes nas extremidades superiores ou inferiores de uma lista ranqueada de genes. Nestes casos, o conjunto de genes será considerado enriquecido. Em contrapartida, o conjunto não será considerado enriquecido se os genes forem distribuídos de forma aleatória ao longo da lista.

Dentre os três principais módulos, 2 e 3 apresentaram atividade aumentada no G2 (com *creep-feeding*), com valores NES de 6,11 e 3,53, respectivamente, em detrimento a G1 (sem *creep-feeding*) (NES = - 6,23 e - 3,53, respectivamente). Em

relação ao módulo 1, aconteceu o inverso, com uma maior atividade no G1 (NES = 4,08) e menor no G2 (NES = - 4,06). Estes resultados encontram-se apresentados na Figura 1 e Apêndice B.

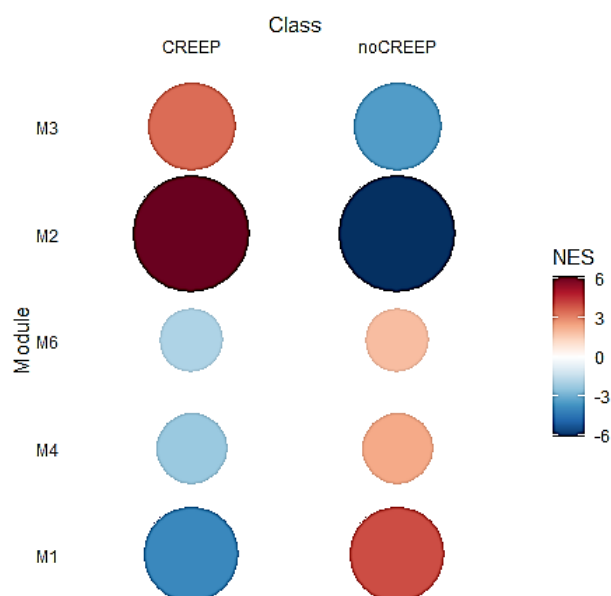


Figura 1. Análise de enriquecimento de grupo de genes (GSEA); *Heatmap* do valor NES, onde cor e circunferência indicam o escore de enriquecimento de cada módulo em cada grupo experimental.

A análise de sobre representação – ORA (Figura 2) retornou para o módulo 1 como principal via metabólica (*pathway*) enriquecida a adipogênese (WP987). Outras vias de destaque foram: receptores nucleares da meta-via (WP2882) e transcrição mediada por foxo (bta9614085). Já nos módulos 2 e 3 foram enriquecidas vias relacionadas ao metabolismo e síntese de músculo, contração muscular (bta397014), além de vias de metabolismo e síntese de ácidos graxos, como as vias metabolismo do colesterol com vias de bloch e kandutsch-russell (WP4718), síntese de ácidos graxos ômega-9 (WP4724) e metabolismo energético (WP1541).

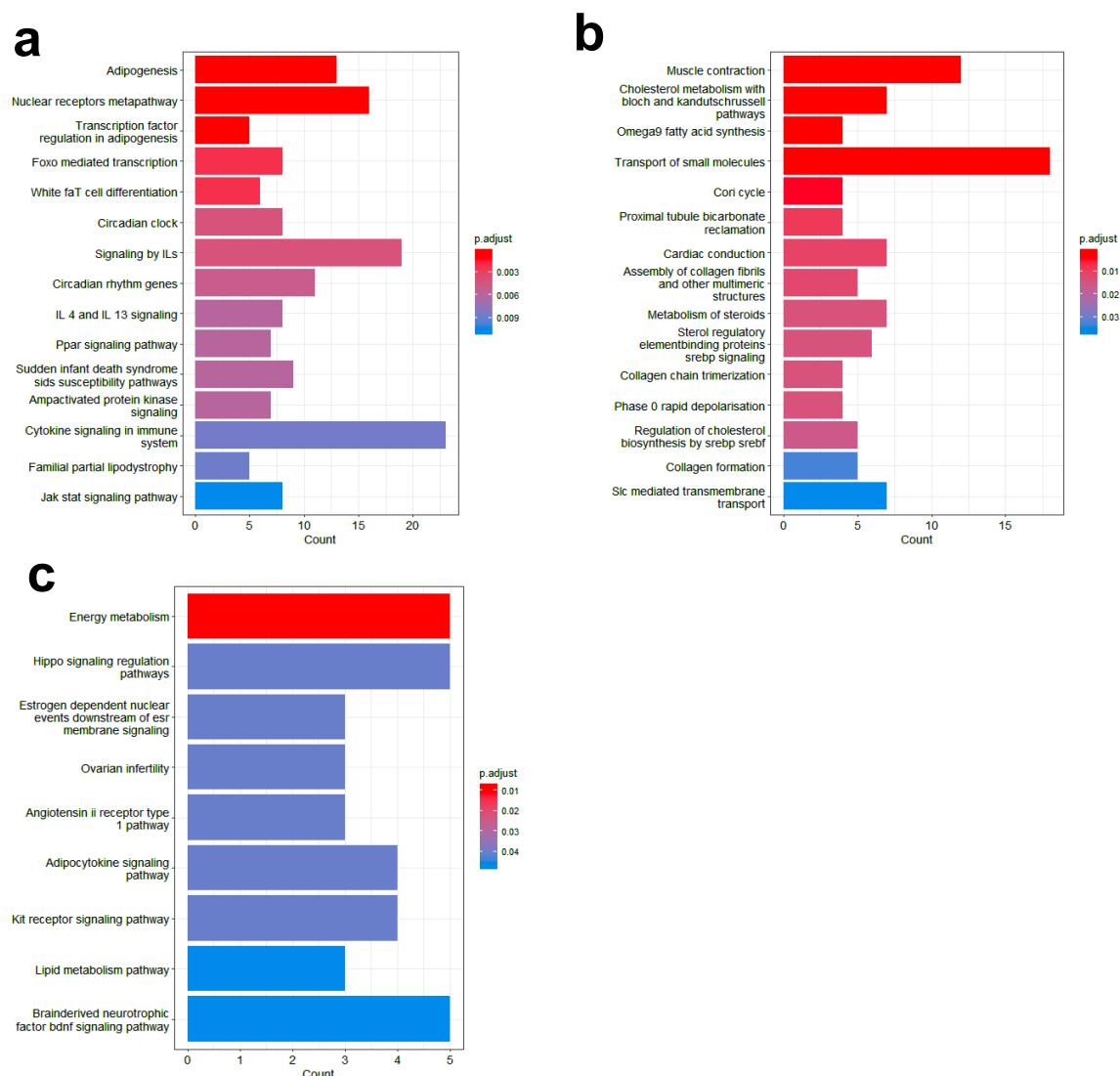


Figura 2. Análise de sobre representação para os módulos 1 (a), 2 (b) e 3 (c), onde a cor da barra representa o valor de p ajustado e o comprimento representa o número de genes que enriquecem a via metabólica.

Ainda com base na análise de sobre representação, foram identificados os principais processos biológicos enriquecidos em cada módulo, conforme ilustrado na Figura 3. Dentre esses, os que mais se destacaram pela capacidade de explicar o fenótipo foram: resposta ao corticosteroides (GO:0031960), oxidação lipídica (GO:0034440) e resposta à cetona (GO:1901654) no módulo 1; processo do sistema muscular (GO:0003012), processo do sistema circulatório (GO:0003013) e

diferenciação de células de gordura (GO:0045444) no módulo 2; além de desenvolvimento do tecido muscular (GO:0060537), desenvolvimento do tecido muscular estriado (GO:0014706) e desenvolvimento da estrutura muscular (GO:0061061) no módulo 3.

Todas as vias metabólicas e processos biológicos enriquecido a partir dos genes dos módulos 1, 2 e 3 estão apresentados nos apêndices Apêndice **C**, Apêndice **D** e Apêndice **E**, respectivamente.

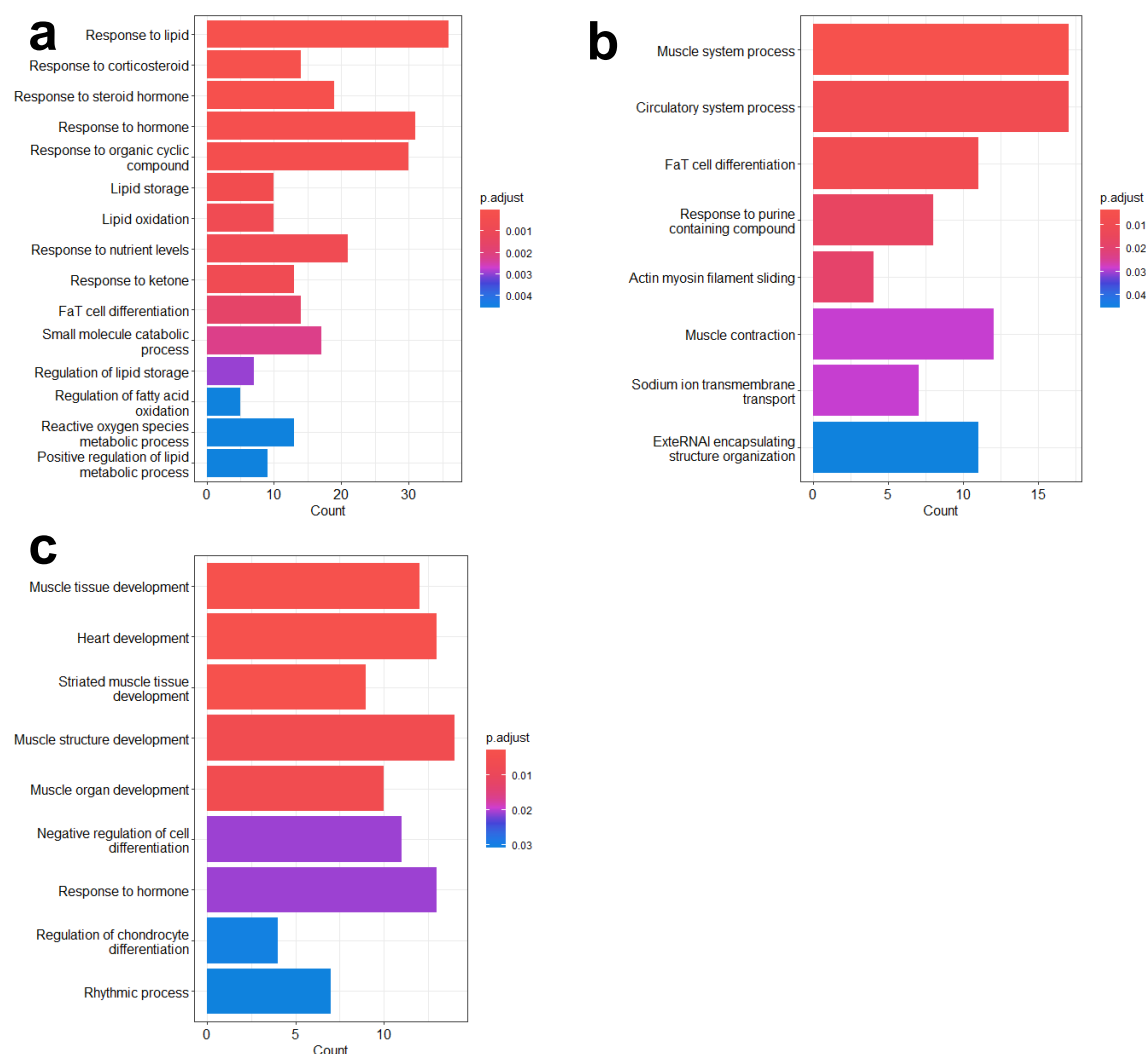


Figura 3. Análise de sobre representação para os módulos 1 (a), 2 (b) e 3 (c), onde a cor da barra representa o valor de p ajustado e o comprimento representa o número de genes que enriquecem o processo biológico.

Embora os genes *hubs* tenham sido destacados pelas análises de rede de interação (Figura 4), o número resultante ainda foi relativamente alto para priorizar os mais importantes. Nas redes de interação gênica, o tamanho do nó reflete o seu grau, e os genes com maior número de conexões são destacados. As cores das caixas demonstram a origem da interação: azul – se a interação decorre da análise de coexpressão; vermelho – se a interação advém exclusivamente do arquivo de interações inserido; verde – se a interação provém em ambos.

