

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO NA FASE DE DESMAMA DE BOVINOS DA
RAÇA NELORE SUBMETIDOS A DIFERENTES
PROTOCOLOS DE DESMAMA**

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco

Médico Veterinário

2024

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

**PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO NA FASE DE DESMAMA DE BOVINOS DA
RAÇA NELORE SUBMETIDOS A DIFERENTES
PROTOCOLOS DE DESMAMA**

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Luis Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi

Coorientadora: Dra. Juliana Akamine Torrecilhas

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

2024

T591p

Tinoco, Gustavo Lucas Bezerra

Padrões de metilação do DNA no músculo esquelético na fase de desmama de bovinos da raça Nelore submetidos a diferentes protocolos de desmama / Gustavo Lucas Bezerra Tinoco. -- Jaboticabal, 2024

62 p. : il., tabs.

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

Orientador: Guilherme Luis Pereira

Coorientador: Rogério Abdallah Curi

1. Epigenética. 2. Genética animal. 3. Carne bovina. I. Título.

Registro de impacto

O estudo pode contribuir para uma compreensão mais profunda de como os padrões de expressão gênica são influenciados pelo ambiente e pelo manejo dos animais. Como se trata de um estudo inédito, uma pesquisa sobre epigenética de bovinos desmamados de forma precoce e convencional pode gerar conhecimentos e bases para estudos subsequentes, os quais buscam melhorar tanto a produção animal quanto o bem-estar dos animais, além de gerar implicações mais amplas para a sociedade em termos de sustentabilidade e compreensão dos processos biológicos. Pode ainda ter implicações na indústria pecuária, influenciando práticas de manejo e nutrição de bovinos. Isso pode afetar a eficiência produtiva, a qualidade dos produtos de origem animal (carne) e a rentabilidade dos produtores. Os resultados da pesquisa também podem ser aplicados no desenvolvimento de programas de melhoramento genético que levem em consideração não apenas os aspectos genéticos dos animais, mas também seu ambiente durante fases críticas do desenvolvimento, como o desmame precoce.

Impact record

The study could contribute to a deeper understanding of how gene expression patterns are influenced by the environment and animal management. As this is an unprecedented study, research into the epigenetics of cattle weaned early and conventionally can generate knowledge and bases for subsequent studies, which seek to improve both animal production and animal welfare, as well as generating broader implications for society in terms of sustainability and understanding of biological processes. It may also have implications for the livestock industry, influencing cattle management and nutrition practices. This can affect production efficiency, the quality of animal products (meat) and the profitability of producers. The results of the research can also be applied to the development of breeding programs that consider not only the genetic aspects of the animals, but also their environment during critical stages of development, such as early weaning.



Certificado de aprovação
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO NA FASE DE DESMAMA DE BOVINOS DA RAÇA NELORE SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESMAMA

AUTOR: GUSTAVO LUCAS BEZERRA TINOCO
ORIENTADOR: GUILHERME LUIS PEREIRA
COORIENTADORA: JULIANA AKAMINE TORRECILHAS
COORIENTADOR: ROGERIO ABDALLAH CURTI

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

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

Documento assinado digitalmente
MARCELO RICARDO VICARI
Data: 29/04/2024 13:48:02-0300
Verifique em <https://verificar.jci.gov.br>

Prof. Dr. MARCELO RICARDO VICARI (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética / Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) - Ponta Grossa/PR

Prof. Dr. LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ / UNESP - Botucatu/SP

Documento assinado digitalmente
LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO
Data: 03/06/2024 16:25:10-0300
Verifique em <https://verificar.jci.gov.br>

Jaboticabal, 29 de fevereiro de 2024

Documento assinado digitalmente
GUILHERME LUIS PEREIRA
Data: 03/06/2024 15:28:49-0300
Verifique em <https://verificar.jci.gov.br>

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco, nascido em 15 de fevereiro de 1999, na cidade de Miranda do Norte – Maranhão, Brasil. Filho de Giordano Silva Tinoco e Silene Maria Bezerra Tinoco. Bacharel em Medicina Veterinária (2016-2021) pela Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica UEMA sob orientação do Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros, estagiário do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Warwick Estevam Kerr e monitor voluntário da disciplina de Genética Molecular. Em janeiro de 2022, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Luis Pereira, sendo bolsista Capes e Fapesp. Realizou estágio de pesquisa no exterior (BEPE) sob orientação do Prof. Dr. Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato.

EPÍGRAFE

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna da Silva

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais e meu irmão Júnior, que sempre estiveram, mesmo de longe, torcendo, orando e apoiando a minha caminhada.

À minha companheira Natalie, que compartilhou comigo cada momento e nunca deixou de me apoiar. Foi, sem dúvidas, minha maior incentivadora e sempre esteve comigo, mesmo a quase 3000 quilômetros de distância.

Ao meu orientador, Prof. Guilherme L. Pereira, pelos ensinamentos, pela oportunidade e toda ajuda durante a realização do mestrado.

Aos meus coorientadores: Dra. Juliana A. Torrecilhas, por estar sempre disposta a ajudar, pelas caronas e pelos conselhos; Prof. Rogério A. Curi, por toda ajuda durante a escrita da dissertação.

Ao supervisor de estágio no exterior, Miguel P. Mourato, por todo acompanhamento e contribuição para que eu realizasse o estágio.

Aos amigos que mesmo distantes torceram por mim e ansiosamente aguardavam o meu retorno: Douglas, Lucas, Judah, Neto e Mikaelle.

Ao Davi, com quem compartilhei o dia a dia em Botucatu e sempre se mostrou disposto a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2022/09291-7) e de estágio em pesquisa no exterior (processo nº 2023/05244-7).

Finalmente, a todos que indiretamente ou diretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	iv
LISTA DE ABREVIÇÕES	v
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1 Bovinocultura de corte no Brasil e melhoramento genético da raça Nelore	2
3.2 Crescimento e desenvolvimento dos tecidos muscular e adiposo	3
3.3 Desmama precoce na bovinocultura de corte.....	5
3.4 Epigenética: a metilação do DNA e suas influências sobre a expressão gênica ..	7
3.5 Efeitos do ambiente/dieta sobre a metilação do DNA	10
3.6 Sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS) para análise de metilação do DNA.....	12
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 2 - PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE BOVINOS DA RAÇA NELORE SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESMAMA.....	21
ABSTRACT	22
1 INTRODUÇÃO	23
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Animais e coleta do tecido muscular	24
2.2. Extração do RNA e análise da expressão gênica diferencial	26
2.3 Extração do DNA genômico, sequenciamento RRBS, controle de qualidade e alinhamento ao genoma de referência	26
2.4 Identificação e caracterização de regiões e genes diferencialmente metilados..	27
2.5 Relação entre metilação e expressão gênica.....	28
3 RESULTADOS.....	28
3.1 Sequenciamento de Bissulfito de Representação Reduzida	28
3.2 Padrões de metilação do DNA no músculo	29
3.3 Distribuição no genoma de regiões diferencialmente metiladas.....	30
3.4 Relação entre metilação e expressão gênica.....	31
3.5 Genes diferencialmente metilados e análise de enriquecimento funcional.....	32

4 DISCUSSÃO	36
4.1 Principais genes diferencialmente metilados e expressos e vias relacionadas à adipogênese e lipogênese	37
5 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

RESUMO

O manejo da desmama precoce seguido de suplementação energética pode levar a alterações metabólicas no bezerro, causando efeitos em longo prazo na saúde e no desempenho do animal. Acredita-se que a principal base para essas adaptações metabólicas são mecanismos epigenéticos que regulam, ativam ou silenciam genes em diferentes estágios de desenvolvimento e/ou em resposta a diferentes estímulos ambientais. Comparando o perfil de metilação do músculo esquelético *Longissimus thoracis* de *Bos indicus* aos 205 dias de idade de animais desmamados de forma precoce e convencional (120 e 205 dias de idade, respectivamente), pode-se perceber maior nível de metilação do DNA no genoma dos animais do grupo precoce. Ao todo, foram encontradas 481 DMRs, com cerca de 52% (250) de regiões hipermetiladas e 48% (231) de hipometiladas. A análise de enriquecimento funcional considerou genes diferencialmente metilados (DMG) e expressos (DEGs)(n=53). Os principais termos e vias enriquecidas foram associadas a sinalização de cAMP (monofosfato de adenosina 3'-5'-cíclico) e metabolismo lipídico. Os genes *AKT1*, *ADCY3* e *PPARD* foram os mais associados a adipogênese e lipogênese, sugerindo um papel importante desses genes na deposição de gordura na carne de animais desmamados de forma precoce seguido de suplementação.

Palavras-chave: epigenética; desmama precoce; adipogênese; carne

ABSTRACT

Early weaning management followed by energy supplementation can lead to metabolic changes in the calf, causing long-term effects on the animal's health and performance. It is believed that the main basis for these metabolic adaptations are epigenetic mechanisms that regulate, activate or silence genes at different stages of development and/or in response to different environmental stimuli. Comparing the methylation profile of the skeletal muscle *Longissimus thoracis* of *Bos indicus* at 205 days of age of animals weaned early and conventionally (120 and 205 days of age, respectively), a higher level of DNA methylation can be seen in the genome of animals from the early group. A total of 481 DMRs were found, with around 52% (250) hypermethylated and 48% (231) hypomethylated regions. The functional enrichment analysis considered differentially methylated genes (DMGs) and differentially expressed genes (DEGs) (n=53). The main terms and pathways enriched were associated with cAMP (3'-5'-cyclic adenosine monophosphate) signaling and lipid metabolism. The *AKT1*, *ADCY3* and *PPARD* genes were the most associated with adipogenesis and lipogenesis, suggesting an important role for these genes in fat deposition in the meat of early-weaned animals followed by supplementation.

Keywords: epigenetics; early weaning; adipogenesis; meat

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Eventos básicos da miogênese (Rehfeldt et al., 2000).....4
- Figura 2.** Silenciamento gênico mediado por metilação do DNA. A) Mecanismo direto: a metilação do DNA (pirulitos alaranjados) impede a ligação de fatores de transcrição (FT) e o acoplamento da maquinaria de transcrição ao promotor; B) Mecanismo indireto: a metilação do DNA recruta proteínas ligadoras de metil (em rosa) que formam complexos repressores (R) no promotor, que suprimem a expressão do gene. TSS = sítio de início de transcrição (Niciura et al., 2015)..... 10

Capítulo 2

- Figura 1.** Porcentagem de DMRs hiper e hipometiladas por cromossomo.....29
- Figura 2.** Proporção de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) sobrepondo regiões intergênicas, de corpo gênico (éxon e íntron) e regiões promotoras (A). (B) mostra a proporção sobre ilhas CpG (CpGi), margens e outros.31
- Figura 3.** Resultado da análise de enriquecimento funcional GO_BP e KEGG para os 53 genes diferencialmente expressos e metilados entre os animais dos grupos DP e DC. O comprimento da barra é proporcional ao nível de significância, ou seja, quanto maior a barra mais significativa é a via.34

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Capítulo 2

Tabela 1. Suplementação e dietas baseadas em forragem natural, farelo de soja, milho, aditivos e minerais, oferecidos a bovinos nelore em diferentes fases de desenvolvimento e submetidos a diferentes protocolos de desmama.	25
Tabela 2. Estatísticas descritivas do Sequenciamento de Bissulfito de Representação Reduzida (RRBS).....	29
Tabela 3. Porcentagem de CpG, CHG e CHH metilados no genoma dos animais desmamados de forma precoce e convencional.	29
Tabela 4. DMRs localizadas em regiões promotoras e/ou TSS.	32
Tabela 5. Termos GO_BP e vias KEGG enriquecidos para os 53 genes diferencialmente expressos e metilados com p-valor e q-valor.	35
Gráfico 1. Gráfico de dispersão com porcentagem de metilação e nível de expressão gênica dos grupos DP vs DC aos 205 dias. Pontos cinzas indicam regiões promotoras.	32

LISTA DE ABREVIações

ABCZ - Associação Brasileira dos Criadores de Zebu

AC – Adenilato ciclase

ADCY3 – Adenilato ciclase 3

ADCY5 – Adenilato ciclase 5

AKT – Proteína quinase B

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

ATF - Fator de Ativação de Transcrição

C/EBP - Proteína de ligação ao intensificador/CCAAT

cAMP - adenosina monofosfato cíclico

cDNA - DNA complementar

CREB - Proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP

DC – Desmama convencional

DEG - Gene diferencialmente expresso

DMG – Gene diferencialmente metilado

DMR – Região diferencialmente metilada

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNMT - Metiltransferases de DNA

DP – Desmama precoce

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAP - Precursores fibro-adipogênicos

FT - Fatores de transcrição

GO-BP - Biological Process - Gene Ontology

GWAS - Associação Genômica Ampla (do inglês, Genome Wide Association Study)

HSL - Lipase sensível a hormônio

IP - Intervalo entre partos

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LT - Longissimus thoracis

MDB - Proteínas ligadoras de metil

NDT - Nutrientes Digestíveis Totais

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PD - Peso ao desmame

PGC-1 α - Coativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma

PMGZ - Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos

PPARD - Receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma

PPAR α - Receptor- α ativado por proliferadores de peroxissoma

PPAR- γ - Receptor- γ ativado por proliferador de peroxissoma

RNA - Ácido ribonucleico

RNA-Seq - Sequenciamento de RNA

RRBS - Requeciamento de bissulfito de representação reduzida

SAH - S-adenosilhomocisteína

SAM - S-adenosilmetionina

SREBP1 - proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol

TEC - Toneladas carcaça equivalente

TSS - Sítio de início de transcrição

UCP1 - Proteína desacopladora 1

WGBS - Sequenciamento de conversão de bissulfito do genoma completo

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, representando cerca de 12,18% do rebanho mundial. No quesito produção de carne, o país também se destaca na segunda colocação (Abiec, 2023). Cerca de 93% de todo o rebanho tem aptidão genética para corte, composto majoritariamente por raças zebuínas (*Bos indicus*), principalmente a Nelore (Abiec, 2022). Bovinos desta raça são caracterizados por serem adaptados ao ambiente tropical predominante no Brasil. No entanto, em comparação às raças europeias, bovinos Nelore são mais tardios quanto à reprodução e ao acabamento de carcaça, além de produzirem cortes com menor maciez e de maior variação em relação a essa característica (Pereira et al., 2015; Rosa et al., 2013), o que diminui a atratividade pelos consumidores (Font-I-Furnols e Guerrero, 2014).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para compreender os mecanismos moleculares que governam essas características por meio de GWAS, sequenciamento do DNA, transcriptoma, entre outros (De Souza et al., 2022; Leal-Gutiérrez et al., 2019; Gonçalves et al., 2018; Wright et al., 2018; Carvalho et al., 2017; Magalhães et al., 2016). Contudo, ainda são poucos os estudos que investigaram como alterações epigenéticas podem modular a expressão fenotípica de genes no músculo em bovinos da raça Nelore.

Na bovinocultura de corte existem manejos que visam melhorar a produtividade, principalmente por meio do aumento da eficiência das vacas, entre eles está a desmama precoce de bezerros (Arthington e Minton, 2004; Silveira, 2021). Segundo Restle et al. (2001), a desmama precoce tem a finalidade de reduzir o estresse da amamentação e, ao mesmo tempo, melhorar o estado nutricional da vaca, possibilitando melhor recuperação do estado corporal e retomada da manifestação do ciclo estral. Além disso, o processo da desmama precoce seguido de suplementação energética pode levar a alterações metabólicas no bezerro, causando efeitos em longo prazo na saúde e no desempenho do animal (Arthington e Minton, 2004). Acredita-se que a base principal para essas adaptações metabólicas são mecanismos epigenéticos que regulam, ativam ou silenciam genes em diferentes estágios de

desenvolvimento e/ou em resposta a diferentes estímulos ambientais (Veland e Chen, 2017).

2 OBJETIVOS

Descrever padrões de metilação do DNA do músculo *Longissimus thoracis* (LT) de bovinos Nelore (*Bos indicus*) desmamados de forma convencional e precoce, encontrar regiões e genes diferencialmente metilados entre os grupos, e relacionar os níveis de metilação do DNA com a expressão gênica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bovinocultura de corte no Brasil e melhoramento genético da raça Nelore

O rebanho bovino brasileiro no ano de 2022 foi estimado em 202 milhões de cabeças, caracterizando-se como o segundo maior do mundo. Com um abate de 42,31 milhões de cabeças, o volume de carne produzida foi de 10,79 milhões de toneladas carcaça equivalente (TEC), ficando atrás apenas da produção norte-americana. O Brasil é o principal exportador de carne bovina do mundo, tendo destinado 27,96% (3,02 milhões TEC) do total de sua produção para exportação, enquanto 71,48%, equivalente a 7,78 milhões TEC, permaneceram no mercado interno (Abiec, 2023).

Nos últimos dez anos o Brasil foi o país onde a produção e exportação mais cresceram, no entanto, sua produtividade ainda é baixa em comparação aos outros grandes produtores. Segundo boletim da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (Abiec, 2023), o país reduziu sua área de pastagem, aumentando sua taxa de ocupação para 1,32 cabeça por hectare. A expectativa é que a produtividade continue crescendo, principalmente pelo aumento do uso de sistema integrados de produção, melhoramento genético do rebanho, manejo e recuperação de pastagens, suplementação alimentar, boas práticas de produção, produção de novilho precoce, entre outros (Malafaia et al., 2020).

Essa atividade de sucesso começou com a chegada do primeiro rebanho trazido pelos colonos portugueses quando o Brasil foi descoberto. No início do século XIX, o zebu (*Bos indicus*) começou a ser importado, e posteriormente importado em maior escala, principalmente como tração para o transporte da época (Mariante e Cavalcante, 2000). Devido à sua adaptação às condições de criação do país, o zebu foi amplamente utilizado em cruzamentos absorventes com o gado crioulo, resultando

que grande parte do rebanho bovino brasileiro hoje é zebu ou de animais com algum grau de sangue zebu, em sua maioria da raça Nelore (De Alencar e Barbosa, 2010).

Nas últimas décadas, surgiram vários programas de avaliação genética de bovinos de corte no Brasil, incluindo em seus critérios de seleção informações relacionadas às características de carcaça. Voltados para a raça Nelore pode-se citar o Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos (PMGZ), da Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ), o programa Geneplus, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e o Programa Nelore Qualitas (Souza, 2022). Os avanços das pesquisas com foco no melhoramento genético têm sido continuamente influenciados por várias áreas afins, entre elas a biotecnologia (Packer e De Paz, 2001).

Apesar dos grandes avanços ao longo das últimas décadas, a indústria da carne bovina ainda enfrenta desafios, entre eles a falta de uniformidade da idade de abate dos animais, da cobertura de gordura e da marmorização da carne, fatores estes que influenciam na maciez e palatabilidade do produto (Arrigoni et al., 2004). Neste tocante, ganham importância as características associadas à qualidade da carne, como a maciez, as gorduras de cobertura e entremeada e a coloração. Em relação aos atributos de qualidade da carne, a maciez destaca-se como um dos aspectos mais valorizados pelos consumidores, sendo considerada como a característica organoléptica de maior influência na aceitação da carne (Paz e Luchiarri Filho, 2000; Ishihara e Madruga, 2013). Entretanto, mais recentemente, a quantidade de gordura intramuscular tem recebido maior atenção do consumidor e da indústria por melhorar aspectos organolépticos da carne. Buscando entender as bases genéticas e fisiológicas que governam essas características, diversos grupos de pesquisas estão combinando genômica, transcriptômica, proteômica, biologia computacional e bioquímica (Oliveira et al., 2017; Clark et al., 2011; Gagaoua et al., 2020; Fortes et al., 2009; Lee et al., 2010; Magalhães et al., 2019).

3.2 Crescimento e desenvolvimento dos tecidos muscular e adiposo

O entendimento sobre o crescimento e o desenvolvimento do tecido muscular é uma das principais bases da produção animal, principalmente quando o objetivo é a produção de carne. O tecido muscular representa em média 40% do peso corporal e 53 a 64% da carcaça (Lopes, 2010). Existe grande variação individual na qualidade

de carne entre os animais, a qual pode ser devida à diferenças em diversos fatores conhecidos e desconhecidos, intrínsecos (genéticos) e extrínsecos (ambiente), que interagem e definem os resultados dos processos metabólicos no período pré- e post-mortem (Lawrie e Ledward, 2014; Klont et al., 1998).

Durante a miogênese no embrião, os miotubos são formados a partir da proliferação, migração, diferenciação e fundição dos mioblastos que, posteriormente, se transformam em fibras musculares (Figura 1). Durante o segundo terço gestacional, outros mioblastos utilizam as miofibrilas primárias como suporte para alinharem-se e formar as fibras secundárias. Essas fibras secundárias formadas durante o período de mioblasto fetal determinam o número final de fibras no indivíduo adulto (Rodrigues Filho et al., 2011). Existe ainda uma população de mioblastos que não formam fibras musculares, mas ficam localizadas próximas às miofibrilas, e são chamadas de células satélites. Tais células satélites são responsáveis pela regeneração e crescimento pós-natal do músculo esquelético (Chargé e Rudnicki, 2004). Portanto, o fator determinante do potencial de crescimento do animal é a quantidade de fibras musculares ao nascimento, uma vez que o incremento da massa muscular no período pós-natal ocorre exclusivamente a partir do aumento do tamanho das células previamente formadas (Rodrigues Filho et al., 2011).

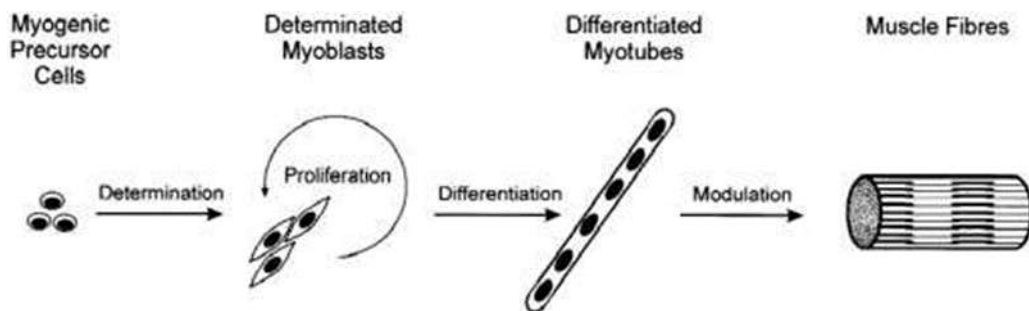


Figura 1. Eventos básicos da miogênese (Rehfeldt et al., 2000).

No tecido muscular dos mamíferos foram caracterizados quatro tipos básicos de fibras musculares: as fibras do tipo I, que são lentas, oxidativas, aeróbias; e as fibras do tipo II – subdivididas em IIA, IIB e IIX –, que expressam diferentes isoformas da proteína miosina (Schiaffino et al., 2020). É sabido que a distribuição do tipo de fibra nos músculos está relacionada às características de qualidade de carne (Klont et al., 1998; Picard e Gagaoua, 2020).

Além do tecido muscular, a quantidade, a distribuição e a composição do tecido adiposo na carne bovina são fatores que exercem grande impacto na qualidade organoléptica e nutricional deste alimento (Ladeira et al., 2016). A formação do tecido adiposo acontece de forma inversa ao desenvolvimento do tecido muscular, portanto, após a puberdade e maturidade sexual, à medida que o crescimento muscular diminui, o adiposo aumenta (Owens et al., 1995), principalmente, em razão da lipogênese (deposição de ácidos graxos e triglicerídeos nos adipócitos). No entanto, essa deposição não é homogênea, pois se inicia pela gordura interna (abdominal, renal-inguinal e pélvica), seguida da gordura intermuscular, subcutânea e intramuscular (Pethick et al., 2004). Com início no meio da gestação em ruminantes, a adipogênese é mais ativa no período perinatal e pós-natal inicial, continuando de forma menos intensa à medida que os animais envelhecem (Muhlhausler et al., 2007; Du et al., 2010; Du et al., 2013). Desta forma, os estágios fetais e neonatais são os principais para a geração de adipócitos intramusculares (Tong et al., 2008).

Os progenitores miogênicos se desenvolvem em células satélites e fibras musculares, enquanto as células progenitoras não miogênicas se desenvolvem na fração estromal-vascular dentro do músculo esquelético, mesmo local onde estão localizados os adipócitos, os fibroblastos e as células progenitoras mesenquimais (Du et al., 2013). Esses progenitores não miogênicos, os chamados “precursores fibroadipogênicos” (FAP), possuem capacidade adipogênica e fibrogênica (Joe et al., 2010). 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 (Duarte et al., 2013). Assim, os FAPs desempenham um papel importante na fisiologia normal e podem contribuir para o potencial de marmoreio do gado de corte (Ladeira et al., 2016).

3.3 Desmama precoce na bovinocultura de corte

Na pecuária de corte de ciclo completo, a produção do rebanho de cria é o componente mais importante (Restle et al. 1999), podendo ter impactos significativos na produtividade final. Tal fase não diz respeito somente aos bezerros e bezerras, mas também às matrizes, às novilhas e aos reprodutores (Oliveira et al., 2006). Segundo Corrêa et al. (2001), o intervalo entre partos (IP) se destaca como o principal índice

zootécnico e o primeiro que deve ser avaliado na fase de cria. O IP ideal nos bovinos é de doze meses, o que caracteriza a produção de um bezerro por vaca/ano, no entanto, a bovinocultura brasileira enfrenta dificuldades para alcançar essa meta, comprometendo assim, o desempenho geral do rebanho. Outro índice de fundamental importância é o peso ao desmame (PD), pois quanto mais pesado o bezerro, maior é a tendência em atingir o peso ao abate mais rápido (Cézar e Euclides Filho, 1996). Portanto, diante das exigências de mercado, é necessário melhorar os índices zootécnicos, tanto os reprodutivos quanto os produtivos, como a taxa de prenhez, a idade a primeira cria, o intervalo de partos principalmente das primíparas e a idade de abate dos animais (Silveira et al., 2021).

Neste cenário, existem diversas estratégias de manejo que podem ser utilizadas de forma racional em rebanhos de cria, visando, além dos índices reprodutivos, o atendimento das exigências nutricionais nas diferentes fases da vida e a máxima exploração do potencial genético dos animais (Castro et al., 2018). O manejo de desmama é um fator determinante na duração do anestro pós-parto nas vacas, visto que o retorno ao cio está relacionado com o período de amamentação. Neste sentido, a diminuição do período de amamentação demonstrou ser efetiva na redução do intervalo ao primeiro cio (Cubas et al., 1985; Valle et al., 1996; Lopes et al., 2013). Segundo Pascoal e Vaz (1997), um dos meios mais econômicos de aumentar a taxa de desmame do rebanho de cria é por intermédio do desmame de bezerros aos 60 - 90 dias de idade. Por isso, várias técnicas de desmama, entre elas a desmama precoce, vêm sendo desenvolvidas e amplamente utilizadas a fim de melhorar o desempenho reprodutivo de vacas no puerpério.