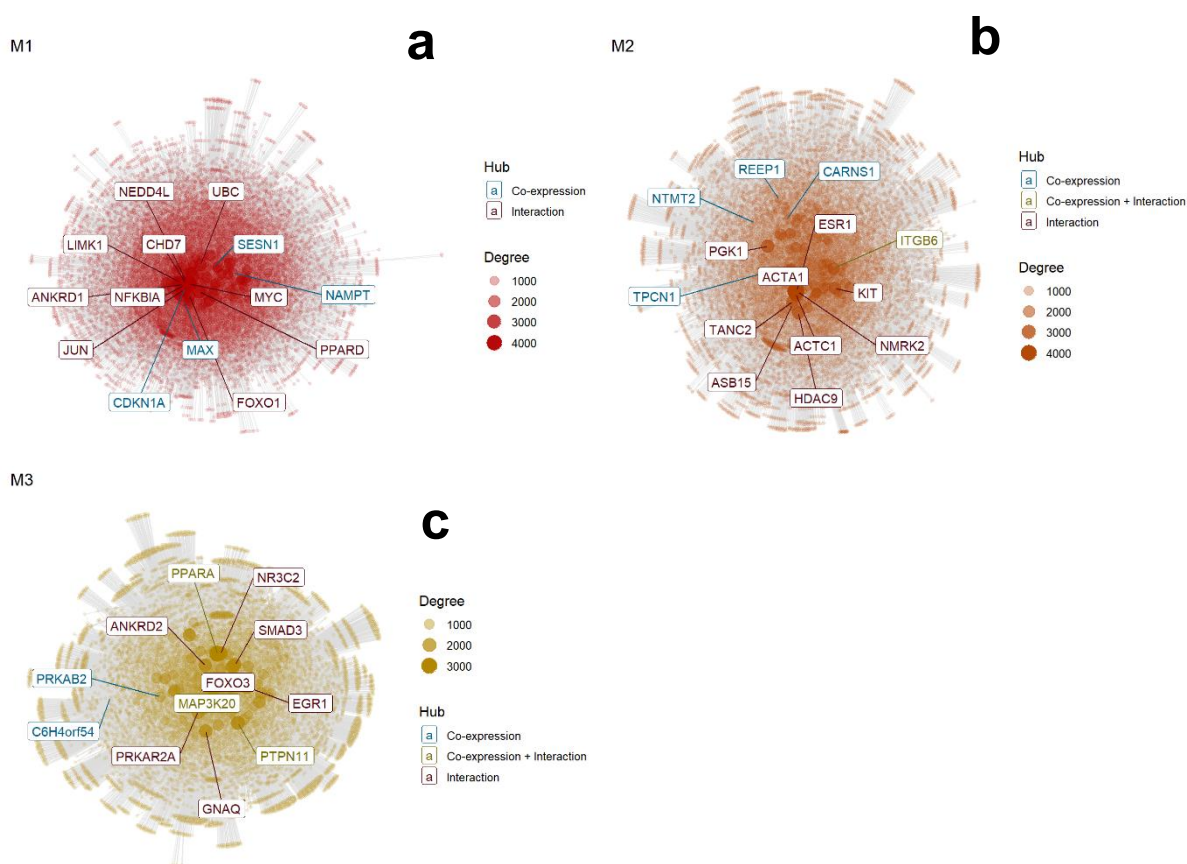


Figura 4. Redes de interação gênica dos módulos 1(a), 2(b) e 3(c), com destaque para os genes *hubs*.

Para priorizar *hubs genes* de maior relevância, analisou-se a sua distribuição na lista ranqueada de genes da GSEA (Figura 5). Desta forma, foram evidenciados genes que, além de serem *hubs*, também estavam nas extremidades da lista ranqueada. Neste sentido, os *hubs genes* de destaque foram *CDKN1A*, *FOXO1* e

NAMPT, no módulo 1; *ITGB6*, *REEP1* e *TPCN*, no módulo 2 e *PPARA*, *MAP3K20* e *PTPN11*, no módulo 3.

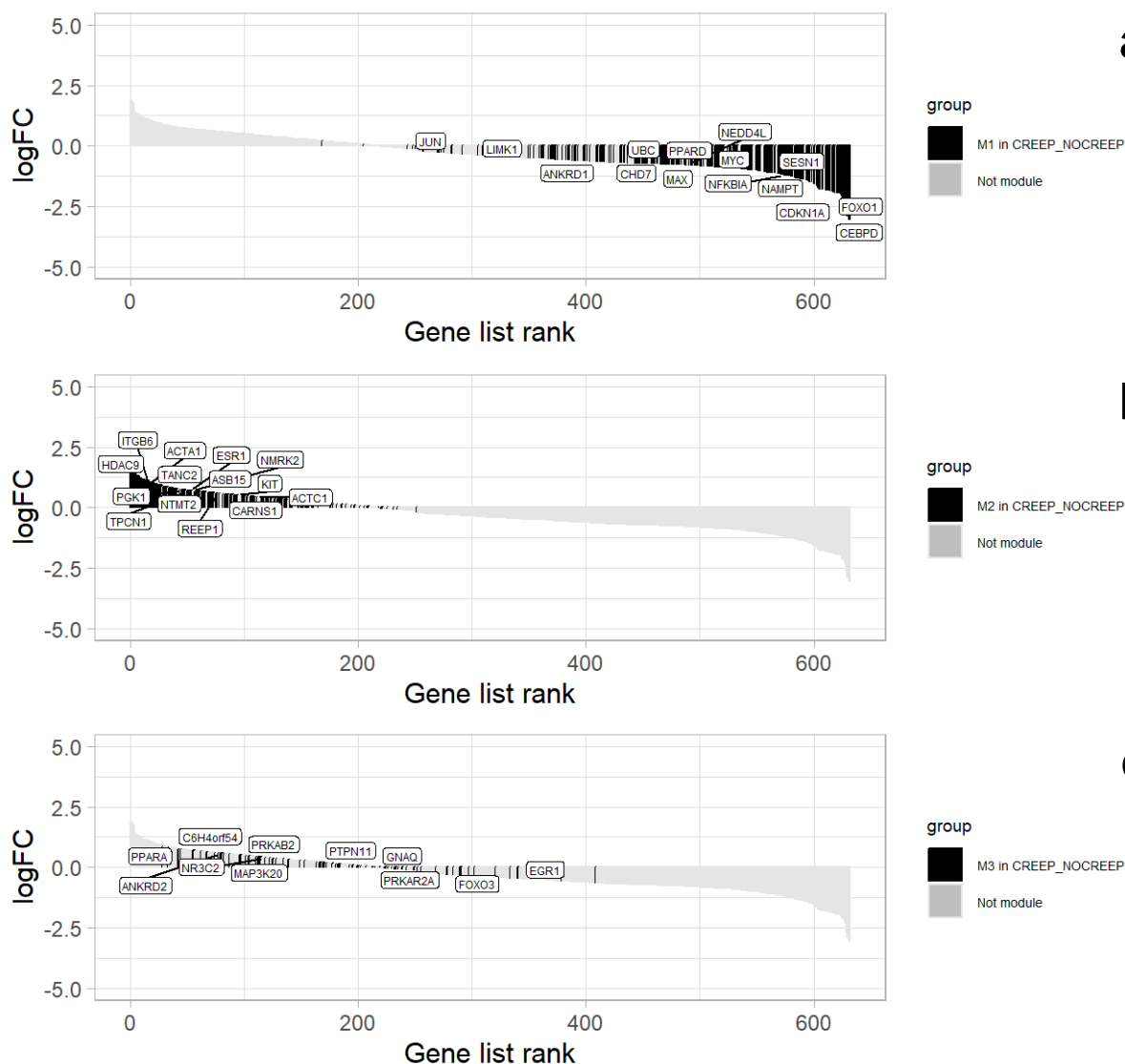


Figura 5. Distribuição dos *hubs* genes na lista ranqueada de genes da GSEA nos módulos 1(a), 2(b) e 3(c).

4 DISCUSSÃO

4.1 Módulo 1

4.1.1 Vias metabólicas e processos biológicos enriquecidos de destaque

Entre os módulos identificados, o módulo 1 destacou-se por apresentar atividade aumentada no G1 (sem *creep-feeding*).

Em sistemas de criação de bovinos alimentados com gramíneas tropicais, a suplementação é de grande importância, já que estas gramíneas raramente representam uma dieta balanceada para estes animais, tal fato é intensificado durante a estação seca, onde há uma elevada redução na qualidade nutricional deste alimento (Detmann et al., 2014). Dado que as gramíneas tropicais não fornecem uma dieta balanceada, a ausência de suplementação nesse sistema de criação resulta em privação de nutrientes. Essa condição pode estimular a produção de glicocorticoides, que promovem a lipólise nos adipócitos, gerando glicerol, que é utilizado como substrato para a gliconeogênese, e ácidos graxos livres, que são oxidados para fornecer energia (Xu et al., 2009; Akalestou et al., 2020). Conforme revisado por Rico e Barrientos-Blanco (2024), esses ácidos graxos livres são oxidados nas mitocôndrias, levando à produção de corpos cetônicos, os quais são, então, utilizados como uma fonte alternativa de energia por tecidos periféricos, como o músculo esquelético, contribuindo para a manutenção do metabolismo celular sob condições de privação nutricional.

Diante disso, o enriquecimento dos processos biológicos resposta ao corticosteróide (GO:0031960), oxidação lipídica (GO:0034440) e resposta à cetona (GO:1901654) foi consistente com este módulo gênico, o qual foi mais ativo em animais não suplementados. Tais atividades moleculares tiveram reflexos diretos nas características fenotípicas desses animais, como menor peso à desmama e menor deposição de gorduras subcutânea e intramuscular.

As vias metabólicas enriquecidas também permitiram a compreensão da ação dos tratamentos sobre o metabolismo, refletindo na divergência fenotípica, quanto ao desempenho e composição de carcaça. Num primeiro momento o enriquecimento da via Adipogêneses (WP987) no G1 (sem *creep-feeding*) que apresentou menor conteúdo de gordura subcutânea e intramuscular, pode parecer um resultado

contraditório, porém diversos dos genes enriquecidos nestas vias, como os *hubs* *CDKN1A*, *FOXO1* e *NAMPT* têm sido correlacionados negativamente com o desenvolvimento do tecido adiposo em mamíferos (Seong e Ha, 2019; Liu et al., 2021; Chen et al., 2019; Fulco et al., 2008).

Os receptores nucleares da meta-via dos receptores nucleares (WP2882) são uma família de fatores de transcrição que regulam diversos processos fisiológicos, dentre os quais está o metabolismo (Weikum et al., 2018). Estes receptores atuam como sensores lipídicos, mantendo a homeostase lipídica, já que governam a transcrição de uma família de genes envolvidos no metabolismo, armazenamento, transporte e eliminação de lipídios (Chawla et al., 2001).

A família FOXO de fatores de transcrição *Forkhead* é responsável pela regulação positiva de genes-alvo envolvidos na resistência ao estresse, no metabolismo, na parada do ciclo celular e na apoptose (Calnan e Brunet, 2008). Ainda segundo estes autores, os fatores de transcrição FOXO são regulados por diversos estímulos externos, como insulina, fatores de crescimento, neurotrofinas, citocinas, estímulos de estresse oxidativo e privação de nutrientes. Em situações de privação de nutrientes, pode ocorrer atrofia muscular devido à ativação das proteínas FOXO. Nesse contexto, há um aumento na expressão de ligases de ubiquitina específicas do músculo, como *atrogin-1* (*MAFbx*) e *Muscle RING-finger protein-1* (*MuRF1*), que são responsáveis pela manipulação de proteínas musculares por meio da via ubiquitina-proteassoma (Furuyama et al., 2003; Gross et al., 2009). Portanto, o enriquecimento da via transcrição mediada por foxo (bta9614085) sugere que as adaptações metabólicas desencadeadas pela falta de suplementação impactaram nos níveis de crescimento e desenvolvimento muscular de bezerros F1 Angus-Nelore.

4.1.2 *Hubs* genes de destaque

Os *hubs* genes de destaque do módulo 1 estão negativamente relacionados com o desenvolvimento do tecido muscular e adiposo. Dentre estes destacam-se o *CDKN1A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*), *FOXO1* (*Forkhead Box O1*) e *NAMPT* (*Nicotinamide Phosphoribosyltransferase*).

As proteínas de ligação ao intensificador CCAAT beta (CEBPB) e delta (CEBPD) são essenciais para o desenvolvimento do tecido adiposo. Estes são expressos no estágio inicial da adipogênese e induzem a expressão de *PPAR γ* e *C/EBP α* , porém *CEBPs* não são eficientes sem *PPAR γ* (Lee et al., 2019). O *PPAR γ* , um importante regulador da lipogênese, tem sua atividade transcricional inibida pelo fator de transcrição FOXO1 (codificado pelo gene de mesmo nome – *FOXO1*), o que reprime a lipogênese (Chen et al., 2019). Ainda segundo estes autores, *FOXO1* também exerce controle negativo sobre a proliferação de adipócitos, por meio da expressão de *CDKN1A*, que codifica a proteína p21 e *CDKN1B*, que codifica a proteína p27. O *CDKN1A* atua nos estágios iniciais da diferenciação dos pré-adipócitos, sendo o principal inibidor do ciclo celular, já que é responsável por bloquear a transição da fase G1 para a fase S, o que o correlaciona negativamente com a adipogênese (Liu et al., 2021; Seong e Ha, 2019).