O desmame é definido como a separação definitiva do bezerro de sua mãe e tem como objetivo principal a interrupção da amamentação, de modo a estimular o desenvolvimento ruminal dos bezerros, eliminar o estresse da lactação nas vacas, e assim, conseqüentemente, diminuir significativamente as suas exigências nutricionais (Valle et al., 1996). A desmama precoce consiste em separar os bezerros das mães com cerca de 60 a 120 dias (Cattellam, 2014; Oliveira et al., 2006) ao invés de 180 a 205 dias de idade como tradicionalmente. Segundo Castro et al. (2018), a finalidade principal desta prática é reduzir o estresse da amamentação e os requerimentos nutricionais da vaca, permitindo que essas fêmeas recuperem sua condição corporal

e manifestem estro mais precocemente. No entanto, os ganhos obtidos no desenvolvimento, acúmulo de reservas e melhor desempenho reprodutivo nas vacas submetidas não podem ser perdidos com a má-nutrição dos bezerros desmamados precocemente (Beretta et al., 2002; Almeida e Lobato, 2004).

Restle et al. (2009) ao avaliar o desempenho de três grupos genéticos de bovinos desmamados aos 3 e 7 meses de idade, verificaram que, com uma nutrição adequada, os bezerros desmamados precocemente alcançaram o mesmo peso aos 25 meses (abate) que os desmamados de forma convencional. Lobato et al. (2007) observaram que ao desmamar os animais com 70 ou 180 dias de idade, estes apresentaram, aos dois anos de idade, similaridade nos pesos de abate, de carcaça quente e no rendimento de carcaça quente. Vaz e Lobato (2010) avaliando a influência da idade ao desmame, precoce (77 dias) e convencional (147 dias) sobre o comportamento reprodutivo de bezerras aos 13 e 15 meses de idade durante dois anos consecutivos, não observaram diferença estatística na taxa de prenhez, com as novilhas do desmame precoce chegando ao final do período reprodutivo com ótimo escore de condição corporal (3,81 pontos) e peso (297 kg), similar às novilhas do desmame convencional (3,85 pontos e 295 kg). Koletzko et al. (2009) mostraram que a nutrição nos primeiros meses pós nascimento causa efeitos a longo prazo na saúde e desempenho futuro do animal. Portanto, a nutrição adequada neste período crítico, pós-demama precoce, poderia 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.

3.4 Epigenética: a metilação do DNA e suas influências sobre a expressão gênica

O termo “Epigenética” foi utilizado pela primeira vez em 1942 por Conrad Waddington (Armstrong, 2014) e atualmente é definido como mudanças na expressão gênica que ocorrem não devido às alterações na sequência do DNA e que podem ser herdadas (Lieb et al., 2006; Goldberg et al., 2007). Portanto, não é só a sequência de DNA que contribui para o fenótipo, mas também as variações epigenéticas, que atuam em sinergia com as modificações genéticas para a manifestação fenotípica (Murrell et al., 2005). Diferenças nos padrões de expressão gênica que ocorrem ao longo do desenvolvimento de órgãos e tecidos geralmente ocorrem pelo estabelecimento de

marcas epigenéticas, sendo a regulação diferencial dos genes, por meio da epigenética, determinante para o destino celular (morfologia e função) e o fenótipo do indivíduo (Reik, 2007).

O epigenoma estabelece perfis de expressão gênica em células de vertebrados e, ao contrário do genoma, é dinâmico e varia de célula para célula. O epigenoma compreende dois componentes diferentes: a estrutura da cromatina, que está associada ao DNA, e um padrão de metilação do DNA, que faz parte da estrutura covalente do DNA (D'aleccio e Szyf, 2006). Esses processos trabalham juntos para afetar o empacotamento da cromatina, que por sua vez determina qual gene ou conjunto de genes é transcrito (Tang e Ho, 2007). A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, que é um dímero de dois complexos idênticos, cada um consistindo em quatro proteínas histonas: H2A, H2B, H3 e H4 (Wolffe, 1998). Mudanças na estrutura da cromatina influenciam a expressão dos genes, que permanecem inativos/desligados quando a cromatina está condensada e ficam ativos/ligados quando a cromatina estiver relaxada, ou seja, não condensada (Rodenhiser e Mann, 2006). Por sua vez, a metilação do DNA é uma das modificações epigenéticas mais estáveis e conhecidas, além de ser a principal candidata a coordenar a herança epigenética ao longo das gerações (Goldberg et al., 2007; Youngson e Whitelaw, 2008). Ela ocorre por meio da adição, por ligação covalente, de um grupamento metil (-CH₃) na posição 5 do anel pirimídico de uma citosina, geralmente seguida por uma guanina (dinucleotídeo CpG), transformando-a em 5-metil-citosina (5mC). A 5mC é considerada o "quinto nucleotídeo" e constitui cerca de 1% de todas as bases de DNA (Geiman e Muegge, 2010), variando ligeiramente em diferentes tipos de tecidos. A maior parte (75%) dos dinucleotídeos CpG em todo o genoma dos mamíferos são metilados (Tost, 2010).

A característica mais marcante dos padrões de metilação do DNA de mamíferos é a presença de ilhas CpG, isto é, aglomerados de CpGs que possuem comprimento de 200 pb a 5 kb, geralmente não metilados (ocorre perto dos locais de início da transcrição) em circunstâncias normais, exceto aqueles associados a genes imprintados, genes sujeitos à inativação do cromossomo X e elementos transponíveis (Antequera e Bird, 1996; Tang e Ho, 2007; Dolinoy et al., 2007; Suzukl e Bird, 2008; Tost, 2010). A metilação nessas regiões está associada ao silenciamento gênico e,

assim, quando essas ilhas não estão metiladas ocorre a expressão gênica (Oliveira et al., 2010; Portela e Esteller, 2010; Yuferov et al., 2010). Dinucleídeos CpG encontrados fora de ilhas, em regiões conhecidas como "margens (shores) da ilha CpG" são menos metilados quando comparadas com as ilhas em si (Tsankova et al., 2007; Robison e Nestler, 2011), mas também podem estar associadas com a inativação transcricional. Entretanto, quando a metilação ocorre no corpo dos genes (éxons e íntrons), também pode estar correlacionada com a sua expressão (Doi et al., 2009; Irizarry et al., 2009; Portela e Esteller, 2010). CpGs no corpo gênico (éxons/íntrons) e mais distantes do sítio de início de transcrição (TSS) podem inibir ou aumentar (desde que o promotor não esteja metilado) a expressão gênica dependendo do contexto genômico. Se a metilação (CpG) do corpo gênico ocorrer numa ilha CpG pode haver correlação negativa ou positiva com a expressão. Por outro lado, se a metilação não ocorrer numa ilha CpG, vai haver correlação positiva com a expressão, ou seja, com a metilação vai haver aumento de expressão gênica (Varley et al., 2013).

A metilação do DNA é realizada por meio da ação de metiltransferases de DNA (DNMTs). O grupamento metil é doado por um doador universal chamado S-adenosil-L-metionina (SAM). Em mamíferos, já foram identificadas três famílias de metiltransferases de DNA: a) DNMT1, composta pelas isoformas somáticas DNMT1s e oocitária DNMT1o; b) DNMT2; c) DNMT3, composta pelas DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L (Niciura et al., 2015). A metilação controla o silenciamento gênico através de mecanismos diretos e indiretos (Figura 2). Os diretos se caracterizam quando a própria metilação do DNA forma uma barreira física, impedindo a ligação de fatores de transcrição gerais ou afetando o estado de condensação da cromatina. Os indiretos se dão pelo recrutamento de proteínas ligadoras de metil (MDB) que se ligam especificamente ao DNA metilado, formando complexos repressores (Curradi et al., 2002; Niciura et al., 2015).

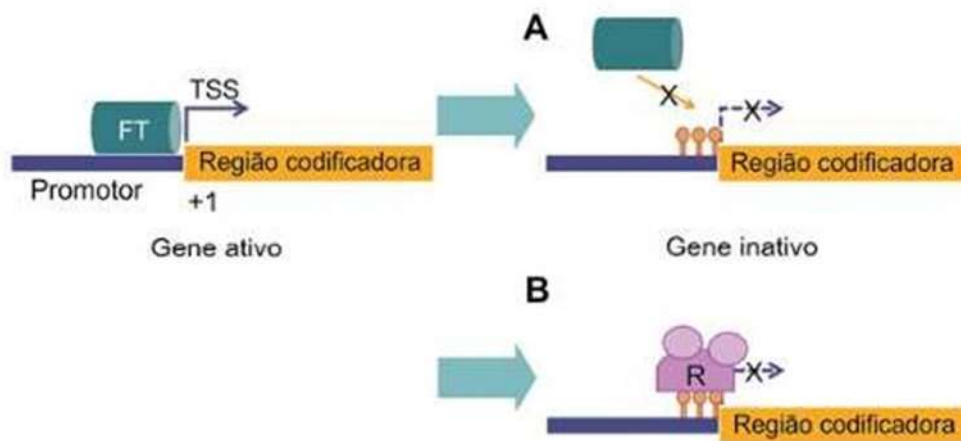


Figura 2. Silenciamento gênico mediado por metilação do DNA. A) Mecanismo direto: a metilação do DNA (pirulitos alaranjados) impede a ligação de fatores de transcrição (FT) e o acoplamento da maquinaria de transcrição ao promotor; B) Mecanismo indireto: a metilação do DNA recruta proteínas ligadoras de metil (em rosa) que formam complexos repressores (R) no promotor, que suprimem a expressão do gene. TSS = sítio de início de transcrição (Niciura et al., 2015).

Os mecanismos epigenéticos têm papéis distintos em vários processos biológicos, como o crescimento, o desenvolvimento, o metabolismo e a saúde dos animais (Ibeagha-Awemu e Zhao, 2015; González-Recio et al., 2015; Dean et al., 2005). Ademais, o entendimento de mecanismos epigenéticos podem ser vantajosos para a compreensão das características quantitativas e para alcançar avanços na melhoria da produtividade pecuária e da resistência a doenças (Ibeagha-Awemu e Khatib, 2017; González-Recio, 2012). Dada a sua importância, recentemente o metiloma foi investigado no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos taurinos e de população cruzada *Bos taurus* vs. *Bos indicus* - Brangus-Angus (Liu et al., 2021; Fang et al., 2017; Baik et al., 2014), em gado zebuino chinês (Chen et al., 2019), no músculo *Longissimus lumborum* de bovinos Angus endogâmicos divergentes para maciez da carne (Zhao et al., 2020) e, mais recentemente, no *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore contrastantes também em relação à maciez (De Souza et al., 2022).

3.5 Efeitos do ambiente/dieta sobre a metilação do DNA

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 metiltransferases (DNMT). DNA metiltransferases (DNMT) são consideradas enzimas chave para ativar a metilação do DNA em animais (Miranda e Jones, 2007). Como metil-doador universal para proteínas metiltransferase, a S-adenosilmetionina (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 co-fator para sua ativação total. Doadores de metil 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).

O controle da expressão gênica se dá pela ligação de fatores de transcrição (FT) em sequências específicas do DNA. 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 (Bensatti 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. No controle genético da expressão gênica, a expressão dos fatores de transcrição e, conseqüentemente a sua atuação, 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.

Fatores nutricionais, por exemplo, a metionina, que influencia o metabolismo do SAM e da S-adenosilhomocisteína (SAH), tem impacto na metilação do DNA. O estabelecimento do epigenoma é vulnerável a fatores nutricionais, especialmente durante os estágios pré-natal e pós-natal inicial dos animais (Mentch e Locasale, 2016; Zhang, 2015). Portanto, os desafios nutricionais durante a fase inicial de desenvolvimento podem ter um impacto dramático na metilação do DNA, no crescimento e na saúde dos animais (Zhang, 2015). Além disso, variações epigenéticas podem ocorrer no período de “transição alimentar”, em que os animais são expostos a uma dieta nutricionalmente desequilibrada que pode afetar a metilação do DNA (Zhang, 2015).

3.6 Sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS) para análise de metilação do DNA

Com o advento das tecnologias de sequenciamento de próxima geração, o sequenciamento de DNA convertido em bissulfito (BS-seq) tornou-se um método popular para estudar a metilação do DNA. Uma abordagem enriquecida, chamada sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS), está se tornando cada vez mais comum para a análise de perfis de metilação em nível de nucleotídeo único (Liu et al., 2020; Wan e Bell, 2020; Meissner, 2005). O RRBS foi desenvolvido para fornecer informações detalhadas sobre os padrões de metilação em regiões específicas do genoma, sem a necessidade de sequenciar o genoma completo, tornando o processo menos oneroso quando comparado a outras técnicas (Stockwell et al., 2014). Portanto, trata-se de um método para estudar a metilação do DNA em escala genômica com resolução de nucleotídeo único, caracterizando-se como uma variação do sequenciamento de conversão de bissulfito do genoma completo (WGBS). Em comparação com o WGBS, o RRBS reduz mais de 95% do requisito de sequenciamento para capturar CpGs de \pm 80% de ilhas CpG, mais de 50% de promotores, bem como uma porcentagem relativamente menor de outras regiões

reguladoras genômicas, como intensificadores, em genoma humano (Wan e Bell, 2020).

O RRBS usa digestão com enzimas de restrição, geralmente MspI, que possui uma sequência de reconhecimento de 5'-CCGG-3', portanto cada fragmento produzido conterá pelo menos um dinucleotídeo CpG. A técnica permite a seleção e sequenciamento preferencial de regiões ricas em CpG (Doherty e Couldrey, 2014). Além do tratamento prévio do DNA com MspI, as bibliotecas genômicas são tratadas com bissulfato de sódio, o que leva a modificação da estrutura química da citosina não metilada (C) para uma uracila (U). Isso não ocorre com 5-mC, o que permite a posterior distinção *in silico* de citosinas metiladas e não metiladas, permitindo acessar a porcentagem de citosinas metiladas em cada região.

A técnica de sequenciamento RRBS tem sido empregada com sucesso na análise do metiloma em bovinos. Em um estudo conduzido por Del Corvo et al. (2021), a técnica foi utilizada de maneira eficaz para investigar os padrões de metilação em bovinos das raças Nelore e Angus, submetidos ao estresse térmico, através da análise do DNA genômico obtido a partir de amostras sanguíneas. Além disso, Souza et al. (2022), aplicaram o RRBS para explorar os mecanismos epigenéticos subjacentes à textura da carne bovina em *Bos indicus*, possibilitando a detecção de citosinas e regiões com metilação diferencial em grupos contrastantes para a maciez da carne.

REFERÊNCIAS

- 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(3), 239-252.
- Antequera F, Bird A (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90(24), 11995- 11999.
- Aquino BB (2011) Considerações sobre desmame em bovinos de corte.
- Armstrong L (2014) **Epigenetics**. New York, NY: Garland Science.
- Arrigoni MDB, Alves Júnior A, Dias PMA, Martins CL, Cervieri RDC, Silveira AC, Chardulo LAL (2004) Desempenho, fibras musculares e carne de bovinos jovens de três grupos genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39, 1033-1039.
- Arthington JD (2003) Aumento da Produtividade em primíparas pela utilização da desmama precoce. Anais... VII Curso Novos Enfoques na produção e Reprodução de Bovinos, 230-233.

Arthington JD, Minton JE (2004) The Effect of Early Calf Weaning on Feed Intake, Growth, and Postpartum Interval in Thin, Brahman-Crossbred Primiparous Cows¹. **The Professional Animal Scientist**, v. 20, n. 1, p. 34–38.

Baik M et al. (2014) Association of DNA Methylation Levels with Tissue-specific Expression of Adipogenic and Lipogenic Genes in Longissimus dorsi Muscle of Korean Cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 10, p. 1493–1498.

Beef Report 2022 – ABIEC (2022) Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>>. Acesso em: 14 ago. 2023

Beef Report 2023 | Capítulo 03 | A pecuária mundial – ABIEC (2023) Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-03/>>. Acesso em: 18 ago. 2023

Beef Report 2023 | Capítulo 04 | A pecuária do Brasil – ABIEC (2023) Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-04/>>. Acesso em: 18 ago. 2023

Benetti E, Collino M, Patel N (2012) PPAR Agonism as New Pharmacological Approach to the Management of Acute Ischemic Stroke. **INTECH Open Access Publisher**.

Beretta V, Lobato JFP, Mielitz NCG (2002) Produtividade e eficiência biológica de sistemas de produção de gado de corte de ciclo completo no Rio Grande de Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2 suppl, p. 991–1001.

Boudida Y, Gagaoua M, Becila S, Picard B, Boudjellal A, Herrera-Mendez CH, ... & Ouali A (2016) Serine protease inhibitors as good predictors of meat tenderness: which are they and what are their functions? **Critical reviews in food science and nutrition**, 56(6), 957-972.

Carvalho ME, Baldi FS, Santana MHDA, Ventura RV, Oliveira GA, Bueno RS, ... & Ferraz JBS (2017) Identification of genomic regions related to tenderness in Nellore beef cattle. **Advances in Animal Biosciences**, 8(s1), s42-s44.

De Castro FC, Fernandes H, Leal CLV (2018) Sistemas de manejo para maximização da eficiência reprodutiva em bovinos de corte nos trópicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 41–61.

Cattellam J (2014) Desmame precoce na produção de bovinos de corte. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 13(2), 190-198.

Cesar AS, Regitano LC, Mourão GB, Tullio RR, Lanna DP, Nassu RT, ... & Coutinho LL (2014) Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nellore cattle. **BMC genetics**, 15(1), 1-15.

Cezar IM, Euclides FK (1996) Novilho precoce: reflexos na eficiência e economicidade do sistema de produção.

Chen Z, Chu S, Xu X, Jiang J, Wang W, Shen H, ... & Yang Z (2019) Analysis of longissimus muscle quality characteristics and associations with DNA methylation status in cattle. **Genes & genomics**, 41, 1147-1163.

Clark DL, Boler DD, Kutzler LW, Jones KA, McKeith FK, Killefer J, ... & Dilger AC (2011) Muscle gene expression associated with increased marbling in beef cattle. **Animal biotechnology**, 22(2), 51-63.

Corrêa ES, Euclides FK, Alves RDO, Vieira A (2001). Desempenho reprodutivo em um sistema de produção de gado de corte. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, 2001.

Cubas AC, Mancio, AB, Lesskiu C, Tahira JK. (1985). Efeito da amamentação controlada sobre a eficiência reprodutiva de vacas de corte no sul do Paraná. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 14, 247-255.

Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. **Molecular and cellular biology**, 22(9), 3157-3173.

D'alessio AC, Szyf M (2006) Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, n. 4, p. 463– 466.

De Alencar MM, Barbosa PF (2010). Melhoramento genético de gado de corte no Brasil. In *Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **Simpósio Brasileiro de Melhoramento animal*** (Vol. 8).

De Almeida LSP, Lobato JFP (2004) Efeito da Idade de Desmame e Suplementação no Desenvolvimento de Novilhas de Corte¹. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33(Supl. 2) 6), 2086-2094.

De Oliveira LOF, De Abreu UGP, Nogueira É, Bueno AA, Sobrinho DSNB, & Mendes EDM (2019) Desempenho de bezerros submetidos a desmama precoce no Pantanal. **Ciência Animal Brasileira**, 20(1), 1-12.

De Souza MM, Niciura SCM, Rocha MIP, Pan Z, Zhou H, Bruscadin JJ, ... & De Almeida Regitano LC (2022) DNA methylation may affect beef tenderness through signal transduction in *Bos indicus*. **Epigenetics & Chromatin**, 15(1), 15.

Dean W, Lucifero D, Santos F (2005) DNA methylation in mammalian development and disease. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, 75(2), 98- 111.

Del Corvo M, Lazzari B, Capra E, Zavarez L, Milanese M, Utsunomiya YT, ... & Ajmone-Marsan P (2021) Methylome patterns of cattle adaptation to heat stress. **Frontiers in genetics**, 12, 633132.

Doherty R, Couldrey C (2014) Exploring genome wide bisulfite sequencing for DNA methylation analysis in livestock: a technical assessment. **Frontiers in Genetics**, v. 5

Dolinoy DC, Das R, Weidman JR, Jirtle RL (2007) Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. **Pediatric research**, 61(7), 30-37.

Dudley KJ, Li X, Kobor MS, Kippin TE, Bredy TW (2011) Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 35(7), 1544-1551.

- Fang X, Zhao Z, Yu H, Li G, Jiang P, Yang Y, ... & Yu X (2017) Comparative genome-wide methylation analysis of *Longissimus dorsi* muscles between Japanese black (Wagyu) and Chinese Red Steppes cattle. **PLoS one**, 12(8), e0182492.
- Feil R, Fraga MF (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 2, p. 97–109.
- Ferrinho AM, de Moura GV, da Silva Martins T, Muñoz J, Mueller LF, Garbossa PLM, ... & Pereira AS (2021) Rubia Gallega x Nelore crossbred cattle improve beef tenderness through changes in protein abundance and gene expression. **Livestock Science**, 251, 104634.
- Font-i-furnols M, Guerrero L (2014) Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. **Meat Science**, Meat Science, Sustainability & Innovation: '60th International Congress of Meat Science and Technology 17-22 August 2014, Punta del Este, Uruguay'. v. 98, n. 3, p. 361–371.
- Fortes MR, Curi RA, Chardulo LAL, Silveira AC, Assumpção ME, Visintin JA, & Oliveira HND (2009) Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. **Genetics and Molecular Biology**, 32, 75-82.
- Gagaoua M, Bonnet M, Picard B (2020) Protein Array-Based Approach to Evaluate Biomarkers of Beef Tenderness and Marbling in Cows: Understanding of the Underlying Mechanisms and Prediction. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1180.
- Geiman TM, Muegge K (2010) DNA methylation in early development: DNA METHYLATION IN EARLY DEVELOPMENT. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 2, p. 105–113, 2010.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E (2007) Epigenetics: A Landscape Takes Shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635–638.
- Gonçalves TM, de Almeida Regitano LC, Koltjes JE, Cesar ASM, da Silva Andrade SC, Mourão GB, ... & Coutinho LL (2018) Gene co-expression analysis indicates potential pathways and regulators of beef tenderness in Nelore cattle. **Frontiers in genetics**, 9, 441.
- González-recio O (2012) Epigenetics: A New Challenge in the Post-Genomic Era of Livestock. **Frontiers in Genetics**, v. 2.
- González-recio O, Toro MA, Bach A (2015) Past, present, and future of epigenetics applied to livestock breeding. **Frontiers in Genetics**, v. 6.
- Hocquette JF, Lehnert S, Barendse W, Cassar-Malek I, & Picard B (2007) Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, 1(1), 159-173.
- Ibeagha-awemu EM, Khatib H (2017) Epigenetics of Livestock Breeding. Em: **Handbook of Epigenetics**. [s.l.] Elsevier. p. 441–463.
- Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, ... & Bird AP (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. **PLoS genetics**, 6(9), e1001134.

- Ishihara YM, Madruga MS (2013) Indicadores de maciez em carnes salgadas e dessecadas: uma revisão. Seminário: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6Supl2, p. 3721.
- Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, Maurin AC, Averous J, Bruhat A, ... & Fafournoux P (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(9), 3271-3278.
- Koletzko BT, Decsi D, Molnar A, De la Hunty (2009) Early nutrition programming and health outcomes in later life: obesity and beyond. **Springer**. 646:198p.
- Leal-Gutiérrez JD, Elzo MA, Johnson DD, Hamblen H, & Mateescu RG (2019) Genome wide association and gene enrichment analysis reveal membrane anchoring and structural proteins associated with meat quality in beef. **BMC genomics**, 20(1), 1-18.
- Lee SH, Gondro C, Van der Werf J, Kim NK, Lim DJ, Park EW, ... & Thompson JM (2010) Use of a bovine genome array to identify new biological pathways for beef marbling in Hanwoo (Korean Cattle). **BMC genomics**, 11, 1-11.
- Lieb JD, Beck S, Bulyk ML, Farnham P, Hattori N, Henikoff S, ... & Gready JM (2006) Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. **Cytogenetic and genome research**, 114(1), 1-15.
- Liu L, Amorín R, Moriel P, DiLorenzo N, Lancaster PA, & Peñagaricano F (2021) Maternal methionine supplementation during gestation alters alternative splicing and DNA methylation in bovine skeletal muscle. **BMC genomics**, 22, 1-11.
- Liu Y, Han Y, Zhou L, Pan X, Sun X, Liu Y, ... & Liu P (2020) A comprehensive evaluation of computational tools to identify differential methylation regions using RRBS data. **Genomics**, 112(6), 4567-4576.
- Lobato JFP, Almeida LSP, Osorio EB, Müller A (2007) Efeito da idade de desmama no desenvolvimento e nas características de carcaça de novilhos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.596-602.
- Lopes KSM, Yokobatake KLA, Ortunho VV, Costa NR, & Okuda HT (2013) Efeito da desmama precoce na eficiência reprodutiva de vacas Guzerá. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 43, 400-407.
- Lopes LS (2010) Aspectos fisiológicos e estruturais que influenciam o desenvolvimento do tecido muscular. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 834.
- Magalhaes AF, De Camargo GM, Fernandes GA, Gordo DG, Tonussi RL, Costa RB, ... & De Albuquerque LG (2016) Genome-wide association study of meat quality traits in Nelore cattle. **PLoS One**, 11(6), e0157845.
- Magalhães AFB, Schenkel FS, Garcia DA, Gordo DGM, Tonussi RL, Espigolan R, ... & de Albuquerque LG (2019) Genomic selection for meat quality traits in Nelore cattle. **Meat science**, 148, 32-37.
- Malafaia GC, Dia FRT, & Biscola PHN (2020) A terceira onda da pecuária de corte no Brasil.

Mariante ASC (2000) Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil. Brasília: **Embrapa-Cenargen**, 232 p., [s.d.].

Mckay JA, Mathers JC (2011) Diet induced epigenetic changes and their implications for health: Nutrition, epigenetics and health. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 2, p. 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**, v. 11, n. 3, p. 139–146.

Meissner A (2005) Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 18, p. 5868–5877.

Mentch SJ, Locasale JW (2016) One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1363, n. 1, p. 91–98.

Miranda TB, Jones PA (2007) DNA methylation: The nuts and bolts of repression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 384–390.

Mukherjee N, Kumar AP, Ghosh R (2015) DNA Methylation and Flavonoids in Genitourinary Cancers. **Current Pharmacology Reports**, v. 1, n. 2, p. 112–120, 2015.

Murrell A, Rakyan VK, Beck S (2005) From genome to epigenome. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. suppl_1, p. R3–R10.

Niciura SCM, Saraiva NZ (2015) Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e a vegetal. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste; Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**.

Oliveira PPD (2017) Avaliação das características obtidas por ultrassom e a associação do uso de marcador molecular para o marmoreio em bovinos de raça Nelore.

Oliveira RL, Barbosa MAADF, Ladeira MM, Silva MMP, Ziviani AC, & Bagaldo AR (2006) Nutrição e manejo de bovinos de corte na fase de cria.

Ouali A, Gagaoua M, Boudida Y, Becila S, Boudjellal A, Herrera-Mendez CH, & Sentandreu MA (2013) Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat science**, 95(4), 854-870.

Packer IU, Paz CP (2001) Impactos da biotecnologia no melhoramento animal. In: MATTOS, W.R.S. et al. (Ed.). **A Produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ. p.717-727.

Pascoal LL, Vaz FN (1997) Desmame precoce aos sessenta dias. Técnicas avançadas na recria e engorda de bovinos de corte. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 36-50.

Paz CCP, Luchiari Filho A (2000) Melhoramento genético e diferenças de raças com relação à qualidade da carne bovina. **Pecuária de corte**, 101: 58-63.