A alta atividade dos genes centrais *FOXO1* e *CDKN1A*, devido à privação nutricional durante a fase de cria (dos 30 aos 210 dias), desfavoreceu a adipogênese. Em bovinos, a hiperplasia de adipócitos ocorre principalmente no final da gestação e no período neonatal até os 250 dias – período denominado “janela de marmoreio” (Du et al., 2017). Após este período, mesmo com o fornecimento de uma dieta de terminação, com elevada proporção de grãos, o escore de marmoreio foi comprometido. Isso ocorre pois, segundo Ladeira et al. (2018), após o período da janela de marmoreio, os efeitos da manipulação alimentar se limitam à hipertrofia dos adipócitos já existentes. Assim, a restrição nutricional, decorrente da falta de suplementação em bezerros a pasto, causou uma regulação negativa irreversível da adipogênese, mediada pelos genes *FOXO1* e *CDKN1A*.

Em decorrência do efeito sobre o ciclo celular, além da regulação negativa da adipogênese, *FOXO1* e *CDKN1A* também regulam negativamente a miogênese. Já que *FOXO1* é um regulador negativo dos estágios iniciais da diferenciação do músculo esquelético (Xu et al., 2016). A supressão de p21, proteína codificada por *CDKN1A*, aumentou a proliferação de células satélites nos músculos de camundongos mais de três vezes quando comparado ao controle (Biferi et al., 2015). As células satélites são um tipo de células-tronco pluripotentes presentes no músculo esquelético que

possuem a capacidade de diferenciação miogênica (Park et al., 2018). Dado os efeitos negativos destes genes sobre a adipogênese e miogênese ficam evidentes suas contribuições para o menor peso à desmama e menor deposição de gordura subcutânea e intramuscular ao abate.

De acordo com Fulco et al. (2008) o gene *NAMPT* é um dos componentes moleculares de uma via de sinalização funcional responsável pela percepção e reação das células do músculo esquelético frente à disponibilidade de nutrientes. Ainda segundo estes autores, *NAMPT* é ativado em condições de disponibilidade reduzida de nutrientes, a fim de impedir a realização de processos que demandam energia, como a diferenciação celular. Sob tais condições, em mamíferos, ocorre aumento na expressão de *NAMPT* no músculo esquelético (Song et al., 2014) e no tecido adiposo subcutâneo (Kovacikova et al., 2008). Tais constatações permitem inferir que o leite das vacas e o pasto não foram suficientes para suprir a demanda nutricional dos bezerros do G1, evidenciando a necessidade de suplementação para otimizar a deposição muscular e adiposa.

Há relatos de que tanto a privação de nutrientes (Fulco et al., 2008), quanto a atividade física (Cantó et al., 2010) aumentam a expressão de *NAMPT*, no músculo esquelético. O aumento da atividade física é esperado em bovinos não suplementados. Isto ocorre pois bovinos nestas condições passam mais tempo em atividade de pastejo, e essa maior atividade aumenta os requisitos de energia para manutenção (Machado et al., 2012). Portanto, para suprir a necessidade energética a gordura que seria acumulada é utilizada para suprimento de energia de manutenção, o que resulta em menor deposição de gordura.

4.2 Módulos 2 e 3

4.2.1 Vias metabólicas e processos biológicos enriquecidos de destaque

Entre os módulos identificados, os módulos 2 e 3 se destacaram por apresentarem atividade aumentada no G2 (com *creep-feeding*).

Os animais oriundos deste tratamento apresentaram maior peso à desmama e maior deposição de gordura subcutânea e intramuscular. As vias metabólicas (Figura 2) e processos biológicos (Figura 3) enriquecidos nestes módulos estão relacionadas ao desenvolvimento muscular e adiposo, o que reforça o papel destes módulos sobre o desempenho e as características de carcaça observados, em decorrência da suplementação em *creep-feeding*.

A suplementação de bezerros via *creep-feeding* é uma ferramenta eficaz para melhorar o ganho de peso na fase de cria (Carvalho et al., 2019). Tal fato decorre da limitação de desempenho imposta pelo leite e pelo pasto. Em bezerros Nelore, o leite torna-se limitante em energia por volta dos três meses de vida, enquanto o teor de proteína se torna um limitante por volta dos cinco meses (Lopes et al., 2023). Estes autores enfatizam que devido a tais limitações, bem como às alterações no trato gastrointestinal, os bezerros passam a depender cada vez mais do pasto, porém em sistemas tropicais, tal período geralmente coincide com um declínio qualiquantitativo desse recurso alimentício. Isto torna o *creep-feeding* uma ferramenta essencial para otimizar o ganho de peso de bezerros em sistemas que buscam maior eficiência.

A deposição de músculo e gordura é um processo dinâmico, resultante do balanço entre a biossíntese e a degradação de proteínas e lipídios. Após o nascimento, as deposições destes dois tecidos ocorrem simultaneamente, com a deposição de proteína sendo preferencial em relação à gordura na fase inicial do crescimento (Bonnet et al., 2010). Além disso, o tamanho e o número de células musculares e adiposas são regulados por fatores inter-relacionados que afetam o desenvolvimento de ambos os tipos de celulares (Bonnet et al., 2010).

A via contração muscular (bta397014) e o processo do sistema muscular (GO: 0003012) foram enriquecidos a partir dos genes presentes no módulo 2, enquanto os processos biológicos desenvolvimento do tecido muscular (GO:0060537), desenvolvimento do tecido muscular estriado (GO:0014706) e desenvolvimento da estrutura muscular (GO:0061061) foram enriquecidos a partir dos genes presentes no módulo 3.

O crescimento do músculo é um processo complexo que além das células contráteis, envolve o desenvolvimento da matriz extracelular e vasos sanguíneos (Guo et al., 2015). O desenvolvimento da estrutura contrátil se divide em duas fases, uma fase pré-natal, onde as fibras musculares crescem por hiperplasia (aumento do número de fibras), já na fase pós-natal o crescimento das fibras musculares decorre da hipertrofia (aumento do volume das fibras) (Guo et al., 2015). Esse processo hipertrófico é resultado da proliferação, diferenciação e fusão das chamadas células satélites com as fibras musculares existentes. As células satélites são derivadas de mioblastos fetais, que se tornam quiescentes e se localizam ao redor das fibras musculares maduras no músculo pós-natal (Du et al., 2015). Haja visto que as células satélites são gradualmente inativadas ao longo da vida do animal, o estímulo logo no início do crescimento pós-natal é de relevante importância. Tal fato foi corroborado no presente estudo pelo maior peso à desmama observado nos bezerros suplementados em *creep-feeding*, decorrente do maior ganho de peso na fase de cria (GPMD1).

Conforme descrito anteriormente, a miogênese não ocorre de maneira isolada, mas sim de forma dinâmica, juntamente com outros processos como a angiogênese, fibrogênese e adipogênese. Tal fato foi confirmado pelo enriquecimento dos processos biológicos diferenciação de células de gordura (GO: 0045444) e processo do sistema circulatório (GO: 0003013), bem como as vias metabólicas Metabolismo do colesterol de bloch e kandutsch-russell (WP4718) e síntese de ácidos graxos ômega-9 (WP4724) no módulo 2, e a via metabolismo energético (WP1541), no módulo 3.

A via metabolismo do colesterol com vias de bloch e kandutsch-russell (WP4346), envolve mais de 20 reações enzimáticas a partir da coenzima A acetilada (Luu et al., 2015). Nesse processo, a enzima lanosterol sintase (LSS) converte intermediários em lanosterol, precursor que alimenta duas vias distintas: Bloch e Kandutsch-Russell. Correlações positivas entre o teor de colesterol e o conteúdo de gordura intramuscular ou score de marmoreio em bovinos foram relatadas por Dinh et al. (2008) e Litwińczuk et al. (2015). Esses resultados vão ao encontro da maior deposição de gordura intramuscular observada em animais do G2, destacando a relevância do metabolismo do colesterol neste contexto.

Os ácidos graxos ômega-9 são um dos principais tipos de ácidos graxos monoinsaturados encontrados em fontes vegetais e animais (Farag e Gad, 2022). Animais alimentados com dietas concentradas apresentam uma maior proporção relativa de ácidos graxos monoinsaturados na carne, quando comparados com aqueles mantidos em pastejo (Alfaia et al., 2009; Daley et al., 2010). Portanto, o enriquecimento da via Síntese de ácidos graxos ômega-9 (WP4724), pode ser decorrente do fornecimento de alimento concentrado via *creep-feeding*.

Os fibroblastos e adipócitos são derivados de uma fonte comum de células progenitoras, denominadas progenitoras fibroadipogênicas, as quais são frequentemente associadas a vasos sanguíneos (Du et al., 2017). Esta associação entre adipócitos e vascularização pode explicar o enriquecimento do processo do sistema circulatório (GO: 0003013) neste módulo, já que foi observado um maior escore de marmoreio e teor de gordura intramuscular ao abate, reflexo de uma adipogênese mais intensa na fase de cria. Assim, é esperado que com aumento da angiogênese ocorra também o aumento da adipogênese.

4.2.2 *Hubs genes de destaque*

Os *hubs genes* destacados nos módulos dois e três apresentam influência sobre processos importantes para o desenvolvimento de tecidos da carcaça, como a miogênese e adipogênese. Dentre estes destacam-se o *ITGB6* (*Integrin Subunit Beta 6*), o *REEP1* (*Receptor Accessory Protein 1*) e o *TPCN1* (*Two Pore Segment Channel 1*) no módulo 2; além de *PPARA* (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha*), *PTPN11* (*Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11*) e *MAP3K20* (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 20*) no módulo 3.

O *ITGB6*, *hub gene* do módulo 2, destaca-se por ter efeito tanto na miogênese (Zhang et al., 2022), quanto na adipogênese (Park et al., 2018; Ueda et al., 2021). Este gene pertence à família das integrinas, as quais são receptores de adesão, que se ligam diretamente aos ligantes da matriz extracelular (MEC), e se conectam ao citoesqueleto por meio de várias proteínas adaptadoras (Kanchanawong e Calderwood, 2023).

O *ITGB6* está envolvido na remodelação da MEC, que acompanha a ativação das células satélites (Park et al., 2018; Zhang et al., 2021). As células musculares não aumentam em número no período pós-natal, porém nessa fase, ocorre o aumento do diâmetro das fibras musculares (hipertrofia), já que as células miogênicas, denominadas células satélites, continuam a proliferar e se fundir com as fibras musculares existentes (Du et al., 2013; Picard e Gagaoua, 2020). Em consonância com os resultados do presente estudo, Park et al., 2018 relataram o *ITGB6* como um nó-chave que conecta proteínas relacionadas à MEC ao citoesqueleto em camundongos. Ademais, os autores concluíram que o *ITGB6* é fundamental para o desenvolvimento do músculo esquelético, já que participa da regulação da diferenciação de células satélite e da remodelação da MEC.

A remodelação da MEC também está relacionada com a adipogênese intramuscular. De acordo com Nishimura (2010) a gordura intramuscular se deposita principalmente entre os feixes de fibras musculares (perimísio), o que causa a remodelação da MEC. Ainda sobre o efeito de *ITGB6* na adipogênese intramuscular, Ueda et al. (2021) relataram que a atividade de *ITGB6* foi maior no tecido adiposo intramuscular em comparação ao tecido adiposo subcutâneo de bovinos, o que pode ser um indicativo de sua especificidade para esse depósito de gordura. Portanto, a ação do *ITGB6* sobre a matriz extracelular e as consequências disso sobre a miogênese e adipogênese intramuscular, torna este um potencial marcador do desenvolvimento muscular e adiposo em bovinos, além de apoiar a elucidação da fisiologia envolvida no maior peso a desmama, bem como a maior deposição de gordura intramuscular e subcutânea nos animais do G2.

Outro gene com ação sobre células tronco miogênicas é o *PTPN11*, *hub gene* que integra o módulo 3. O *PTPN11* codifica a proteína SHP2, a qual desempenha um papel fundamental na homeostase das células-tronco (Kan et al., 2018). A inibição/ablação de *PTPN11* em camundongos, levou as células-tronco miogênicas pós-natais à troca do estado proliferativo para um estado de repouso durante o crescimento muscular (Griger et al., 2017). Em decorrência disso, o fenótipo observado foram camundongos com o crescimento do diâmetro geral do músculo e da fibra pós-natal atenuados. Além disso, essa função de *PTPN11* foi observada em

células-tronco miogênicas pós-natais, mas não fetais, o que demonstra uma especificidade deste gene na miogênese pós-natal, e corrobora com o maior peso a desmama observado em animais do G2.