- Pereira ASC, Baldi FS, Sainz RD, Utembergue BL, Chiaia HLJ, Magnabosco CD U, ... & Sobral PJDA (2014) Growth performance, and carcass and meat quality traits in progeny of Poll Nellore, Angus and Brahman sires under tropical conditions. **Animal production science**, 55(10), 1295-1302.
- Picard B, Gagaoua M, Micol D, Cassar-Malek I, Hocquette JF, & Terlouw CE (2014) Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. **Journal of agricultural and food chemistry**, 62(40), 9808-9818.
- Picard B, Berri C, Lefaucheur L, Molette C, Sayd T, & Terlouw C (2010) Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in functional genomics**, 9(3), 259-278.
- Reik W (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425–432.
- Restle J, Vaz RZ, Alves Filho DC, Bernardes RADLC, Pascoal LL, Senna DBD, & Polli VA (2001). Desempenho de vacas Charolês e Nelore desterнейradas aos três ou sete meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30, 499-507.
- Restle, J., Polli VA, Alves Filho DC, Senna DBD, Vaz RZ, Bernardes RAC, Silva JHSD (1999). Desenvolvimento de bovinos de corte de diferentes grupos genéticos desmamados aos 3 ou 7 meses de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 28, 1023-1030.
- Rodenhiser D (2006) Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, v. 174, n. 3, p. 341–348.
- Rodrigues Filho M, Zangeronimo M, Lopes L, Ladeira M, Andrade I (2011) Fisiologia do crescimento e desenvolvimento do tecido muscular e sua relação com a qualidade da carne em bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**, 8(2), 1431- 1443.
- Rosa ADN (2013) Melhoramento genético aplicado em gado de corte.
- Schiaffino S, Reggiani C, Murgia M (2020). Fiber type diversity in skeletal muscle explored by mass spectrometry-based single fiber proteomics. **Histology and Histopathology**, v. 35, n. 03, p. 239–246
- Silveira LGG, Piona MNM, Mousquer CJ, Gomes RS, Silveira AC (2021) Sistemas de cria em áreas tropicais: desmama precoce. Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 15(1), 1-14.
- Souza MLVD (2022) Mensurações das características musculosidade e pigmentação em programas de melhoramento genético da raça Nelore: revisão de literatura.
- Stockwell PA, Chatterjee A, Rodger EJ, Morison IM (2014) DMAP: differential methylation analysis package for RRBS and WGBS data. **Bioinformatics**, 30(13), 1814-1822.
- Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature reviews genetics**, 9(6), 465-476.

Tang WY, Ho SM (2007) Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, 8, 173-182.

Tizioto PC, Decker JE, Taylor JF, Schnabel RD, Mudadu MA, Silva FL, ... & Regitano LCA (2013) Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiological genomics**, 45(21), 1012-1020.

Tost J (2010) DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Molecular biotechnology**, 44, 71- 81.

Do Valle ER, Encarnacao RDO, Thiago LDS (1996) Métodos de desmama para aumento da eficiência reprodutiva de bovinos de corte.

Vaz RZ, Lobato JFP (2010) Efeito da idade de desmame no desempenho reprodutivo de novilhas de corte expostas à reprodução aos 13/15 meses de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 142-150.

Wan M, Bell DA (2020) Analysis of genome-wide methylation using reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) technology. In **Epigenetics Methods** (pp. 141-156). Academic Press.

Wolffe A (1998) Chromatin: structure and function. Academic press.

Wright SA, Ramos P, Johnson DD, Scheffler JM, Elzo MA, Mateescu RG, ... & Scheffler TL (2018) Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation, and tenderness in an Angus-Brahman multibreed herd. **Meat Science**, 135, 84-93.

Youngson NA, Whitelaw E (2008) Transgenerational epigenetic effects. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, 9, 233-257.

Zhang N (2015) Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 144–151.

Chunping Z, Guanyu J, Yaokun L, Fei T, Linsen Z, Jiuzhou S (2020) The profiling of DNA methylation and its regulation on divergent tenderness in Angus beef cattle.

CAPÍTULO 2 - PADRÕES DE METILAÇÃO DO DNA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE BOVINOS DA RAÇA NELORE SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESMAMA

Resumo – O manejo da desmama precoce seguido de suplementação energética pode levar a alterações metabólicas no bezerro, causando efeitos em longo prazo na saúde e no desempenho do animal. Acredita-se que a principal base para essas adaptações metabólicas são mecanismos epigenéticos que regulam, ativam ou silenciam genes em diferentes estágios de desenvolvimento e/ou em resposta a diferentes estímulos ambientais. Comparando o perfil de metilação do músculo esquelético *Longissimus thoracis* de *Bos indicus* aos 205 dias de idade de animais desmamados de forma precoce e convencional (120 e 205 dias de idade, respectivamente), pode-se perceber maior nível de metilação do DNA no genoma dos animais do grupo precoce. Ao todo, foram encontradas 481 DMRs, com cerca de 52% (250) de regiões hipermetiladas e 48% (231) de hipometiladas. A análise de enriquecimento funcional considerou genes diferencialmente metilados (DMG) e expressos (DEGs)(n=53). Os principais termos e vias enriquecidas foram associadas a sinalização de cAMP (monofosfato de adenosina 3'-5'-cíclico) e metabolismo lipídico. Os genes *AKT1*, *ADCY3* e *PPARD* foram os mais associados a adipogênese e lipogênese, sugerindo um papel importante desses genes na deposição de gordura na carne de animais desmamados de forma precoce seguido de suplementação.

Palavras-chave: epigenética; desmama precoce; adipogênese; carne

ABSTRACT

Early weaning management followed by energy supplementation can lead to metabolic changes in the calf, causing long-term effects on the animal's health and performance. It is believed that the main basis for these metabolic adaptations are epigenetic mechanisms that regulate, activate or silence genes at different stages of development and/or in response to different environmental stimuli. Comparing the methylation profile of the skeletal muscle *Longissimus thoracis* of *Bos indicus* at 205 days of age of animals weaned early and conventionally (120 and 205 days of age, respectively), a higher level of DNA methylation can be seen in the genome of animals from the early group. A total of 481 DMRs were found, with around 52% (250) hypermethylated and 48% (231) hypomethylated regions. The functional enrichment analysis considered differentially methylated genes (DMGs) and differentially expressed genes (DEGs) (n=53). The main terms and pathways enriched were associated with cAMP (3'-5'-cyclic adenosine monophosphate) signaling and lipid metabolism. The *AKT1*, *ADCY3* and *PPARD* genes were the most associated with adipogenesis and lipogenesis, suggesting an important role for these genes in fat deposition in the meat of early-weaned animals followed by supplementation.

Keywords: epigenetics; early weaning; adipogenesis; meat

1 INTRODUÇÃO

A desmama precoce consiste em separar os bezerros das mães entre 90 e 120 dias de idade. Esse manejo tem a finalidade de reduzir o estresse da amamentação e os requerimentos nutricionais da vaca, possibilitando uma melhor recuperação do estado corporal e retomada da manifestação do ciclo estral (Restle et al., 2001). No entanto é necessário dedicar atenção aos bezerros desmamados precocemente para evitar a má-nutrição dos mesmos (Beretta et al., 2002; Almeida e Lobato, 2004). Segundo De Menezes et al. (2008), a utilização de fontes energéticas na suplementação de bezerros desmamados precocemente pode alcançar um desempenho indicado para sistemas de idade de abate entre 18 e 24 meses. Scheffler et al. (2014), ao estudar bezerros que consumiram uma dieta rica em concentrado após o desmame precoce, concluíram que a alimentação com alto teor de concentrado é uma estratégia viável para aumentar a deposição de gordura intramuscular (marmoreio) em comparação com um sistema de produção tradicional. Como já demonstrado em raças de origem europeia, o desmame precoce pode ter grande efeito sobre a fisiologia de bezerros que serão destinados ao abate, levando a adaptações metabólicas diferentes dos que são desmamados de forma convencional (aos 210 dias de idade) (Gasser et al., 2006; Scheffler et al., 2014). Como base dessas alterações metabólicas estão os mecanismos epigenéticos, que podem atuar na modulação e expressão gênica (Veland e Chen, 2017) e, conseqüentemente, nos fenótipos.

A metilação do DNA, principal modificação epigenética, pode controlar a expressão gênica por meio da formação de uma barreira física, impedindo a ligação de fatores de transcrição gerais ou afetando o estado de condensação da cromatina, além de operar no recrutamento de proteínas ligadoras de metil (MDB) formando complexos repressores (Curradi et al., 2002; Niciura et al., 2015). A dieta tem papel fundamental na determinação do padrão de metilação do DNA, já que pode atuar por meio do fornecimento de substratos necessários para a metilação, fornecimento de cofatores que modulam a atividade enzimática da DNA metiltransferase (DNMT) e alteração da atividade das enzimas que regulam o ciclo de um carbono (Zhang, 2015). Como doador universal de metil para DNA e proteínas metiltransferases, a S-

adenosilmetionina (SAM) é sintetizada no ciclo da metionina a partir de vários precursores disponíveis nos alimentos (Mckay e Mathers, 2011; Feil e Fraga, 2012).

O estabelecimento do epigenoma é vulnerável a fatores nutricionais especialmente durante os estágios pré-natal e pós-natal inicial dos animais (Mentch e Locasale, 2016; Zhang, 2015). Segundo Silveira et al. (2021), é possível induzir o “imprinting metabólico”, onde a nutrição adequada nos primeiros meses pós nascimento induz positivamente o metabolismo da glicose e causa efeitos em longo prazo na saúde e desempenho do animal. Dessa forma, existem períodos críticos de desenvolvimento, conhecidos por “janela nutricional”, em que pode haver a alteração no perfil de metilação do DNA e da expressão gênica, modificando de forma permanente o metabolismo do animal.

Até o momento, não existem estudos sobre como a epigenética, principalmente por meio da metilação do DNA, pode modular a expressão de genes em bovinos Nelore submetidos ao desmame precoce seguido de suplementação. Portanto, buscou-se investigar se diferentes manejos nutricionais à fase de cria podem levar à alterações epigenéticas, em especial a metilação do DNA, e como estas marcas podem afetar a expressão de genes no músculo esquelético de bovinos Nelore e, conseqüentemente, fenótipos relacionados à produção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e coleta do tecido muscular

O experimento de campo foi conduzido na cidade de Cáceres, estado do Mato Grosso - Brasil, junto a uma das fazendas atendidas pela empresa Silveira Consultoria e Gestão Pecuária. O clima da região caracteriza-se como Tropical com duas estações bem definidas (seca no inverno e úmida no verão), temperatura média anual de 25° Celsius e precipitação média de 1.396 mm/ano (Silva et al., 2008). A partir de um rebanho de 400 animais foram inicialmente pré-selecionados 40 bezerros machos da raça Nelore, registrados na associação nacional de criadores da raça, que foram submetidos a dois tratamentos: desmama precoce (DP) e desmama convencional (DC), realizadas aos 120 e aos 205 dias de idade, respectivamente. Para o tratamento DP foram escolhidos, aleatoriamente, 20 indivíduos, os quais foram desmamados aos 120 dias de idade apresentando $123,15 \pm 11,654$ kg de peso médio, e permaneceram confinados sob suplementação até 205 dias, onde alcançaram média de peso de

190,32 ± 19,070 kg. O tratamento DC contou com outros 20 bezerros, os quais foram mantidos à pasto de capim braquiária junto às vacas e desmamados aos 205 dias com 194,39 ± 12,825 kg de peso médio, ou seja, passaram pelo período de aleitamento e desmama convencional comumente praticada na bovinocultura de corte. Deste modo, exceto pelo período distinto de aleitamento, o qual consistiu nos diferentes tratamentos, os bovinos permaneceram em ambiente comum, com mesmo manejo e dieta (Tabela 1). Uma mistura contendo de 16 a 20% de proteína bruta pode garantir um bom crescimento e desenvolvimento ao bezerro (Embrapa, 1995). Bezerros precocemente desmamados recebendo 1% do peso corporal de um suplemento contendo 15% de PB e 70% de NDT ou sem suplementação ganharam 0,74 e 0,30 kg/d, respectivamente (Vendramini et al., 2006).

Tabela 1. Suplementação e dietas baseadas em forragem natural, farelo de soja, milho, aditivos e minerais, oferecidos a bovinos nelore em diferentes fases de desenvolvimento e submetidos a diferentes protocolos de desmama.

Fases da criação	Desmama precoce	Desmama convencional
Nascimento até os 120 dias	Aleitamento convencional e pasto braquiária com a vaca	
120 até 205 dias	Pastagem tifton 85 + ração concentrada (20% de PB ¹ ; 75% de NDT ²): 2g de MS*/kg de PV**	Aleitamento convencional e mantidos em pasto de braquiária

¹Proteína Bruta; ²Nutrientes Digestíveis Totais; *MS = Matéria Seca; **PV = Peso vivo.

Amostras do tecido muscular estriado esquelético foram obtidas dos bezerros nas duas diferentes idades: (1) aos 120 dias (desmama do grupo DP); (2) aos 210 dias (desmama do grupo DC), por meio de biópsias realizadas no músculo *Longissimus thoracis* entre as 12° e 13° costelas. Foram, portanto, coletados tecidos para as análises de ambos os tratamentos DP e DC em dois momentos distintos: aos 120 e 205 dias. Após a coleta, as biópsias foram mantidas em nitrogênio líquido e transportadas para o Laboratório de Genética e Melhoramento Animal (LGMA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual

Paulista – Unesp, Botucatu. Essas amostras permaneceram congeladas a -80°C até o momento das extrações de RNA e DNA.