Após a proliferação das células tronco miogênicas, inicia-se o processo de diferenciação, onde ocorre maturação de mioblastos em miócitos maduros, sendo este processo dependente de cálcio (Porter et al., 2002). Neste contexto age o gene *TPCN1*, hub no módulo 2, o qual pertence à família de canais de liberação de cálcio direcionados ao endolisossomo (TPCs ou TPCNs) controlados por fosfato de dinucleotídeo de ácido nicotínico de adenina (NAADP). Estes participam da regulação de diversos processos biológicos, dentre eles, a diferenciação celular (García-Rúa et al., 2016). Um dos processos de diferenciação celular regulados por TPCs é a diferenciação do músculo esquelético, que se dá em função da liberação de cálcio, por meio de TPCs, desencadeada pelo NAADP (Aley et al., 2010). Em camundongos com hipertrofia cardíaca, os TPCs tiveram uma expressão aumentada, enquanto a inibição de TPCs (*Tpcn1/2*^{-/-}) reduziu tal condição (Zélicourt et al., 2024).

Outro gene *hub* do módulo 3 com ação sobre a regulação da diferenciação de células musculares é o *MAP3K20*. Este é um membro da família MAPKKK de moléculas de transdução de sinal, que forma homodímeros para regular a via JNK/MAPK, que desempenha um papel positivo na regulação da diferenciação miogênica (Yan et al., 2021). Os mesmos autores destacam ainda que o *knockdown* de *MAP3K20*, durante o desenvolvimento do músculo esquelético pós-natal em camundongos, inibiu a proliferação de mioblastos e promoveu a diferenciação, enquanto a superexpressão do mesmo causou efeito contrário. Em estudo realizado por Wang et al. (2022), o *MAP3K20* também foi apontado como um dos genes *hubs* envolvidos no desenvolvimento do músculo esquelético de bovino.

A deposição de gordura intramuscular é o resultado da adipogênese e lipogênese. Enquanto a lipogênese é intensificada em condições de terminação, a adipogênese ocorre principalmente no final da gestação e se estende até os 250 dias de vida, principalmente na região intramuscular, período denominado janela de marmoreio (Du et al., 2017). Neste cenário, diante da boa disponibilidade de nutrientes em função da suplementação, genes relacionados ao metabolismo lipídico, *hubs nos*

módulos 2 e 3 foram ativados. Além da atuação do *ITGB6*, já descrita anteriormente, destacam-se o *PPARA* e o *REEP1*.

O *PPARA* é um dos três genes membros da família receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR), e atua como um sensor para mudanças nos níveis de ácidos graxos (Burri et al., 2010). Em condições de déficit energético, quando o organismo passa a utilizar ácidos graxos como principal fonte de energia, o *PPARA* aumenta sua atividade para captar esses ácidos graxos e promover a β -oxidação, por outro lado, no estado alimentado, o *PPARA* coordena diferentes vias de síntese *de novo* de lipídios (Pawlak et al., 2015).

A maior atividade de *PPARA* em função da suplementação, decorre, possivelmente, de um reflexo da dieta consumida pelos bezerros já que o farelo de soja representou 40,4% da composição do suplemento. Em oleaginosas como a soja são encontradas altas concentrações de ácidos graxos insaturados (Ladeira et al., 2020). Embora o perfil de ácidos graxos da dieta seja modificado pelo processo de biohidrogenação ruminal, uma parte dos ácidos graxos insaturados consumidos, podem atingir o músculo esquelético (Ramírez-Zamudio et al., 2023). De acordo com Ladeira et al. (2020), o uso da soja na dieta de bovinos aumentou a concentração de ácidos graxos insaturados no músculo, o que, conseqüentemente, aumentou a expressão de *PPARA*. Os autores ainda destacaram que tal fato foi confirmado pela correlação positiva de ácidos graxos monoinsaturados, ácidos oleico e linolênico com a expressão do *PPARA*.

Somado à ação do *PPARA*, o *REEP1* também pode ter influenciado a adipogênese nos bezerros suplementados. As proteínas REEPs formam uma família evolutivamente conservada, que é classificada em duas subfamílias principais, as subfamílias REEP1–4 e REEP5–6 (Fan et al., 2022). Ainda de acordo com estes autores, a *REEP1* tem como sua característica mais marcante, a atuação no metabolismo lipídico, que ocorre por meio de interações específicas com a seipina e a atlastina-1, proteínas que influenciam diretamente na regulação dos lipídios. A expressão de *REEP1* regula a adipogênese em camundongos, uma vez que em animais nocaute para este gene, a expressão de marcadores anti-adipogênese foi regulada positivamente, enquanto a expressão de marcadores pró-adipogênese foi

reduzida (Renvoisé et al., 2016). Embora sua importância na adipogênese tenha sido constatada em camundongos, inexistem estudos correlacionando este gene com a formação de células de gordura em bovinos, o que torna o presente achado um marco para investigações subsequentes.

5 CONCLUSÃO

A falta de suplementação na fase de cria dos bezerros provocou uma maior atividade de genes *hubs* como o *CDKN1A*, *FOXO1* e *NAMPT*, além do enriquecimento de processos biológicos e vias que podem suprimir a miogênese e a adipogênese. Por outro lado, com a suplementação aumentou-se o peso à desmama, bem como a deposição das gorduras intramuscular e subcutânea ao abate. Neste contexto houve maior atividade dos genes *hubs* *ITGB6*, *REEP1*, *TPCN*, *PPARA*, *PTPN11* e *MAP3K20*, além do enriquecimento de processos biológicos e vias relacionados com o desenvolvimento dos tecidos muscular e adiposo.

Estes achados permitem concluir que, a suplementação na fase de aleitamento modifica a atividade de módulos gênicos relacionados à determinados processos fisiológicos, sendo capaz de refletir em aspectos relacionados ao desempenho (peso à desmama) e à qualidade da carcaça (cobertura de gordura subcutânea) e da carne (marmoreio) produzidas. Os genes *hubs* identificados, bem como as vias metabólicas e processos biológicos enriquecidos a partir dos módulos de maior correlação com os tratamentos, permitiram elucidar, ao menos em parte, os mecanismos biológicos envolvidos nestes processos fisiológicos.

6 REFERÊNCIAS

- Akalestou E, Genser L, Rutter G A (2020) Glucocorticoid metabolism in obesity and following weight loss. **Frontiers in endocrinology** 11: 59.
- Aley PK, Mikolajczyk AM, Munz B, Churchill GC, Galione A, Berger F (2010) Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate regulates skeletal muscle differentiation via action at two-pore channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 107:19927-19932.
- Alfaia CP, Alves SP, Martins SI, Costa AS, Fontes CM, Lemos JP, Bessa RJB, Prates JA (2009) Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. **Food Chemistry** 114: 939-946.
- Andrews S (2022) FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 2 June 2022).
- Barros LV, Paulino MF, Marques DEC, Cabral CHA, da Silva FG, Caldeira DSA, de Moura FH (2015) Supplementation of suckling beef calves on a creep-feeding system and nutritional evaluation of lactating beef dams. **Semina: Ciências Agrárias** 36:3431-3443.
- Biferi MG, Nicoletti C, et al. (2015) Proliferation of multiple cell types in the skeletal muscle tissue elicited by acute p21 suppression. **Molecular Therapy** 23: 885-895.
- Bonnet M, Cassar-Malek I, Chilliard Y, Picard B (2010) Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. **Animal** 4: 1093-1109.
- Burri L, Thoresen GH, Berge RK (2010) The role of PPAR α activation in liver and muscle. **PPAR research**, 2010: 542359.
- Calnan DR, Brunet A (2008) The foxo code. **Oncogene** 27: 2276-2288.
- Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakí C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J (2010) Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell Metabolism** 11: 213-219
- Carvalho VV, Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SC, Lopes SA, Rennó LN, Sampaio CB, Silva AG (2019) A meta-analysis of the effects of creep-feeding supplementation on performance and nutritional characteristics by beef calves grazing on tropical pastures. **Livestock Science** 227: 175-182.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science** 294: 1866-1870.
- Chen J, Lu Y, Tian M, Huang Q (2019) Molecular mechanisms of foxo1 in adipocyte differentiation. **Journal of Molecular Endocrinology** 62: 239–253.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics** 34: i884–i890.

Cheng W, Cheng JH, Sun DW, Pu H (2015) Marbling analysis for evaluating meat quality: methods and techniques. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 14: 523–535.

Daley CA, Abbott A, Doyle P S, Nader G A, Larson S (2010) A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. **Nutrition Journal** 9: 1–12.

Dantas CCO, Negrão FM, Geron LJV, Mexia AA (2010) O uso da técnica do Creep-feeding na suplementação de bezerros. **Pubvet** 4:899.

Detmann E, Valente ÉE, Batista ED, Huhtanen P (2014) An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science** 162: 141-153.

Dinh TTN, Blanton JR, Brooks JC, Miller MF, and Thompson LD (2008) A simplified method for cholesterol determination in meat and meat products. **Journal of Food Composition and Analysis** 21: 306–314.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics** 29: 15–21.

Du M, Ford SP, Zhu MJ (2017) Optimizing livestock production efficiency through maternal nutritional management and fetal developmental programming. **Animal Frontiers** 7: 5–11.

Du M, Huang Y, Das AK, Yang Q, Duarte MS, Dodson MV, Zhu MJ (2013) Meat Science and Muscle Biology Symposium: manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. **Journal of Animal Science** 91: 1419-1427.

Du M, Wang B, Fu X, Yang Q, Zhu MJ (2015) Fetal programming in meat production. **Meat Science** 109:40-47.

ElMasry G, Barbin DF, Sun DW, Allen P (2012) Meat quality evaluation by hyperspectral imaging technique: an overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 52: 689–711.

Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M (2016) MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics** 32: 3047–3048.

Fan S, Liu H, Li L (2022) The REEP family of proteins: Molecular targets and role in pathophysiology. **Pharmacological Research** 185: 106477.

Farag MA, Gad MZ (2022) Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management. **Journal of Food Composition and Analysis** 20.

Fulco M, Cen Y et al. (2008) Glucose Restriction Inhibits Skeletal Myoblast Differentiation by Activating SIRT1 through AMPK-Mediated Regulation of Nampt. **Developmental Cell** 14: 661–673.

Furuyama T, Kitayama K, Yamashita H, Mori N (2003) Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. **Biochemical Journal** 375: 365-371.

- García-Rúa V, Feijóo-Bandín et al. (2016) Metabolic alterations derived from absence of Two-Pore Channel 1 at cardiac level. **Journal of Biosciences** 41:643-658.
- Griger J, Schneider R, Lahmann I, Schöwel V, Keller C, Spuler S, Nazare M, Birchmeier C (2017) Loss of Ptpn11 (Shp2) drives satellite cells into quiescence. **Elife** 6: e21552.
- Gross DN, Wan M, Birnbaum MJ (2009) The role of FOXO in the regulation of metabolism. **Current diabetes reports** 9: 208-214.
- Guerrero A, Velandia VM, Campo MM, Sañudo C (2013) Alguns fatores que afetam a qualidade da carne: Da fazenda ao garfo. revisão. **Acta Scientiarum - Animal Sciences** 35: 335–347.
- Guo B, Greenwood PL, Cafe LM, Zhou G, Zhang W, Dalrymple BP (2015) Transcriptome analysis of cattle muscle identifies potential markers for skeletal muscle growth rate and major cell types. **BMC Genomics** 16:1-15.
- Hudson NJ, Dalrymple BP, Reverter A (2012) Beyond differential expression: the quest for causal mutations and effector molecules. **BMC Genomics** 13:356.
- Kan C, Yang F, Wang S (2018) SHP2-mediated signal networks in stem cell homeostasis and dysfunction. **Stem Cells International** 1: 8351374.
- Kanchanawong P, Calderwood DA (2023) Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell–ECM adhesions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 24: 142–161.
- Kovacikova M, Vitkova M, Klimcakova E, Polak J, Hejnova J, Bajzova M, Kovacova Z, Viguerie N, Langin D, Ponto V (2008) Visfatin expression in subcutaneous adipose tissue of pre-menopausal women: relation to hormones and weight reduction. **European Journal of Clinical Investigation** 38: 516-522.
- Ladeira MM, de Oliveira DM, Schoonmaker JP, Chizzotti ML, Barreto HG, Paiva LV, Coelho TC, Neto ORM, Gionbelli MP, Chalfun-Junior A (2020) Expression of lipogenic genes in the muscle of beef cattle fed oilseeds and vitamin E. **Agri Gene** 15: 100097.
- Ladeira MM, Schoonmaker JP, Swanson KC, Duckett SK, Gionbelli MP, Rodrigues LM, Teixeira PD (2018) Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. **Animal** 12: 282-294.
- Lanna DPD, Barioni LG, Nepomuceno NH, Almeida R, Tedeschi LO (2011) Ração de Lucro Máximo - RLM 3.2 (ESALQ-USP e Integra Software: Piracicaba, São Paulo).
- Lee JE, Schmidt H, Lai B, Ge K (2019) Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis. **Molecular and Cellular Biology** 39: 1–20.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics** 30: 923–930.
- Litwińczuk Z, Domaradzki P, Grodzicki T, Litwińczuk A, Florek M (2015) The relationship of fatty acid composition and cholesterol content with intramuscular fat content and marbling in the meat of Polish Holstein-Friesian cattle from semi-intensive farming. **Animal Science Papers e Reports** 33: 119-128.
- Liu Y, Zhao Y et al. (2021) mRNA m5C controls adipogenesis by promoting CDKN1A mRNA export and translation. **RNA Biology** 18: 711–721.

Lopes SA, Paulino MF, Detmann E, Valente EEL, de Barros LV, Rennó LN, Martins LS (2016) Does supplementation of beef calves by creep feeding systems influence milk production and body condition of the dams? **Tropical Animal Health and Production** 48:1241-1246.

Lopes SA, Silva LFC, Valadares Filho SC, Ferreira MFL, Saraiva DT, Matos EMA, Paulino PVR, Paulino MF, Siqueira GR (2023) Exigências nutricionais de vacas de corte lactantes e seus bezerros In. Valadares Filho SC et al. **Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados** (ed.4), p. 480.

Luu W, Hart-Smith G, Sharpe LJ, Brown, AJ (2015) The terminal enzymes of cholesterol synthesis, DHCR24 and DHCR7, interact physically and functionally. **Journal of Lipid Research** 56: 888–897.

Machado PAS, Valadares Filho SC, Valadares RFD, Paulino MF, Paulino PVR, Marcondes MI (2012) Desempenho e exigências de energia e proteína de bovinos de corte em pasto suplementados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 64: 683-692.

Mishra P, Törönen P, Leino Y, Holm L (2014) Gene set analysis: limitations in popular existing methods and proposed improvements. **Bioinformatics** 30: 2747-2756.

Moriel P, Johnson SE, Vendramini JMB, McCann MA, Gerrard DE, Mercadante VRG, Hersom MJ, Arthington JD (2014) Effects of calf weaning age and subsequent management systems on growth performance and carcass characteristics of beef steers. **Journal of Animal Science** 92: 3598–3609.

Moriel P, Vendramini JM, Arthington JD, Aguiar AD, Caputti G (2017) Effects of crude protein level and degradability of limited creep-feeding supplements on performance of beef cow-calf pairs grazing limpograss pastures. **Livestock Science** 200:1-5.

Nishimura T (2010) The role of intramuscular connective tissue in meat texture. **Animal science journal** 81: 21-27.

Park SJ, Kang HJ, Na S, Lee SH, Baik M (2018) Differential expression of extracellular matrix and integrin genes in the longissimus thoracis between bulls and steers and their association with intramuscular fat contents. **Meat Science** 136: 35-43.

Pawlak M, Baugé E, Lalloyer F, Lefebvre P, Staels B (2015) Ketone body therapy protects from lipotoxicity and acute liver failure upon Ppara deficiency. **Molecular Endocrinology** 29: 1134-1143.

Picard B, Gagaoua M (2020) Muscle fiber properties in cattle and their relationships with meat qualities: An overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 68:6021-6039.

Porter GA, Makuck RF, Rivkees SA (2002) Reduction in intracellular calcium levels inhibits myoblast differentiation. **Journal of Biological Chemistry** 277:28942–28947.

Ramírez-Zamudio GD, Ganga MJG, Pereira GL, Nociti RP, Chiaratti MR, Cooke RF, Chardulo LAL, Baldassini WA, Machado-Neto OR, Curi RA (2023) Effect of cow-calf supplementation on gene expression, processes, and pathways related to adipogenesis and lipogenesis in Longissimus thoracis muscle of F1 Angus× Nellore cattle at weaning. **Metabolites** 13: 160.

Renvoisé B, Malone B, Falgairolle M, Munasinghe J, Stadler J, Sibilla C, Park SH, Blackstone, C (2016) Reep1 null mice reveal a converging role for hereditary spastic paraplegia proteins in lipid droplet regulation. **Human molecular genetics**, 25.

Rico J E, Barrientos-Blanco MA (2024) INVITED REVIEW: Ketone biology: the shifting paradigm of ketones and ketosis in the dairy cow. **Journal of Dairy Science** 107:3367–3388.

Russo PS, Ferreira GR (2018) CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. **BMC Bioinformatics** 19: 1–13.

Scheffler JM, McCann MA, Greiner SP, Jiang H, Hanigan MD, Bridges GA, Lake SL, Gerrard DE (2014) Early metabolic imprinting events increase marbling scores in fed cattle. **Journal of Animal Science** 92: 320–324.

Seong HA, Ha H (2019) Thr55 phosphorylation of p21 by MPK38/MELK ameliorates defects in glucose, lipid, and energy metabolism in diet-induced obese mice. **Cell Death and Disease** 10: 1-15.

Song J, Ke SF, Zhou CC, Zhang SL, Guan YF, Xu TY, Sheng CQ, Wang P, Miao CY (2014) Nicotinamide Phosphoribosyltransferase is required for the calorie restriction–mediated improvements in oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and metabolic adaptation. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences** 69: 44-57.

Stewart L (2017) Creep Feeding Beef Calves. UGA Cooperative Extension Bulletin 1315.

Ueda S, Hosoda M, Yoshino K, Yamanou M, Shirai Y (2021) Gene expression analysis provides new insights into the mechanism of intramuscular fat formation in japanese black cattle. **Genes** 12.

Valente EEL, Paulino MF, Detmann E, Valadares Filho SDC, Barros LV, Cabral CHA, Duarte MDS (2012) Strategies of supplementation of female suckling calves and nutrition parameters of beef cows on tropical pasture. **Tropical Animal Health and Production** 44:1803-1811.

Van Dam S, Vosa U, van der Graaf A, Franke L, de Magalhaes, JP (2018) Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. **Briefings in bioinformatics** 19: 575-592.

Viñoles C, Jaurena M, De Barbieri I, Do Carmo M, Montossi F (2013) Effect of creep feeding and stocking rate on the productivity of beef cattle grazing grasslands. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 56:279-287.

Wang J, Li B, Yang X, Liang C, Raza SHA, Pan Y, Zhang K, Zan L (2022) Integration of RNA-seq and ATAC-seq identifies muscle-regulated hub genes in cattle. **Frontiers in Veterinary Science** 9: 925590.

Weikum ER, Liu X, Ortlund EA (2018) The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. **Protein Science** 27: 1876 -1892.

Wicks J, Beline M, Gomez JFM, Luzardo S, Silva SL, Gerrard D (2019) Muscle energy metabolism, growth, and meat quality in beef cattle. **Agriculture** 9: 195.

Wu T, Hu E et al. (2021) clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **The innovation**, 2.

Xu C, He J, Jiang H, Zu L, Zhai W, Pu S, Xu G (2009) Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. **Molecular endocrinology** 23: 1161-1170.

Xu M, Chen X, Chen D, Yu B, Huang Z (2016) FoxO1: a novel insight into its molecular mechanisms in the regulation of skeletal muscle differentiation and fiber type specification. **Oncotarget** 8: 10662.

Yan J, Yang Y, et al. (2022) circRNAome profiling reveals circFgfr2 regulates myogenesis and muscle regeneration via a feedback loop. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle** 13: 696-712.

Zélicourt A, Fayssol A, et al. (2024) Two-pore channels (TPCs) act as a hub for excitation-contraction coupling, metabolism, and cardiac hypertrophy signalling. **Cell Calcium** 117:102839.

Zhang H, Liu Y, Li C, Zhang W (2022) ITGβ6 Facilitates Skeletal Muscle Development by Maintaining the Properties and Cytoskeleton Stability of Satellite Cells. **Life** 12.

APÊNDICES

Apêndice A. Quadro de identificação e quantificação dos genes de cada um dos módulos gerados pelo CEMITool.

Module	Genes	Número de genes
M1	<i>TXNIP, NRAP, ANKRD1, PPP1R27, GLUL, ZFAND5, PDK4, DDIT4, MUSTN1, PFKFB4, RILPL1, UNG, CYB5R1, SLC25A34, UBC, XDH, XIRP1, PSME4, PNRC1, JUN, SORBS1, KLHL40, STAT5B, TRIM63, UCP3, RBM38, MYH14, PNPLA2, FKBP5, ART3, KLF10, PER1, BNIP3, SCARF1, RAPSN, EIF4EBP1, MGLL, NAMPT, REV3L, RIOK3, FTL, NEDD4L, PFKFB3, RNF144B, SLC7A8, ZFP36, SESN1, MTHFR, LPIN1, NFKBIA, ARRDC2, GABARAPL1, FBXO32, TTC9, MAX, CCN1, RPS6KA3, ARID5B, STRIP2, TCIM, BCL2L1, CEBPB, HSF4, CTSF, ADIPOR2, ZBTB16, ACOX3, KLF9, CPT1B, KLF4, CHD7, GSTM3, ALAD, FNTB, TMEM120B, MASP1, CEBPD, DDO, THOP1, ASS1, HACL1, TINAGL1, SLC43A2, IL32, TMEM140, PRSS23, CISH, PPP1R15A, PPDPFL, SPOCK2, GADD45A, USP54, TNFRSF12A, ABCA1, RGCC, S100A13, KLF11, BTNL9, LOC521224, HOXA9, WDR91, PDE4B, EIF4E3, IL6R, LOC112444653, OSBPL11, ANKRD28, SIK1, MGC138914, SLC7A4, SLC26A10, FOXS1, UCP2, ADAM9, ISOC2, KLHL30, CDKN1A, PPARGC1A, THBS1, ASCC1, GADD45G, ENOX2, UROS, HABP2, MLYCD, LOC100300896, GCNT1, DHRS12, MAP1A, PDXK, PLIN5, TRIM45, NAPRT, EPDR1, SNHG12, FOXO1, KLF15, POLR2I, CRLF3, BANP, SIK2, PPARG, ANGPTL4, APOE, SDC4, GPX3, VNN1, HMOX1, CSRN1P, LOC618409, APOLD1, LOC104968411, LOC618664, ZNF703, ATOH8, NPC1, SPR, METRNL, TST, FOSL2, SH3RF2, LIMK1, SEMA3B, DNAJC1, C24H18orf21, PALS2, VOPP1, METTL21C, PTPRK, MT2A, CREB5, HTATIP2, TPRN, MOSPD1, LOC785216, GREB1L, MOB3B, CPT1A, AATF, RET, SCN3B, RIN1, WBP1L, PM20D2, ARMC12, IMPA2, CDC14A, TBX3, LOC507756, MYC, SOCS2, LOC515676, MAOA, AMPD3, SLC22A16, CNTFR, LIPE, PTPN3, MNT, GLCE, LGALS4, NMT2, CIART, RSPO3, EFHB, SMOC1, CLCF1, ALPL, ME3, ANGEL1, PLSCR4, DEPP1, CREM, FAH, KCNMB4, CBR3</i>	216
M2	<i>ACTA1, MYL1, MYH2, CA3, LDHA, NMRK2, PGK1, AGL, MYL6B, MYL3, MYH7B, MSS51, CAMK2A, NREP, COL15A1, SEMA6C, SCN4B, PPP1R3C, LMCD1, SLC2A4, GADL1, AQP1, CST6, IGFBP5, CCDC69, SCD, LPL, BHLHE40, SLC16A3, ETNPPL, FABP3, SLC9A5, CASQ2, CD93, KCNC4, DNAJA4, CHRNE, REEP1, CA2, SLC12A2, ABRA, SLC6A1, ASB15, FASN, PPM1K, IGDCC4, FRZB, DHRS7B, CARNS1, CCDC80, KCTD15, GPT, ATP2B2, P2RY1, GRIP2, FADS2, VASH1, LOC100848815, IQCA1L, NPNT, CDC42EP3, P2RY2, DUSP10, ADAMTS20, ACTC1, ESR1, LRRN1, ITGB6, C1QTNF3, DHDH, GATM, SETBP1, LUM, KY, CCDC162P, CYB5R2, PLPPR2, LOC508916, DENND2A, SPX, ACTBL2, SAMD11, CACNA2D2, PMEPA1, CACNG4, LOC788915, EXTL1, AQP4, FMOD, PIGZ, TMEM51, MAFB, FADS1, ACKR3, TANC2, COL11A2, CARNMT1, INHBB, TPCN1, COL14A1, POPDC2, ATP1A4, KCP, DLK1, ADAMTS8, PCDH12, RFLNB, FSD1L, MIR1-2, NTMT2, LSS, TNFAIP8L1, SIX2, KIT, GPIHBP1, SLC2A12, COL27A1, CDC42EP2, INKA1, ZNF608, LAMA3, HDAC9, REEP2, SLC4A4, CHODL,</i>	145