2.2. Extração do RNA e análise da expressão gênica diferencial

A análise da expressão gênica diferencial, realizada por meio da técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq), ocorreu entre os tratamentos (DP vs. DC – 5 indivíduos/grupo) no momento da desmama convencional aos 205 dias (M2). Os processos de extração do RNA, preparação das bibliotecas de cDNA, sequenciamento e mapeamento das reads no genoma bovino de referência (*Bos taurus* – ARS-UCD1.3) foram realizados seguindo protocolos e parâmetros recomendados e consagrados pela comunidade científica internacional para que fossem obtidos dados de qualidade e em quantidade suficiente para a realização das análises subsequentes. A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada pelo método implementado no pacote edgeR v.3.40.0 (Robinson et al., 2010), do software R, que considera o parâmetro de comparação pairwise e assume que os dados de contagem seguem distribuição binomial negativa. Informações detalhadas a respeito da análise da expressão gênica diferencial empregada e dos resultados obtidos foram disponibilizadas por Pedro et al. (2023).

2.3 Extração do DNA genômico, sequenciamento RRBS, controle de qualidade e alinhamento ao genoma de referência

Cinco indivíduos de cada grupo (DP e DC) tiveram o DNA genômico total extraído, a partir das biópsias de músculo coletadas aos 205 dias, para o sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (reduced representation bisulfite sequencing – RRBS), o qual prioriza regiões genômicas ricas em CpG. Deste modo, 10 bibliotecas genômicas foram preparadas e sequenciadas (cinco DP vs cinco 28 DC). O DNA genômico extraído do tecido muscular *Longissimus thoracis* e enriquecido para as regiões de interesse foi sequenciado pelo método RRBS pela empresa norte americana Zymo Research Corporation. Para preparação das bibliotecas RRBS foram utilizados 400ng de DNA genômico, os quais foram digeridos com 30 unidades de MspI (New England Biolab, UK). Os fragmentos foram ligados a adaptadores contendo 5-metil-citosina ao invés de citosina de acordo com as diretrizes especificadas pela empresa Illumina (Illumina, EUA). Os fragmentos ligados ao adaptador com tamanho ≥ 50 pb foram recuperados usando o DNA Clean &

Concentrator™- 5 (Zymo Research, EUA). Os fragmentos foram então tratados com bissulfito usando o Kit EZ DNA Methylation-Lightning™ (Zymo Research, EUA). A PCR em escala preparativa foi realizada e os produtos resultantes foram purificados utilizando novamente o DNA Clean & Concentrator™-5 para sequenciamento na plataforma Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, EUA), a qual gerou leituras de PE de 150 bp. As leituras de sequências das bibliotecas RRBS tratadas com bissulfito foram identificadas usando o software padrão de chamada de base Illumina (Illumina, EUA) e, em seguida, os arquivos FASTQ brutos foram alinhados e foi feita a remoção de adaptadores e cortes de baixa qualidade utilizando o software TrimGalore 0.6.4 (Krueger, 2019). FastQC 0.11.9 (Andrews, 2019) foi utilizado para avaliar o efeito do corte e das distribuições de qualidade geral dos dados. O alinhamento com o genoma de referência (*Bos taurus* – ARS-UCD1.2) foi realizado usando o software Bismark 0.22.3 (Krueger; Andrews, 2011). Os totais de leituras de citosinas metiladas e não metiladas foram chamados usando a ferramenta MethylDackel 0.5.0 (<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>).

2.4 Identificação e caracterização de regiões e genes diferencialmente metilados

As métricas de metilação foram analisadas por meio da utilização da ferramenta MethylDackel. Ela agrupa todas as citosinas em um dos três contextos de sequência: CpG, CHG e CHH. Onde, H é o código de ambiguidade IUPAC para qualquer nucleotídeo diferente de G. Para encontrar bases diferencialmente metiladas entre DC e DP foi utilizada a função `calculateDiffMeth` do pacote `MethylKit` 1.24.0 (Akalın et al., 2012) do ambiente estatístico R (R Core Team, 2018) no repositório Biocondutor 29 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methylKit.html>). Primeiro, todas as citosinas foram filtradas para cobertura mínima de três leituras e percentil máximo de 99,9%. A função `methylKit` que normaliza a cobertura foi aplicada usando configurações padrões. Na sequência, a identificação das regiões diferencialmente metiladas (differentially methylated regions – DMR) foi realizada utilizando a abordagem de janelas deslizantes. A janela foi definida com 1000 pb e o tamanho do passo foi de 500 pb. O teste exato de Fisher foi implementado para calcular os valores de p. Uma determinada região foi definida como DMR quando apresentou pelo menos 20% de diferença de metilação, o valor de p corrigido (q-value) foi menor que 0,05 e a cobertura de sequências maior do que 10 vezes em todas as amostras. As

representações gráficas das DMRs foram geradas utilizando a função `plotTargetAnnotation` do pacote `MethylKit` no software R. Quando uma DMR e uma região do genoma contendo um gene específico se sobrepuseram, o gene correspondente foi definido como o gene relacionado a DMR, nomeadamente um gene diferencialmente metilado (DMG). O arquivo de anotação gênica utilizado (NCBI RefSeq) foi obtido do UCSC Genome Browser. O nível de metilação do DNA foi investigado em cinco diferentes regiões do genoma, incluindo promotores, TSS, corpo gênico (éxon e íntron) e região intergênica, usando abordagem de janela deslizante.

A análise de enriquecimento de processos biológicos Gene Ontology (GO-BP) e vias metabólicas (KEGG) foi realizada pelo aplicativo de software `EnrichR` (Chen et al., 2013), levando em consideração os genes diferencialmente metilados (DMGs) e que também foram diferencialmente expressos (DEGs), obtidos a partir da análise de expressão gênica diferencial (Pedro, 2023). Termos GO e KEGG com valores de p inferiores a 0,01 e valores de q inferiores a 0,1 foram considerados significativamente enriquecidos.

2.5 Relação entre metilação e expressão gênica

Para investigar a relação entre DMGs e seus níveis de expressão, realizaram-se associações visuais e estatísticas entre a porcentagem de metilação e níveis de expressão gênica. De forma geral foram analisadas as posições e nível relativo de metilação (hiper ou hipometilado) de regiões genômicas em relação ao nível de expressão gênica (super ou subexpresso) nos quais estas DMR foram mapeadas. Posteriormente, foi analisada a correlação entre nível de expressão gênica dado em LogFC dos DMGs e % de metilação das DMRs utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Por fim, uma curva de tendência foi ajustada por meio de uma regressão linear simples tendo como variável resposta o nível de expressão gênica dado em valor de logFC e como variável explanatória nível de metilação em % de todos os genes que foram DMRs e DMGs.

3 RESULTADOS

3.1 Sequenciamento de Bissulfito de Representação Reduzida

Uma média de 30 milhões de leituras foram geradas para as amostras do DP e 28 milhões para o grupo DC. Após controle de qualidade e remoção de adaptadores, a quantidade bruta de leituras diminuiu cerca de 1,6% em ambos os grupos, o que

determinou o número de leituras limpas. A taxa média de mapeamento nos grupos DP e DC foram de 76,45% e 76,55%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Estatísticas descritivas do Sequenciamento de Bissulfito de Representação Reduzida (RRBS).

	Desmame precoce	Desmame convencional
Nº leituras brutas	30.703.133	28.494.972
Nº leituras limpas	30.194.010	28.023.825
Nº leituras alinhadas	23.084.052	21.452.788
Leituras alinhadas (%)	76,45%	76,55%

3.2 Padrões de metilação do DNA no músculo

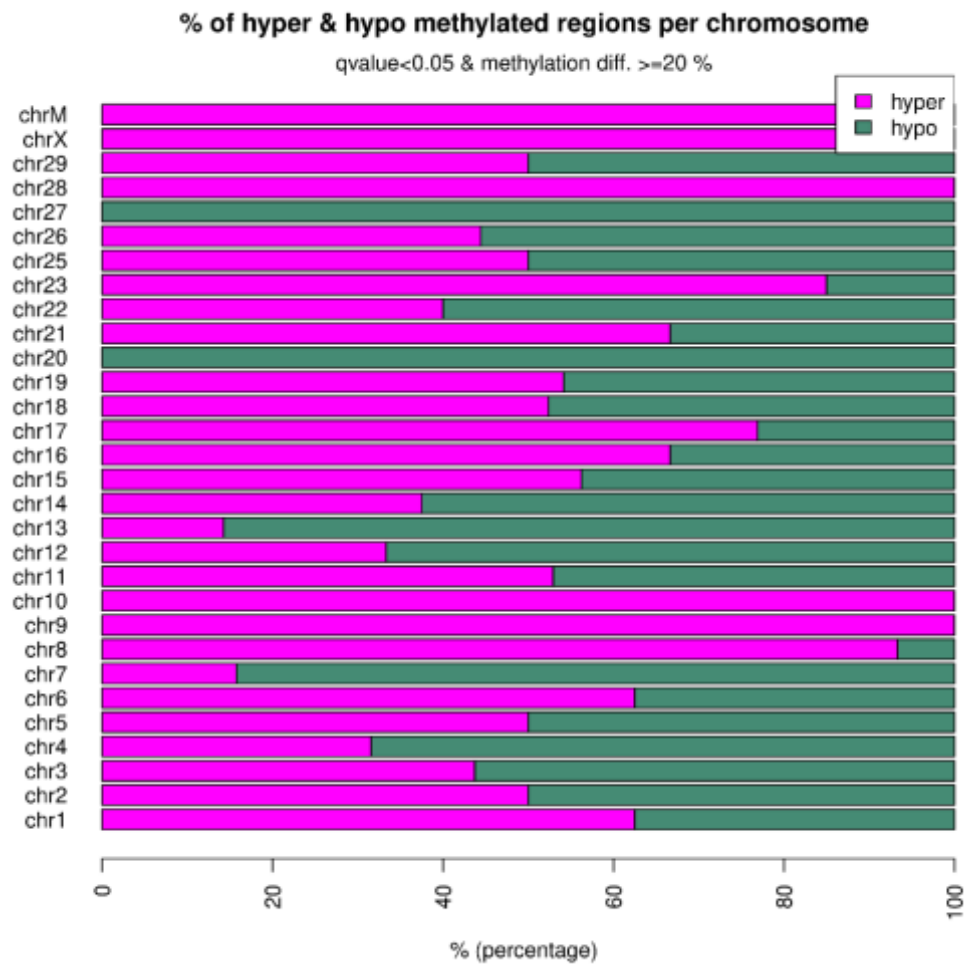
Observou-se uma média de 3,84% de mCpG, 0,54% de mCHG e 0,47% de mCHH no genoma de animais desmamados precocemente. Enquanto no grupo desmamado de forma convencional essas porcentagens foram de 3,79%, 0,51% e 0,44%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de CpG, CHG e CHH metilados no genoma dos animais desmamados de forma precoce e convencional.

	Desmame precoce	Desmame convencional
mCpG (%)	3,84%	3,79%
mCHG (%)	0,54%	0,51%
mCHH (%)	0,47%	0,44%

Foram encontradas 481 DMRs, mostrando diferenças de metilação entre os dois grupos de desmama aos 205 dias (valor $q < 0,05$ e diferença de metilação $> 20\%$). As DMRs apresentaram metilação diferencial equilibrada na comparação entre os grupos (DC vs. DP). Entretanto, um nível um pouco mais elevado de metilação foi observado nos animais desmamados precocemente, com cerca de 52% (250) de regiões hipermetiladas e 48% (231) de hipometiladas. A porcentagem de regiões hiper e hipometiladas por cromossomo estão descritas na Figura 1.

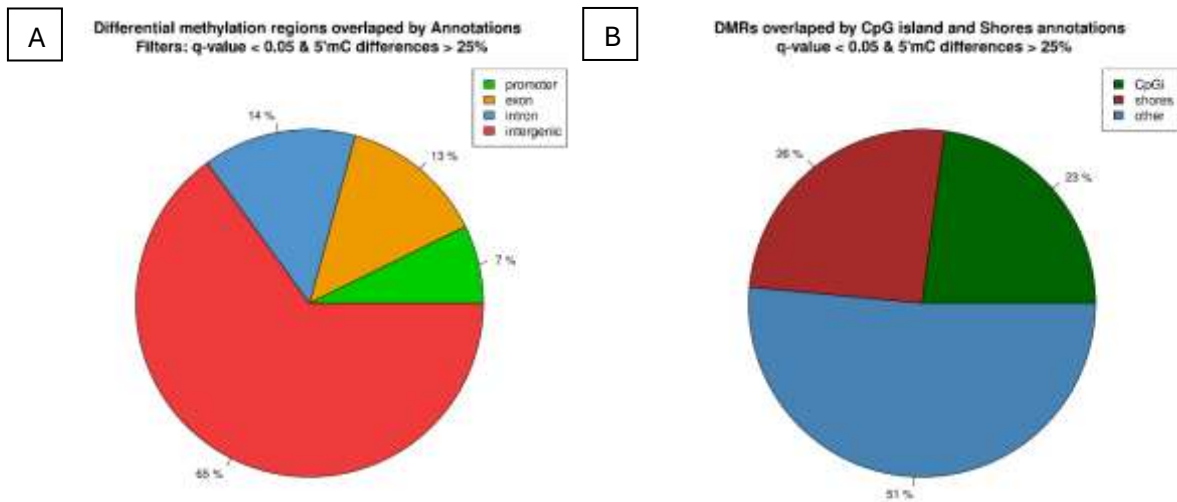
Figura 1. Porcentagem de DMRs hiper e hipometiladas por cromossomo.



3.3 Distribuição no genoma de regiões diferencialmente metiladas

Em relação a localização funcional, as DMRs estiveram mais presentes em regiões intergênicas (65%), seguidas pelos íntrons (14%), éxons (13%) e regiões promotoras (7%) (Figura 2A). Cerca de 23% das DMRs estavam em ilhas CpG, enquanto 26% estiveram presentes nas margens (Figura 2B).

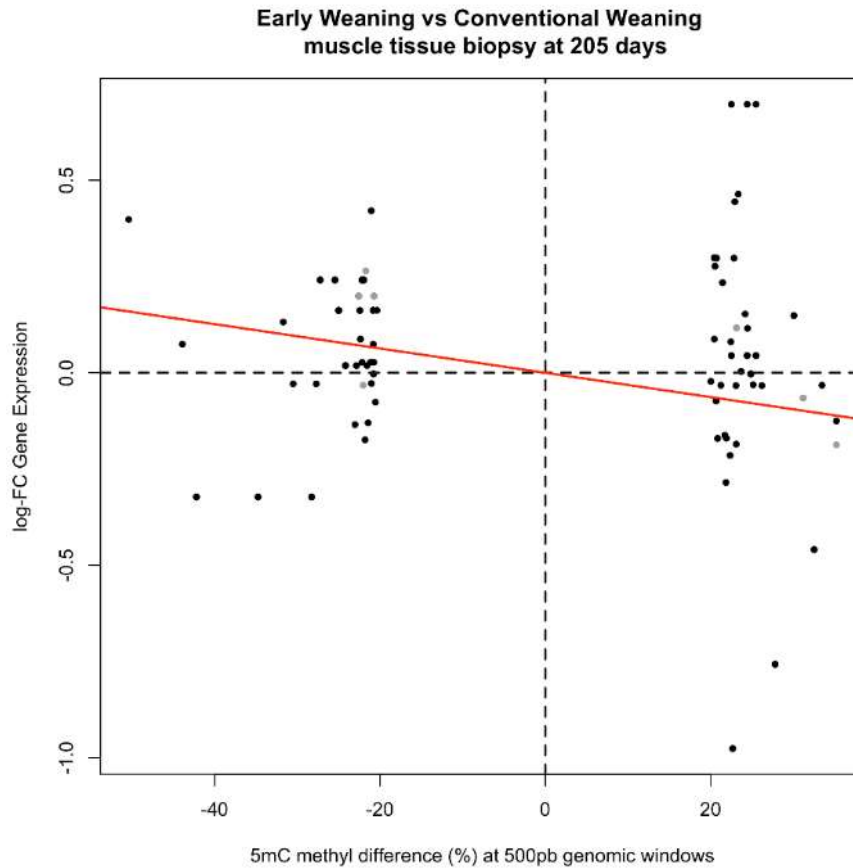
Figura 2. Proporção de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) sobrepondo regiões intergênicas, de corpo gênico (éxon e íntron) e regiões promotoras (A). (B) mostra a proporção sobre ilhas CpG (CpGi), margens e outros.



3.4 Relação entre metilação e expressão gênica

Um gráfico de dispersão foi elaborado para demonstrar a relação entre níveis de metilação e de expressão gênica dos DMGs encontrados (Gráfico 1). Notou-se que houve uma correlação negativa e baixa entre as informações (estimativa: -0,00316; p valor: 0,00020). Vinte e dois genes tiveram altos níveis de metilação e foram regulados negativamente: *COX1*, *ATP6*, *ADCY5*, *ABCA3*, *AKT1*, *MAP2K6*, *EHD1*, *TNS1*, *COL11A2*, *PDE4A*, *CPT1A*, *TJAP1*, *F2*, *WDR1*, *TSPAN32*, *ADCY5*, *DYRK1B*, *PPARD*, *XPC*, *RBFOX1*, *ARID3B* e *RECQL5*. Em contrapartida, doze genes *GMDS*, *ARHGEF10L*, *MACROD1*, *SSPO*, *STUB1*, *ITGB5*, *ADCY3*, *ARID3B*, *NFIC*, *ZNF557*, *TECR* e *SULF2* foram hipometilados e regulados positivamente. Vinte e dois genes apresentaram correlação positiva, sendo que apenas cinco apresentaram níveis de metilação e expressão negativos, são eles: *SSPO*, *STUB1*, *ITGB5*, *EHMT1*, *ARID3B*. Por outro lado, 17 genes apresentaram metilação e expressão positiva, sendo eles: *GMDS*, *ARHGEF10L*, *CTSH*, *MACROD1*, *MSI2*, *SSPO*, *EHMT1*, *ITGB5*, *ZNF557*, *SORCS3*, *NFIC*, *FGR*, *SULF2*, *MRPL28*, *ADCY3*, *WSCD1*, *RECQL5*.

Gráfico 1. Gráfico de dispersão com porcentagem de metilação e nível de expressão gênica dos grupos DP vs DC aos 205 dias. Pontos cinzas indicam regiões promotoras.



3.5 Genes diferencialmente metilados e análise de enriquecimento funcional

No total, 172 DMRs foram encontradas sobrepostas a genes, algumas em mais de uma janela e em localizações funcionais diferentes. Do total, 80 destas DMRs foram hipermetiladas no grupo DP, enquanto as outras 92 foram hipometiladas. Estas DMRs se sobrepuseram a 53 genes diferentes, os quais foram classificados como genes diferencialmente metilados (DMGs). Em relação a localização funcional, 16 DMRs estiveram em promotores gênicos, enquanto outras três estiveram presentes em sítios de início de transcrição (TSS) (Tabela 4).

Tabela 4. DMRs localizadas em regiões promotoras e/ou TSS.

DMG	Description	LocChr	Start	End	DMR.pvalue	Meth.diff	Category
<i>ADCY3</i>	adenylate cyclase 3	chr11	74335201	74335700	2,83E-24	-20,7252	TSSes
<i>ADCY3</i>		chr11	74335301	74335800	1,92E-24	-22,5866	TSSes

<i>ADCY3</i>		chr11	74335201	74335700	2,83E-24	-20,7252	promoters
<i>ADCY3</i>		chr11	74335301	74335800	1,92E-24	-22,5866	promoters
<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1	chr21	69246101	69246600	3,72E-15	31,18985	promoters
<i>ATP6</i>	mitochondrially encoded ATP synthase 6	chrM	6201	6700	5,75E-23	35,20596	promoters
<i>COX1</i>	cytochrome c oxidase subunit I	chrM	6201	6700	5,75E-23	35,20596	promoters
<i>F2</i>	coagulation factor II, thrombin	chr15	76656801	76657300	2,77E-06	21,88917	promoters
<i>F2</i>		chr15	76656801	76657300	2,77E-06	21,88917	TSSes
<i>MAP2K1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 1	chr10	13275401	13275900	5,80E-05	23,12619	promoters
<i>MAP2K1</i>		chr10	13275201	13275700	5,80E-05	23,12619	promoters
<i>MAP2K1</i>		chr10	13275301	13275800	5,80E-05	23,12619	promoters
<i>MRPL28</i>	mitochondrial ribosomal protein L28	chr25	363101	363600	0,000182	-20,7854	promoters
<i>RUVBL1</i>	RuvB like AAA ATPase 1	chr22	59508001	59508500	2,67E-08	-22,0339	promoters
<i>STUB1</i>		chr25	585001	585500	1,74E-05	-25	promoters
<i>STUB1</i>	STIP1 homology and U-box containing protein 1	chr25	584901	585400	1,74E-05	-25	promoters
<i>STUB1</i>		chr25	584801	585300	0,000112	-22,4395	promoters
<i>STUB1</i>		chr25	585101	585600	1,74E-05	-25	promoters
<i>ZNF557</i>	zinc finger protein 557	chr7	15991901	15992400	2,77E-08	-21,7254	promoters

A partir da análise de enriquecimento funcional que considerou os 53 DMGs/DEGs entre os dois grupos (DP e DC), foram destacados os 10 principais processos biológicos (GO_BP) e as 10 principais vias metabólicas (KEGG) (Figura 3 e Tabela 5) com as seguintes relações: os genes *CTSH* e *ABCA3* pertencem ao processo biológico homeostase do surfactante (GO: 0043129); *ADCY5* e *ADCY3* pertencem aos processos biológicos processo metabólico de cAMP (GO:0046058), de resposta celular à forskolina (GO:1904322), de resposta à forskolina (GO:1904321) e processo biossintético de cAMP (GO:0006171); *F2*, *AKT1* e *STUB1* pertencem ao processo biológico de regulação da proteólise (GO:0030162); *ABCA3* e *CTSH* pertencem ao processo biológico da homeostase química dentro de um tecido (GO:0048875); *DYRK1B*, *AKT1* e *MAP2K1* pertencem ao processo biológico de

fosforilação de peptidil-treonina (GO: 0018107); *COL11A2*, *SULF2* e *DYRK1B* pertencem ao processo biológico de desenvolvimento do tecido conjuntivo (GO:0061448); *F2*, *AKT1* e *PPARD* pertencem ao processo biológico de regulação positiva do processo metabólico lipídico (GO:0045834). Em relação às vias metabólicas (KEGG): os genes *MAP2K1*, *ADCY3*, *ADCY5* e *AKT1* são membros da via maturação de ovócitos mediada por progesterona; os genes *AKT1*, *ADCY3*, *ADCY5*, *F2* e *MAP2K1* são membros da via de sinalização da fosfolipase D; *ADCY3*, *ADCY5*, *MAP2K1* e *PDE4A* são membros da via de síntese, secreção e ação do hormônio da paratireóide; *PGF*, *AKT1*, *ITGB5*, *TNXB* e *MAP2K1* são membros da via de adesão focal; *ADCY3*, *MAP2K6*, *ADCY5*, *PGF*, *MAP2K1* e *AKT1* são membros da via de sinalização Rap1; *ADCY3*, *AKT1*, *ADCY5* e *EHMT1* são membros da via reguladora da longevidade; *MAP2K1*, *FGR*, *ADCY3*, *AKT1* e *ADCY5* são membros da via de sinalização de quimiocinas; *MAP2K1*, *ADCY3*, *ADCY5*, *MAP2K6* e *AKT1* são membros da via de síntese, secreção e ação do hormônio do crescimento; *MAP2K1*, *ADCY3*, *MAP2K6* e *ADCY5* são membros da via de sinalização do GnRH; por fim os genes *MAP2K1*, *PGF*, *ADCY3*, *AKT1*, *ADCY5*, *F2*, *PPARD* e *HEYL* são membros da via câncer.

Figura 3. Resultado da análise de enriquecimento funcional GO_BP e KEGG para os 53 genes diferencialmente expressos e metilados entre os animais dos

grupos DP e DC. O comprimento da barra é proporcional ao nível de significância, ou seja, quanto maior a barra mais significativa é a via.

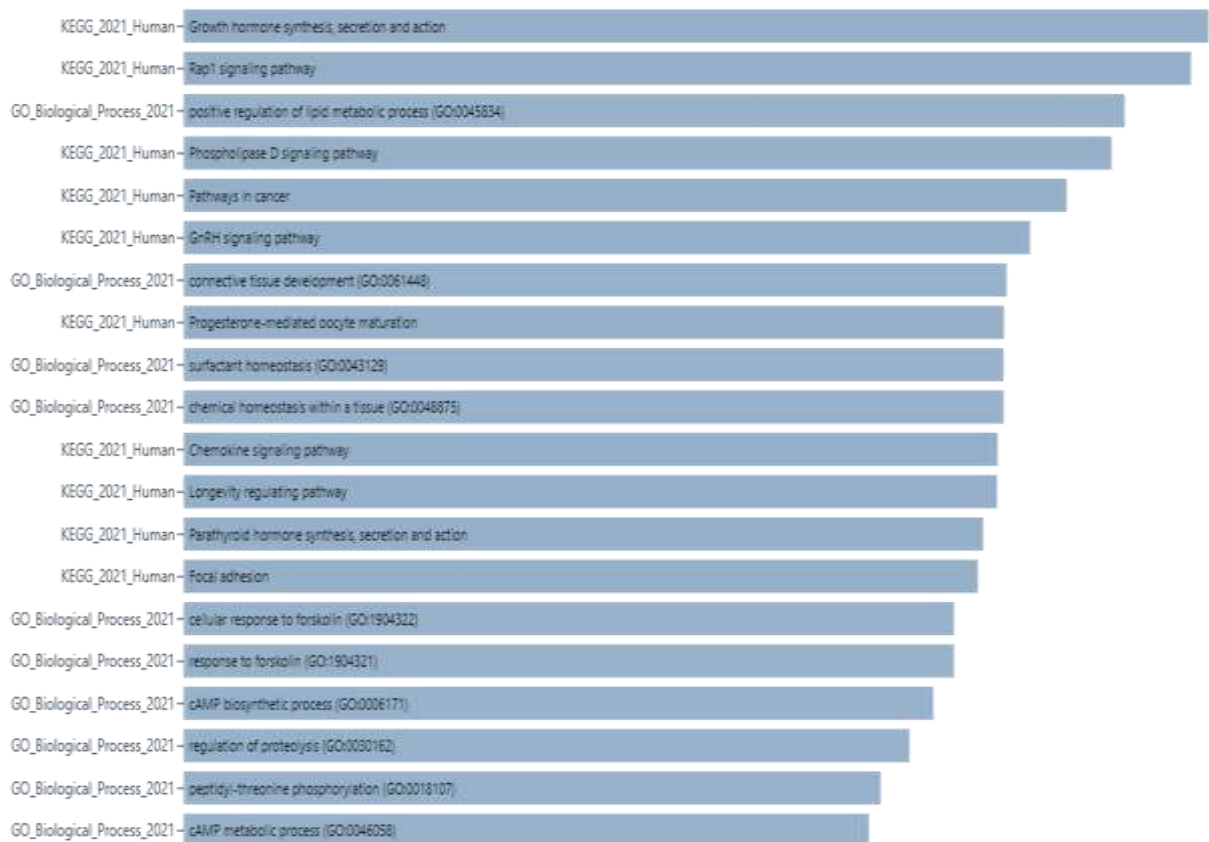


Tabela 5. Termos GO_BP e vias KEGG enriquecidos para os 53 genes diferencialmente expressos e metilados com p-valor e q-valor.