	ANGPT2, OLFML2B, ST8SIA2, FBXL22, ZNF385A, PLXDC1, HRH2, SNAI3, NPR3, NRK, TAGLN3, INSIG1, MYLK4, CCDC159, AGBL1, SRD5A1, CYP51A1, DHCR24, PALD1	
M3	XIRP2, ZNF106, CSRP3, HSPB7, TFRC, PLN, MAP3K20, C6H4orf54, ANKRD2, USP13, PRKAR2A, PADI2, AKAP6, PRKAB2, RETREG1, GAB2, ANO6, CLIC5, HK2, LDAF1, HLF, PTPN11, HBEGF, NT5C1A, HOOK3, NRIP1, DLL4, PRKAA2, SLC9A2, SOX6, LNPEP, PPARA, MITF, CCN2, PGM2L1, GYG2, TMEM245, SORT1, FZD7, FOXO3, CLCN4, LOC613316, TMTC1, WSCD1, DPYSL3, NUA1, MLEC, EGR1, PPARGC1B, SAMD8, GFOD1, NR3C2, UHMK1, EHHADH, KIAA1671, GNAQ, LDHD, THUMPD1, SMAD3, BTG2, CHM, NRP2, NT5DC3, TP53INP2, ALCAM, BMT2, LOC781298, ZNF629, MCCC2, TMTC3, LOC101905254, KIAA1522, GDF11, PARD3B, MFSD4A, FREM2	76
M4	MYBPH, SLC25A25, BOLA-DQA2, MYH4, NR1D1, MICAL2, COTL1, PTPRC, MRM2, SIRPA, UBD, LCP1, ATP2C2, SRGN, SDS, FAM229B, LOC508666, CD44, C7, SLC2A3, LOC526769, ITGAL, DBP, MYH3, ITGB2, S100A4, MAP3K8, MYO1F, LOC100297676, RSPO2, C1QB, CTXN3, CD53, CD55, UNC93B1, PLEK, HCLS1, GSDMD, MPEG1, MINDY3, DOK4, ICAM1, LOC768255, VCAM1, C1QA, ZAP70, BREH1, CYBA, CX3CL1, MS4A1, CFD, CCL1, LIPA, CXCL16, RILPL2, AEBP1, IL2RG, CX3CR1, NAV2, TMEM106A, SELL, RAC2, SH3BGRL, ARHGAP45, ARHGAP30, CD3E, GIMAP6, ACE, C1QC, CSF1R	70
M5	LOC509283, MX1, ZNFX1, SLC16A6, IFI6, RSAD2, IDO1, UBA7, OAS1X, ISG15, MX2, HERC6, LOC101903126, CBFA2T3, IFI47, DDX58, SAMD9, LOC100139670, LOC512486, LOC507055, ZBP1, LOC112444847, IFIH1, PML, HSPH1, CRACD, C4A, IFI44L, IFITM1, PARP10, LOC513659, LOC511531, IRF7, IFIT3, GBP5, LOC107131209, USP18, RTP4, LOC100196901, LOC100337442, IFI44, CYP1A1, LOC618737, LOC781710, HERC5, SLFN11, OAS1Z, FAM184A, BOLA-DQA5, DHX58, LOC100298356, BATF2, LOC507271, LOC100337136, LONRF3, PRR32, IFIT2, BOLA-DQB, MOCOS, RNASE13, CNN1, PTPRE, LOC788334, LOC112441507, DRAM1, LOC504773, SLC22A4	67
M6	COX3, ATP6, ND1, ND4, ND3, ND2, ATP8, RPS29, DUSP1, BTG1, NT5C3A, ATF3, LOC100848263, MRLN, PLAC8B, MIR133A-2, KRTCAP2, ETRFR1, ULBP11, TMEM258, RPL22L1, PON3, OGN, CCNC, TMEM167A, RNASEK, LOC784762, CBLN4, CCDC197, LOC514011, CEBPZOS, COA5, SLC36A4, MSMO1, LOC784160, CYP4V2, LSM5, MIR3064, LONRF1, LOC101902760, COQ10B, SMIM13, ZNF750, ACTR6	44

Apêndice B. Tabela com os valores de NES e valor de p ajustado gerados pela GSEA de cada módulo em cada um dos grupos.

Módulos	G1		G2	
	NES	Valor de p ajustado	NES	Valor de p ajustado
M1	4.05	3.742e-50	-4.00	3.943e-51
M2	-6.16	6.219e-81	6.06	4.572e-80
M3	-3.55	1.189e-15	3.45	1.990e-15
M4	2.30	4.289e-07	-2.32	2.401e-07
M5	1.35	0.082	-1.36	0.081
M6	1.90	0.001	-1.91	0.001

G1= grupo 1 (sem creep-feeding), G2= grupo 2 (com creep-feeding), NES= *Normalized Enrichment Score* (Escore de enriquecimento normalizado), GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis* (Análise de enriquecimento de conjunto de genes), Valor de p ajustado para FDR (taxa de falsa descoberta)

Apêndice C. Quadro com todos os termos do módulo 1 (GO Biological Process, vias KEGG, vias REACTOME e vias WikiPathways) com p ajustado > 0.05.

Termos	P ajustado	Genes
GO Biological Processes		
GO:0033993~Response to lipid	<0.001	TXNIP, ANKRD1, PDK4, DDIT4, STAT5B, TRIM63, UCP3, PER1, ZFP36, NFKBIA, FBXO32, RPS6KA3, CEBPB, KLF9, KLF4, ALAD, ASS1, ABCA1, HOXA9, PDE4B, UCP2, ADAM9, CDKN1A, THBS1, FOXO1, PPARG, GPX3, ZNF703, NPC1, FOSL2, METTL21C, CPT1A, RET, SOCS2, ALPL, PLSCR4
GO:0031960~Response to corticosteroid	<0.001	DDIT4, TRIM63, UCP3, ZFP36, FBXO32, KLF9, ALAD, ASS1, UCP2, ADAM9, CDKN1A, FOSL2, METTL21C, ALPL

GO:0048545~Response to steroid hormone	<0.001	<i>TXNIP, DDIT4, TRIM63, UCP3, PER1, ZFP36, FBXO32, KLF9, ALAD, ASS1, UCP2, ADAM9, CDKN1A, THBS1, PPARD, NPC1, FOSL2, METTL21C, ALPL</i>
GO:0009725~Response to hormone	<0.001	<i>TXNIP, PDK4, DDIT4, SORBS1, STAT5B, TRIM63, UCP3, PER1, NAMPT, ZFP36, LPIN1, FBXO32, ADIPOR2, KLF9, GSTM3, ALAD, ASS1, UCP2, ADAM9, CDKN1A, THBS1, GCNT1, FOXO1, KLF15, SIK2, PPARD, NPC1, FOSL2, METTL21C, SOCS2, ALPL</i>
GO:0014070~Response to organic cyclic compound	<0.001	<i>TXNIP, DDIT4, STAT5B, TRIM63, UCP3, PER1, RIOK3, ZFP36, MTHFR, NFKBIA, FBXO32, BCL2L1, KLF9, KLF4, ALAD, ASS1, ABCA1, HOXA9, UCP2, ADAM9, CDKN1A, THBS1, PPARD, ZNF703, NPC1, FOSL2, METTL21C, CPT1A, SOCS2, ALPL</i>
GO:0019915~Lipid storage	<0.001	<i>STAT5B, PNPLA2, NFKBIA, ABCA1, OSBPL11, PLIN5, PPARD, APOE, NPC1, CPT1A</i>
GO:0034440~Lipid oxidation	0.001	<i>PDK4, ADIPOR2, ACOX3, CPT1B, HACL1, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>
GO:0031667~Response to nutrient levels	0.001	<i>GLUL, PDK4, UCP3, KLF10, BNIP3, ZFP36, SESN1, MTHFR, GABARAPL1, ALAD, ASS1, ABCA1, UCP2, CDKN1A, PPARGC1A, MLYCD, FOXO1, PPARD, APOE, CPT1A, ALPL</i>
GO:1901654~Response to ketone	0.001	<i>TXNIP, DDIT4, UCP3, FBXO32, BCL2L1, KLF9, KLF4, ASS1, HOXA9, UCP2, CDKN1A, THBS1, METTL21C</i>
GO:0045444~Fat cell differentiation	0.002	<i>BNIP3, ZFP36, ARID5B, CEBPB, ZBTB16, KLF4, TMEM120B, CEBPD, OSBPL11, PPARGC1A, FOXO1, PPARD, METRN1, FOSL2</i>
GO:0044282~Small molecule catabolic process	0.002	<i>GLUL, XDH, SCARF1, LPIN1, ACOX3, CPT1B, DDO, HACL1, MLYCD, PLIN5, PPARD, APOE, TST, CPT1A, PM20D2, FAH, CBR3</i>
GO:0010883~Regulation of lipid storage	0.003	<i>PNPLA2, NFKBIA, ABCA1, OSBPL11, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>
GO:0046320~Regulation of fatty acid oxidation	0.005	<i>PDK4, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, CPT1A</i>
GO:0072593~Reactive oxygen species metabolic process	0.005	<i>PDK4, DDIT4, XDH, BNIP3, SESN1, CCN1, GADD45A, UCP2, CDKN1A, THBS1, PLIN5, FOXO1, GPX3</i>

GO:0045834~Positive regulation of lipid metabolic process	0.005	<i>SORBS1, PNPLA2, CCN1, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, APOE, CPT1A</i>
GO:0016054~Organic acid catabolic process	0.005	<i>GLUL, LPIN1, ACOX3, CPT1B, DDO, HAACL1, MLYCD, PLIN5, PPARD, TST, CPT1A, PM20D2, FAH</i>
GO:0070542~Response to fatty acid	0.005	<i>PDK4, ALAD, ASS1, UCP2, FOXO1, CPT1A</i>
GO:0009410~Response to xenobiotic stimulus	0.005	<i>TXNIP, ANKRD1, MTHFR, GSTM3, ALAD, ASS1, ABCA1, PDE4B, CDKN1A, THBS1, NPC1, FOSL2, CPT1A, RET, MYC, CBR3</i>
GO:0043068~Positive regulation of programmed cell death	0.006	<i>TXNIP, ANKRD1, JUN, BNIP3, RAPSN, CCN1, ZBTB16, GADD45A, TNFRSF12A, RGCC, KLF11, SIK1, CDKN1A, THBS1, GADD45G, FOXO1, VNN1, HMOX1, HTATIP2, RET, MYC</i>
GO:0071396~Cellular response to lipid	0.007	<i>ANKRD1, PDK4, DDIT4, PER1, ZFP36, NFKBIA, FBXO32, KLF9, KLF4, ASS1, ABCA1, PDE4B, ADAM9, PPARD, ZNF703, NPC1, METTL21C, CPT1A, RET, PLSCR4</i>
GO:0072329~Monocarboxylic acid catabolic process	0.007	<i>LPIN1, ACOX3, CPT1B, HAACL1, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A, FAH</i>
GO:0045923~Positive regulation of fatty acid metabolic process	0.008	<i>PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>
GO:0019433~Triglyceride catabolic process	0.008	<i>PNPLA2, MGLL, PLIN5, LIPE</i>
GO:0006641~Triglyceride metabolic process	0.008	<i>PNPLA2, MGLL, LPIN1, SIK1, PLIN5, APOE, CPT1A, LIPE</i>
GO:0030855~Epithelial cell differentiation	0.008	<i>TXNIP, RILPL1, XDH, STAT5B, ZFP36, CEBPB, HSF4, KLF4, GSTM3, ADAM9, CDKN1A, KLF15, APOLD1, ZNF703, ATOH8, TST, FOSL2, TPRN, CPT1A, TBX3</i>
GO:0071385~Cellular response to glucocorticoid stimulus	0.008	<i>DDIT4, ZFP36, FBXO32, KLF9, ASS1, METTL21C</i>
GO:0009062~Fatty acid catabolic process	0.008	<i>LPIN1, ACOX3, CPT1B, HAACL1, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>

GO:0010038~Response to metal ion	0.008	<i>TXNIP, JUN, BNIP3, ALAD, ASS1, UCP2, ADAM9, THBS1, UROS, HMOX1, NPC1, MT2A, IMPA2, KCNMB4</i>
GO:0031099~Regeneration	0.008	<i>MUSTN1, XIRP1, SCARF1, LPIN1, CEBPB, KLF4, UCP2, CDKN1A, PPARD, CPT1A, PTPN3</i>
GO:0071384~Cellular response to corticosteroid stimulus	0.009	<i>DDIT4, ZFP36, FBXO32, KLF9, ASS1, METTL21C</i>
GO:0010035~Response to inorganic substance	0.009	<i>TXNIP, JUN, UCP3, BNIP3, KLF4, ALAD, ASS1, UCP2, ADAM9, THBS1, UROS, FOXO1, HMOX1, NPC1, MT2A, IMPA2, ALPL, KCNMB4</i>
GO:0070482~Response to oxygen levels	0.009	<i>DDIT4, UCP3, BNIP3, MTHFR, ALAD, RGCC, UCP2, CDKN1A, THBS1, FOXO1, PPARD, ANGPTL4, FOSL2, CPT1A, MYC</i>
GO:0006979~Response to oxidative stress	0.009	<i>TXNIP, JUN, UCP3, BNIP3, SESN1, KLF4, ALAD, UCP2, ADAM9, PPARGC1A, NAPRT, FOXO1, APOE, GPX3, VNN1, HMOX1, PTPRK</i>
GO:0034616~Response to laminar fluid shear stress	0.009	<i>KLF4, ASS1, ABCA1, ADAM9</i>
GO:0016042~Lipid catabolic process	0.010	<i>PNPLA2, SCARF1, MGLL, LPIN1, ACOX3, CPT1B, HACL1, MLYCD, PLIN5, PPARD, APOE, CPT1A, LIPE</i>
GO:0010876~Lipid localization	0.010	<i>STAT5B, UCP3, PNPLA2, NFKBIA, CPT1B, ABCA1, OSBPL11, UCP2, THBS1, PLIN5, PPARD, APOE, APOLD1, NPC1, CPT1A, PLSCR4</i>
GO:0032870~Cellular response to hormone stimulus	0.011	<i>PDK4, DDIT4, SORBS1, STAT5B, UCP3, PER1, NAMPT, ZFP36, LPIN1, FBXO32, ADIPOR2, KLF9, ASS1, UCP2, FOXO1, SIK2, PPARD, NPC1, METTL21C, SOCS2</i>
GO:0030258~Lipid modification	0.014	<i>PDK4, ADIPOR2, ACOX3, CPT1B, HACL1, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>

GO:0044242~Cellular lipid catabolic process	0.014	<i>PNPLA2, MGLL, LPIN1, ACOX3, CPT1B, HACL1, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A, LIPE</i>
GO:0032787~Monocarboxylic acid metabolic process	0.014	<i>PDK4, DDIT4, TRIM63, UCP3, MGLL, LPIN1, ADIPOR2, ACOX3, CPT1B, HACL1, UCP2, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, VNN1, NPC1, CPT1A, ME3, FAH</i>
GO:0031100~Animal organ regeneration	0.014	<i>LPIN1, CEBPB, UCP2, CDKN1A, CPT1A, PTPN3</i>
GO:0002237~Response to molecule of bacterial origin	0.015	<i>ANKRD1, ZFP36, NFKBIA, RPS6KA3, CEBPB, ALAD, ASS1, ABCA1, PDE4B, ADAM9, FOSL2, ALPL, PLSCR4</i>
GO:0009617~Response to bacterium	0.015	<i>ANKRD1, FKBP5, BNIP3, ZFP36, NFKBIA, RPS6KA3, CEBPB, CHD7, ALAD, ASS1, ABCA1, PDE4B, IL6R, ADAM9, FOSL2, LGALS4, ALPL, PLSCR4</i>
GO:0000302~Response to reactive oxygen species	0.015	<i>TXNIP, JUN, UCP3, BNIP3, SESN1, KLF4, UCP2, ADAM9, APOE, HMOX1, PTPRK</i>
GO:0050680~Negative regulation of epithelial cell proliferation	0.015	<i>XDH, KLF9, RGCC, THBS1, PPARD, APOE, ATOH8, PTPRK</i>
GO:0001937~Negative regulation of endothelial cell proliferation	0.016	<i>XDH, RGCC, THBS1, APOE, ATOH8</i>
GO:1905953~Negative regulation of lipid localization	0.016	<i>PNPLA2, NFKBIA, ABCA1, THBS1, PPARD</i>
GO:0010888~Negative regulation of lipid storage	0.017	<i>PNPLA2, NFKBIA, ABCA1, PPARD</i>
GO:0006638~Neutral lipid metabolic process	0.017	<i>PNPLA2, MGLL, LPIN1, SIK1, PLIN5, APOE, CPT1A, LIPE</i>
GO:0071548~Response to dexamethasone	0.018	<i>DDIT4, FBXO32, ASS1, UCP2, METTL21C</i>
GO:0046461~Neutral lipid catabolic process	0.020	<i>PNPLA2, MGLL, PLIN5, LIPE</i>

GO:0043616~Keratinocyte proliferation	0.020	<i>ZFP36, KLF9, CDKN1A, PPARD, PTPRK</i>
GO:0009409~Response to cold	0.020	<i>UCP3, NFKBIA, UCP2, FOXO1, METRNL</i>
GO:0062013~Positive regulation of small molecule metabolic process	0.022	<i>SORBS1, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, FOXO1, PPARD, APOE, CPT1A</i>
GO:0043537~Negative regulation of blood vessel endothelial cell migration	0.023	<i>KLF4, GADD45A, RGCC, THBS1, APOE</i>
GO:0006635~Fatty acid beta oxidation	0.023	<i>ACOX3, CPT1B, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>
GO:0009266~Response to temperature stimulus	0.023	<i>UCP3, NFKBIA, TCIM, UCP2, CDKN1A, THBS1, FOXO1, HMOX1, METRNL</i>
GO:0097421~Liver regeneration	0.024	<i>CEBPB, UCP2, CPT1A, PTPN3</i>
GO:0120162~Positive regulation of cold induced thermogenesis	0.025	<i>LPIN1, CEBPB, ADIPOR2, UCP2, PPARGC1A, GADD45G, ALPL</i>
GO:0015909~Long chain fatty acid transport	0.025	<i>CPT1B, UCP2, THBS1, APOE, CPT1A</i>
GO:0061008~Hepaticobiliary system development	0.027	<i>ARID5B, CEBPB, ASS1, UCP2, NPC1, CPT1A, TBX3, PTPN3</i>
GO:0071549~Cellular response to dexamethasone stimulus	0.028	<i>DDIT4, FBXO32, ASS1, METTL21C</i>
GO:0046686~Response to cadmium ion	0.028	<i>JUN, ALAD, HMOX1, NPC1, MT2A</i>
GO:0048511~Rhythmic process	0.028	<i>STAT5B, KLF10, PER1, NAMPT, KLF9, ASS1, SIK1, PPARGC1A, ENOX2, CIART, CREM</i>
GO:1905952~Regulation of lipid localization	0.028	<i>PNPLA2, NFKBIA, ABCA1, OSBPL11, THBS1, PLIN5, PPARD, APOE</i>

GO:0050673~Epithelial cell proliferation	0.028	<i>XDH, ZFP36, BCL2L1, CEBPB, KLF9, RGCC, CDKN1A, THBS1, PPARD, APOE, HMOX1, ZNF703, ATOH8, PTPRK, MYC</i>
GO:0015908~Fatty acid transport	0.028	<i>CPT1B, UCP2, THBS1, PPARD, APOE, CPT1A</i>
GO:0019216~Regulation of lipid metabolic process	0.031	<i>PDK4, SORBS1, STAT5B, PNPLA2, CCN1, SIK1, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, APOE, CPT1A</i>
GO:0019217~Regulation of fatty acid metabolic process	0.031	<i>PDK4, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>
GO:0040014~Regulation of multicellular organism growth	0.033	<i>STAT5B, CHD7, FOXS1, FOSL2, SOCS2</i>
GO:0045638~Negative regulation of myeloid cell differentiation	0.033	<i>STAT5B, ZFP36, NFKBIA, ZBTB16, HOXA9, MYC</i>
GO:0051235~Maintenance of location	0.033	<i>STAT5B, PNPLA2, FTL, NFKBIA, CHD7, ABCA1, OSBPL11, PLIN5, PPARD, APOE, NPC1, METTL21C, CPT1A</i>
GO:0007584~Response to nutrient	0.034	<i>UCP3, MTHFR, ALAD, ASS1, ABCA1, MLYCD, CPT1A, ALPL</i>
GO:0048662~Negative regulation of smooth muscle cell proliferation	0.037	<i>KLF4, CDKN1A, PPARGC1A, APOE, HMOX1</i>
GO:0009913~Epidermal cell differentiation	0.038	<i>TXNIP, ZFP36, KLF4, ADAM9, CDKN1A, FOSL2, TPRN</i>
GO:0062012~Regulation of small molecule metabolic process	0.039	<i>PDK4, DDIT4, SORBS1, TRIM63, SIK1, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, FOXO1, PPARD, APOE, CPT1A</i>
GO:0046685~Response to arsenic containing substance	0.041	<i>ALAD, CDKN1A, UROS, HMOX1</i>

GO:0034405~Response to fluid shear stress	0.041	<i>KLF4, ASS1, ABCA1, ADAM9</i>
GO:0050996~Positive regulation of lipid catabolic process	0.042	<i>PNPLA2, PLIN5, CPT1A</i>
GO:0045600~Positive regulation of faT cell differentiation	0.044	<i>ZFP36, CEBPB, ZBTB16, PPARD, METRNL</i>
GO:0010906~Regulation of glucose metabolic process	0.044	<i>PDK4, SORBS1, SIK1, PPARGC1A, MLYCD, FOXO1</i>
GO:0045861~Negative regulation of proteolysis	0.044	<i>KLHL40, RPS6KA3, KLF4, ALAD, SPOCK2, THBS1, MAP1A, DNAJC1, PTPN3</i>
GO:0006631~Fatty acid metabolic process	0.045	<i>PDK4, UCP3, MGLL, LPIN1, ADIPOR2, ACOX3, CPT1B, HACL1, PPARGC1A, MLYCD, PLIN5, PPARD, CPT1A</i>
REACTOME pathways		
bta9614085: Foxo mediated transcription	0.005	<i>TXNIP, TRIM63, FBXO32, KLF4, GADD45A, CDKN1A, PPARGC1A, FOXO1</i>
Circadian clock	0.005	<i>UBC, PER1, NAMPT, SIK1, PPARGC1A, KLF15, CPT1A, CREM</i>
bta449147: Signaling by ILs	0.005	<i>UBC, PSME4, JUN, STAT5B, NFKBIA, RPS6KA3, BCL2L1, CEBPD, IL32, CISH, IL6R, CDKN1A, FOXO1, HMOX1, MYC, SOCS2, MAOA, CNTFR, CLCF1</i>
bta6785807: IL 4 and IL 13 signaling	0.009	<i>BCL2L1, CEBPD, IL6R, CDKN1A, FOXO1, HMOX1, MYC, MAOA</i>
bta1280215: Cytokine signaling in immune system	0.032	<i>UBC, PSME4, JUN, STAT5B, NFKBIA, RPS6KA3, BCL2L1, CEBPD, IL32, CISH, TNFRSF12A, EIF4E3, IL6R, CDKN1A, TRIM45, FOXO1, HMOX1, MT2A, MYC, SOCS2, MAOA, CNTFR, CLCF1</i>
bta9617828: Foxo mediated transcription of cell cycle genes	0.032	<i>KLF4, GADD45A, CDKN1A, FOXO1</i>
KEGG pathways		
bta03320: Ppar signaling pathway	0.024	<i>UBC, SORBS1, ACOX3, CPT1B, PPARD, ANGPTL4, CPT1A</i>
bta04630: Jak stat signaling pathway	0.036	<i>STAT5B, BCL2L1, CISH, IL6R, MYC, SOCS2, CNTFR, CLCF1</i>
Wikipathways		

WP987: Adipogenesis	<0.001	<i>STAT5B, NAMPT, LPIN1, CEBPB, CEBPD, GADD45A, CDKN1A, PPARGC1A, FOXO1, KLF15, PPARD, CNTFR, LIPE</i>
WP5342: Pathophysiological roles of dux4 in fshd1	<0.001	<i>TRIM63, FBXO32, CDKN1A, PPARGC1A, RET, MYC</i>
WP2882: Nuclear receptors metapathway	<0.001	<i>ANKRD1, PDK4, JUN, FKBP5, FTL, GSTM3, PDE4B, PPARGC1A, FOXO1, PPARD, ANGPTL4, GPX3, HMOX1, CPT1A, MYC, CBR3</i>
WP3599: Transcription factor regulation in adipogenesis	<0.001	<i>LPIN1, CEBPB, CEBPD, PPARGC1A, FOXO1</i>
WP4149: White fat cell differentiation	0.002	<i>STAT5B, CEBPB, KLF4, CEBPD, FOXO1, KLF15</i>
WP5474: Catabolism of skeletal muscle in cachexia	0.006	<i>TRIM63, NFKBIA, FBXO32, CEBPB, TNFRSF12A, IL6R</i>
WP3594: Circadian rhythm genes	0.007	<i>UBC, JUN, KLF10, PER1, NAMPT, KLF9, SIK1, PPARGC1A, CPT1A, CIART, CREM</i>
WP1403: Amp activated protein kinase signaling	0.008	<i>EIF4EBP1, PFKFB3, ADIPOR2, CPT1B, CDKN1A, CPT1A, LIPE</i>
WP706: Sudden infant death syndrome sids susceptibility pathways	0.008	<i>JUN, CEBPB, IL6R, PPARGC1A, CPT1A, RET, SCN3B, MAOA, CREM</i>
WP5102: Familial partial lipodystrophy	0.009	<i>STAT5B, PNPLA2, MGLL, KLF9, LIPE</i>
WP3942: PPAR signaling	0.023	<i>SORBS1, ACOX3, CPT1B, PPARD, ANGPTL4, CPT1A</i>
WP2037: Prolactin signaling	0.024	<i>JUN, STAT5B, EIF4EBP1, NFKBIA, CISH, MYC, SOCS2</i>
WP4321: Thermogenesis	0.024	<i>PNPLA2, MGLL, RPS6KA3, CPT1B, PPARGC1A, CREB5, CPT1A, LIPE</i>
WP2203: Thymic stromal lymphopoietin tslp signaling	0.024	<i>STAT5B, EIF4EBP1, NFKBIA, CISH, MYC</i>
WP5358: Jakstat signaling in the regulation of beta cells	0.028	<i>STAT5B, CISH, IL6R, SOCS2</i>
WP3646: Hepatitis c and hepatocellular carcinoma	0.029	<i>JUN, BCL2L1, IL6R, CDKN1A, MYC</i>
WP4659: Gastrin signaling	0.029	<i>JUN, EIF4EBP1, NFKBIA, BCL2L1, KLF4, CDKN1A, FOXO1, MYC</i>
WP2817: Mammary gland development pregnancy and lactation stage 3 of 4	0.029	<i>TTC9, BCL2L1, CEBPB, MYC</i>
WP1050: Oxidative stress response	0.033	<i>XDH, GPX3, HMOX1, MAOA</i>
WP4658: Small cell lung cancer	0.033	<i>NFKBIA, MAX, BCL2L1, GADD45A, CDKN1A, GADD45G, MYC</i>

WP3298: Melatonin metabolism and effects	0.043	<i>PER1, FOXO1, APOE, MAOA</i>
WP1742: Tp53 network	0.043	<i>GADD45A, CDKN1A, MYC</i>
WP3274: Leptin signaling	0.043	<i>STAT5B, EIF4EBP1, BCL2L1, CISH, FOXO1, SOCS2</i>
WP1541: Energy metabolism	0.043	<i>UCP3, UCP2, PPARGC1A, FOXO1, PPARD</i>
WP2516: Atm signaling	0.043	<i>JUN, NFKBIA, GADD45A, CDKN1A</i>
WP 143: Fatty acid betaoxidation	0.049	<i>PNPLA2, CPT1B, CPT1A, LIPE</i>

Apêndice D. Quadro com todos os termos do módulo 2 (GO Biological Process, vias KEGG, vias REACTOME e vias WikiPathways) com p ajustado > 0.05.

Termos	P ajustado	Genes
GO Biological Processes		
GO:0003012~Muscle system process	0.004	<i>ACTA1, MYL1, MYH2, MYL6B, MYL3, SCN4B, LMCD1, IGFBP5, CASQ2, CHRNE, P2RY1, GRIP2, NPNT, GATM, SPX, COL14A1, KIT</i>
GO:0003013~Circulatory system process	0.009	<i>MYL3, SCN4B, SLC2A4, CASQ2, SLC12A2, SLC6A1, ATP2B2, P2RY1, GRIP2, P2RY2, ACTC1, SPX, POPDC2, ATP1A4, SLC4A4, HRH2, NPR3</i>
GO:0045444~FaT cell differentiation	0.009	<i>SLC2A4, LPL, FABP3, FRZB, DHRS7B, DUSP10, C1QTNF3, MAFB, INHBB, ZNF385A, INSIG1</i>
GO:0014074~Response to purine containing compound	0.016	<i>AQP1, IGFBP5, CASQ2, SLC6A1, P2RY1, P2RY2, INHBB, SRD5A1</i>
GO:0033275~Actin myosin filament sliding	0.018	<i>MYL1, MYH2, MYL6B, ACTC1</i>
GO:0006936~Muscle contraction	0.029	<i>ACTA1, MYL1, MYH2, MYL6B, MYL3, SCN4B, CASQ2, CHRNE, GRIP2, NPNT, SPX, KIT</i>
GO:0035725~Sodium ion transmembrane transport	0.029	<i>SCN4B, SLC9A5, SLC12A2, SLC6A1, TPCN1, ATP1A4, SLC4A4</i>
GO:0045229~ExteRNAI encapsulating structure organization	0.045	<i>COL15A1, CCDC80, NPNT, ADAMTS20, LUM, FMOD, COL11A2, COL14A1, ADAMTS8, COL27A1, OLFML2B</i>
REACTOME pathways		
bta397014: Muscle contraction	<0.001	<i>ACTA1, MYL1, MYL6B, MYL3, CAMK2A, SCN4B, CASQ2, ATP2B2, ACTC1, CACNA2D2, CACNG4, ATP1A4</i>

bta382551: Transport of small molecules	0.007	<i>CAMK2A, SLC2A4, AQP1, LPL, SLC16A3, SLC9A5, CASQ2, CA2, SLC12A2, SLC6A1, ATP2B2, CYB5R2, AQP4, TPCN1, ATP1A4, GPIHBP1, SLC2A12, SLC4A4</i>
bta5576891: Cardiac conduction	0.014	<i>CAMK2A, SCN4B, CASQ2, ATP2B2, CACNA2D2, CACNG4, ATP1A4</i>
bta2022090: Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	0.014	<i>COL15A1, COL11A2, COL14A1, COL27A1, LAMA3</i>
bta 8957322: Metabolism of steroids	0.014	<i>SCD, FASN, LSS, INSIG1, SRD5A1, CYP51A1, DHCR24</i>
bta8948216: Collagen chain trimerization	0.014	<i>COL15A1, COL11A2, COL14A1, COL27A1</i>
bta5576892: Phase 0 rapid depolarisation	0.014	<i>CAMK2A, SCN4B, CACNA2D2, CACNG4</i>
bta1655829: Regulation of cholesterol biosynthesis by srebp srebf	0.016	<i>SCD, FASN, LSS, INSIG1, CYP51A1</i>
bta1474290: Collagen formation	0.030	<i>COL15A1, COL11A2, COL14A1, COL27A1, LAMA3</i>
bta390522: Striated muscle contraction	0.036	<i>ACTA1, MYL1, MYL3, ACTC1</i>
bta425407: Slc mediated transmembrane transport	0.037	<i>SLC2A4, SLC16A3, SLC9A5, SLC12A2, SLC6A1, SLC2A12, SLC4A4</i>
bta1655829: Activation of gene expression by srebf srebp	0.043	<i>SCD, FASN, LSS, CYP51A1</i>
bta1474244: Extracellular matrix organization	0.046	<i>COL15A1, ITGB6, LUM, FMOD, COL11A2, COL14A1, ADAMTS8, COL27A1, LAMA3</i>
KEGG pathways		
bta04964: Proximal tubule bicarbonate reclamation	0.007	<i>AQP1, CA2, ATP1A4, SLC4A4</i>
bta00100: Steroid biosynthesis	0.027	<i>LSS, CYP51A1, DHCR24</i>
bta01040: Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0.028	<i>SCD, FADS2, FADS1</i>
bta04260: Cardiac muscle contraction	0.028	<i>MYL3, ACTC1, CACNA2D2, CACNG4, ATP1A4</i>
bta05410: Hypertrophic cardiomyopathy hcm	0.045	<i>MYL3, ACTC1, ITGB6, CACNA2D2, CACNG4</i>
bta05414: Dilated cardiomyopathy	0.046	<i>MYL3, ACTC1, ITGB6, CACNA2D2, CACNG4</i>
Wikipathways		

WP4718: Cholesterol metabolism with bloch and kandutschrussell pathways	<0.001	<i>SCD, FASN, FADS2, FADS1, LSS, CYP51A1, DHCR24</i>
WP5314: Lactate shuttle in glial cells	0.001	<i>LDHA, SLC16A3, CA2, SLC4A4</i>
WP4724: Omega9 fatty acid synthesis	0.001	<i>SCD, FASN, FADS2, FADS1</i>
WP3114: Cori cycle	0.002	<i>LDHA, PGK1, SLC2A4, GPT</i>
WP5329: Cholesterol biosynthesis pathway in hepatocytes	0.002	<i>SCD, FADS2, CYB5R2, LSS, SRD5A1, CYP51A1, DHCR24</i>
WP3194: Sterol regulatory elementbinding proteins srebp signaling	0.010	<i>SCD, LPL, FASN, LSS, INSIG1, CYP51A1</i>
WP4628: Aerobic glycolysis augmented	0.029	<i>LDHA, PGK1, GPT</i>
WP2882: Nuclear receptors metapathway	0.031	<i>SLC2A4, SCD, BHLHE40, SLC6A1, FASN, CDC42EP3, ESR1, ACKR3, SLC2A12</i>
WP969: Striated muscle contraction pathway	0.033	<i>ACTA1, MYL1, MYL3, ACTC1</i>
WP5193: Cholesterol synthesis disorders	0.039	<i>LSS, CYP51A1, DHCR24</i>

Apêndice E. Quadro com todos os termos do módulo 3 (GO Biological Process, vias KEGG, vias REACTOME e vias WikiPathways) com p ajustado > 0.05.

Termos	P ajustado	Genes
GO Biological Processes		
GO:0060537~Muscle tissue development	0.003	<i>XIRP2, CSRP3, PLN, AKAP6, HLF, DLL4, SOX6, PPARA, FZD7, EGR1, SMAD3, BTG2</i>
GO:0007507~Heart development	0.003	<i>XIRP2, CSRP3, HSPB7, PLN, AKAP6, PTPN11, DLL4, SOX6, PPARA, FZD7, SMAD3, NRP2, FREM2</i>
GO:0014706~Striated muscle tissue development	0.003	<i>XIRP2, CSRP3, PLN, AKAP6, DLL4, SOX6, PPARA, FZD7, SMAD3</i>
GO:0061061~Muscle structure development	0.006	<i>XIRP2, CSRP3, ANKRD2, AKAP6, HLF, HBEGF, DLL4, SOX6, PPARA, SORT1, FZD7, EGR1, SMAD3, BTG2</i>
GO:0007517~Muscle organ development	0.006	<i>XIRP2, CSRP3, ANKRD2, HLF, HBEGF, DLL4, SOX6, EGR1, SMAD3, BTG2</i>
GO:0045596~Negative regulation of cell differentiation	0.021	<i>ANKRD2, PTPN11, HOOK3, SOX6, PPARA, SORT1, FZD7, FOXO3, SMAD3, BTG2, GDF11</i>

GO:0009725~Response to hormone	0.021	<i>ZNF106, CSRP3, PADI2, PTPN11, PRKAA2, PPARA, SORT1, FOXO3, EGR1, PPARGC1B, NR3C2, SMAD3, BTG2</i>
GO:0032330~Regulation of chondrocyte differentiation	0.030	<i>PTPN11, SOX6, CCN2, SMAD3</i>
GO:0048511~Rhythmic process	0.031	<i>HLF, NRIP1, PRKAA2, PPARA, FOXO3, EGR1, GNAQ</i>
Wikipathways		
WP1541: Energy metabolism	0.002	<i>PRKAB2, PRKAA2, PPARA, FOXO3, PPARGC1B</i>
WP4540: Hippo signaling regulation	0.015	<i>PRKAR2A, PRKAB2, PRKAA2, GNAQ, SMAD3</i>
WP5036: Angiotensin ii receptor type 1 pathway	0.015	<i>PTPN11, CCN2, SMAD3</i>
WP34: Ovarian infertility	0.015	<i>NRIP1, EGR1, SMAD3</i>
WP304: Kit receptor signaling	0.015	<i>GAB2, PTPN11, MITF, FOXO3</i>
WP2571: Polycystic kidney disease pathway	0.015	<i>PRKAB2, PRKAA2, FZD7, GNAQ</i>
WP2380: Brainderived neurotrophic factor bdnf signaling	0.018	<i>PTPN11, PRKAA2, SORT1, FOXO3, EGR1</i>
WP3965: Lipid metabolism pathway	0.018	<i>PRKAR2A, PRKAB2, PRKAA2</i>
WP5094: Orexin receptor pathway	0.032	<i>PTPN11, HBEGF, CCN2, EGR1, GNAQ</i>
WP3594: Circadian rhythm genes	0.032	<i>NRIP1, PRKAA2, PPARA, EGR1, GNAQ</i>
WP49: Il2 signaling	0.032	<i>GAB2, PTPN11, FOXO3</i>
WP5353: acrophagestimulating protein msp signaling	0.037	<i>HK2, PRKAA2, EGR1, SMAD3</i>
WP2895: Differentiation of white and brown adipocyte	0.044	<i>HSPB7, PPARGC1B</i>
WP5318: Female steroid hormones in cardiomyocyte energy metabolism	0.045	<i>PPARA, PPARGC1B</i>
WP5382: Tgfb smad signaling	0.045	<i>CCN2, SMAD3</i>
WP4239: Epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer	0.045	<i>DLL4, FZD7, SMAD3, NRP2</i>
WP4659: Gastrin signaling	0.045	<i>PTPN11, FOXO3, EGR1, GNAQ</i>
WP3888: Vegfavegfr2 signaling	0.045	<i>PTPN11, HBEGF, DLL4, PRKAA2, CCN2, FOXO3, EGR1, NRP2</i>