Termo	Library	p-value	q-value	Genes
Growth hormone synthesis, secretion and action	KEGG_2021_Human	0,00001	0,00162	<i>MAP2K1, ADCY3, ADCY5, MAP2K6, AKT1</i>
Rap1 signaling pathway	KEGG_2021_Human	0,00001	0,00162	<i>ADCY3, MAP2K6, ADCY5, PGF, MAP2K1, AKT1</i>
Positive regulation of lipid metabolic process (GO:0045834)	GO_Biological_Process_2021	0,00003	0,02894	<i>F2, AKT1, PPARD</i>
Phospholipase D signaling pathway	KEGG_2021_Human	0,00004	0,00254	<i>AKT1, ADCY3, ADCY5, F2, MAP2K1</i>
Pathways in cancer	KEGG_2021_Human	0,00007	0,00310	<i>MAP2K1, PGF, ADCY3, AKT1, ADCY5, F2, PPARD, HEYL</i>

GnRH signaling pathway	KEGG_2021_Human	0,00010	0,00323	<i>MAP2K1, ADCY3, MAP2K6, ADCY5</i>
Connective tissue development (GO:0061448)	GO_Biological_Process_2021	0,00013	0,70289	<i>COL11A2, SULF2, DYRK1B</i>
Progesterone-mediated oocyte maturation	KEGG_2021_Human	0,00014	0,00323	<i>MAP2K1, ADCY3, ADCY5, AKT1</i>
Surfactant homeostasis (GO:0043129)	GO_Biological_Process_2021	0,00014	0,02894	<i>CTSH, ABCA3</i>
Chemical homeostasis within a tissue (GO:0048875)	GO_Biological_Process_2021	0,00014	0,02894	<i>ABCA3, CTSH</i>
Chemokine signaling pathway	KEGG_2021_Human	0,00015	0,00323	<i>MAP2K1, FGR, ADCY3, AKT1, ADCY5</i>
Longevity regulating pathway	KEGG_2021_Human	0,00015	0,00323	<i>ADCY3, AKT1, ADCY5, EHMT1</i>
Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	KEGG_2021_Human	0,00017	0,00323	<i>ADCY3, ADCY5, MAP2K1, PDE4A</i>
Focal adhesion	KEGG_2021_Human	0,00018	0,00323	<i>PGF, AKT1, ITGB5, TNXB, MAP2K1</i>
Cellular response to forskolin (GO:1904322)	GO_Biological_Process_2021	0,00024	0,03297	<i>ADCY3, ADCY5</i>
Response to forskolin (GO:1904321)	GO_Biological_Process_2021	0,00024	0,03297	<i>ADCY3, ADCY5</i>
cAMP biosynthetic process (GO:0006171)	GO_Biological_Process_2021	0,00030	0,03526	<i>ADCY3, ADCY5</i>
Regulation of proteolysis (GO:0030162)	GO_Biological_Process_2021	0,00039	0,03996	<i>F2, AKT1, STUB1</i>
Peptidyl-threonine phosphorylation (GO:0018107)	GO_Biological_Process_2021	0,00054	0,04846	<i>DYRK1B, AKT1, MAP2K1</i>
cAMP metabolic process (GO:0046058)	GO_Biological_Process_2021	0,00061	0,04958	<i>ADCY3, ADCY5</i>

4 DISCUSSÃO

Segundo Scheffler et al. (2014), o desmame precoce de bezerros seguido de uma dieta rica em concentrado resulta em maior deposição de gordura na carcaça devido às modificações nos padrões de metilação do DNA e de expressão gênica e sugere, assim, que eventos de impressão metabólica pós-natal precoce podem ser explorados como uma ferramenta de manejo para melhorar o valor e qualidade da carne por meio do aumento do marmoreio. Três possibilidades poderiam explicar este aumento na pontuação da gordura intramuscular. Primeiro, o aumento da proliferação de pré-adipócitos durante o *imprinting* estabelece uma população maior de pré

adipócitos (Gorocica-Buenfil et al., 2007). Em segundo, o *imprinting* faz com que uma população aumentada de células-tronco mesenquimais se comprometa com um destino adipogênico (Tang e Lane, 2012; Uezumi et al., 2010). Terceiro, os bezerros podem ser programados metabolicamente para responder de forma mais agressiva aos sinais hormonais ou para serem mais eficientes na extração de precursores e na conversão em gordura (Long et al., 2012; Volpato et al., 2012). Dietas ricas em concentrado e à base de amido contribuem para concentrações elevadas de propionato ruminal e insulina sérica (Schoonmaker et al., 2004). Dos ácidos graxos voláteis absorvidos para obter energia, o propionato é o principal precursor gliconeogênico. Ao contrário da gordura subcutânea, a incorporação de glicose em ácidos graxos na gordura intramuscular é sensível à insulina (Gilbert et al., 2003; Rhoades et al., 2007). Assim, é possível que o aumento nos substratos gliconeogênicos da fermentação ruminal e o aumento da concentração de insulina em resposta à glicose circulante permitam maior captação celular e utilização da glicose para deposição de gordura nos adipócitos intramusculares proliferados pelo *imprinting*, aumentando o marmoreio durante a fase de crescimento (Scheffler et al., 2014).

Como explicado anteriormente, o epigenoma é vulnerável a fatores nutricionais. Entre eles, estão os chamados modificadores epigenéticos, tal como a metionina, colina, folato e vitamina B12, que são importantes doadores de metil e/ou cofatores nas reações de metilação do DNA (Crouse et al., 2022). O fato de os animais desmamados precocemente apresentarem neste estudo nível mais elevado de metilação no genoma pode ter sido ocasionado pela maior ingestão de nutrientes doadores de metil que estiveram presentes nas rações. A baixa variação de metilação entre os grupos pode ser explicada pelo alto perfil de metilação conservado em bovinos (Mckay et al., 2018), além de serem animais do mesmo rebanho que estiveram sob as mesmas condições de manejo do nascimento até os 120 dias de idade.

4.1 Principais genes diferencialmente metilados e expressos e vias relacionadas à adipogênese e lipogênese

Processos como a lipogênese e a adipogênese podem desempenhar um papel crucial no marmoreio, uma característica importante que contribui na determinação da qualidade da carne (Galhardo et al., 2020). Os mecanismos que controlam a

adipogênese no músculo esquelético são regulados em grande parte pelos fatores de transcrição pertencentes à família C/EBP (*Enhancer binding protein*) e PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) (Dodson et al. 2010; Fernyhough et al. 2007), constituindo proteínas cruciais que controlam desde o comprometimento de células-tronco multipotentes até a diferenciação em adipócitos. O gene *PPARD* (receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma), que codifica um membro da família do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), mostrou-se hipermetilado e regulado negativamente nos animais desmamados precocemente. Os processos enriquecidos por esse gene foram o de regulação positiva do processo metabólico lipídico e via câncer. Dentre os membros da família PPAR, é o gene mais difícil de ser analisado funcionalmente devido à diversidade de tecidos em que se expressa, na determinação do destino celular, metabolismo energético e atividades básicas (Attianese e Desvergne, 2015). Segundo Attianese e Desvergne (2015), a expressão de *PPARD* no músculo é aumentada pelo exercício, resultando no aumento da capacidade oxidativa (queima de gordura) e no aumento de fibras do tipo I. Segundo Pedro et al. (2023), é possível que a regulação negativa do *PPARD* reduza a competição por nutrientes destinados às vias de deposição de gordura e músculo na carcaça em animais desmamados precocemente que recebem dieta rica em grãos.

O gene da adenilato ciclase 3 (*ADCY3*) está envolvido na regulação de vários processos metabólicos, incluindo o desenvolvimento e função do tecido adiposo (GONI et al., 2018). A análise funcional mostrou que esse gene, juntamente com *ADCY5* participaram da maioria dos processos biológicos e vias metabólicas. Dentre os processos estão os relacionadas a cAMP (adenosina monofosfato cíclico): processo metabólico de cAMP (GO:0046058) e processo biossintético de cAMP (GO:0006171). Esses genes codificam uma enzima chamada adenilato ciclase (AC), que converte o ATP (trifosfato de adenosina) em cAMP, que é um segundo mensageiro utilizado para transdução de sinal intracelular. Este mensageiro está envolvido em muitos processos metabólicos fisiológicos, incluindo a regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios, e o desenvolvimento e função do tecido adiposo, regulando a expressão de genes envolvidos na adipogênese (Wu et al., 2016; Rogne e Taskén, 2014). As vias de sinalização do cAMP estão entre os mecanismos mais bem caracterizados que controlam a diferenciação dos adipócitos. Um aumento precoce

nos níveis de cAMP pré-adipócitos estimula a proteína quinase A, que por sua vez fosforila e ativa a proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP (CREB) do fator de transcrição do zíper de leucina básico nuclear e membros da família ATF (ZHANG et al., 2004; FOX et al., 2006). Esses ativadores transcricionais têm sido associados à indução de reguladores críticos da adipogênese, incluindo receptor- γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ) e proteína de ligação ao intensificador/CCAAT (C/EBP) α e β (Fox et al., 2006; Niehof et al., 1997; Birsoy et al., 2008). No presente estudo, o gene *ADCY3* foi hipometilado e sobre expresso nos animais desmamados precocemente, isso pode ser justificado pela influência do consumo de concentrado após o desmame, uma vez que a catalisação e conversão de ATP em cAMP, um cofator importante na homeostase energética é realizado por esse gene (Abdel-Halim et al., 2020). O acúmulo de cAMP ativa a proteína quinase A (PKA) em adipócitos, fosforilando diversas proteínas como a proteína de ligação ao elemento responsivo (CREB), a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e a lipase sensível a hormônio (HSL). O fósforo-CREB ativa então a expressão do coativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α), que induz a transcrição de genes termogênicos a jusante, incluindo a proteína desacopladora 1 (UCP1) (Cao et al., 2004; Yin, Mu e Birnbaum, 2003; Djouder et al, 2010). Paralelamente, a AMPK fosforilada inibe a diferenciação de pré-adipócitos através da regulação negativa do PPAR γ e C/EBP α , que são os reguladores centrais da adipogênese e do armazenamento lipídico nos adipócitos (Habinowski e Witters, 2001).

Por outro lado, o gene *ADCY5* se mostrou hipermetilado e subexpresso. Segundo Ho et al. (2015), a deficiência de AC5 tem sido sugerida para proteger contra doenças metabólicas. Dommel et al. (2021) estudou camundongos com deleção de *ADCY5*, onde foi possível observar que não desenvolveram obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina, além de haver melhora da função cardíaca e aumento da longevidade, o que pode explicar o enriquecimento da via de regulação da longevidade no presente estudo.

O gene *AKT* fornece instruções para a produção de uma proteína chamada AKT1 quinase. Esta proteína é encontrada em vários tipos de células em todo o corpo, onde desempenha um papel crítico em muitas vias de sinalização. AKT1 é uma das

três serina/treonina-proteína quinases intimamente relacionadas (AKT1, AKT2 e AKT3) que regulam muitos processos, incluindo metabolismo, proliferação, sobrevivência celular, crescimento e angiogênese (Pacini e Cantara, 2016). O processo de aumento do tamanho das fibras musculares (hipertrofia) é fortemente regulado pela proteína quinase B (AKT) (Kostusiak et al., 2023). AKT também é responsável pela regulação da captação de glicose, mediando a translocação induzida pela insulina do transportador de glicose para a superfície celular (Pacini e Cantara, 2016). Dentre os vários transportadores de glicose, denominados GLUT, o transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) é conhecido por ter sua regulação dependente de estímulos mediados pela insulina e encontra-se predominantemente nos tecidos adiposo e muscular. Nesses locais, a fosforilação da AKT é um passo chave para a translocação do GLUT4 do compartimento intracelular para a membrana plasmática (Machado, Schaan, Seraphim, 2006; Wei et al., 2006). A análise funcional do gene *AKT1* revelou vários processos e vias em que ele se relaciona, dentre eles a regulação positiva do processo metabólico lipídico, regulação da proteólise e via de sinalização da fosfolipase D. É relatado que a sinalização de AKT previne a degradação de SREBP1 (proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol) e, assim, promove a síntese lipídica de novo. SREBP1 pertence a uma família de fatores de transcrição (Yokoyama et al. 1993) e é um importante regulador transcricional de genes envolvidos na síntese e metabolismo lipídico, entre eles a sintase de ácidos graxos (FASN) e ATP-citrato liase (ACLY) (Li et al., 2011; Shimano e Sato, 2017). Curiosamente, o gene *AKT1* apresentou hipermetilação e foi subexpresso, sugerindo que também houve diminuição da SREBP1, o que conseqüentemente pode reduzir a biossíntese de gordura ao diminuir a expressão gênica e a atividade de enzimas-chave (Obsen et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

Notou-se que animais desmamados aos 120 dias de idade e que receberam dieta rica em concentrado apresentaram nível de metilação mais elevado no genoma, e a análise funcional sugere que as vias de sinalização de cAMP e processo metabólico lipídico estão entre os principais processos relacionados a adipogênese e lipogênese no tecido muscular. Também foi encontrado que diferenças no nível de metilação modulou a expressão de genes como *AKT1*, *PPARD* e *ADCY3*, tornando

esses genes potenciais candidatos envolvidos com a deposição de gordura na carne. Há uma necessidade de mais investigação para identificar os fatores dietéticos que têm maior influência sobre as marcas epigenéticas e desenvolver uma compreensão dos mecanismos pelas quais estas ocorrem.

REFERÊNCIAS

Abdel-Halim SM, Al Madhoun A, Nizam R, Melhem M, Cherian P, Al-Khairi I, ... & Al Mulla F (2020) Increased plasma levels of adenylate cyclase 8 and cAMP are associated with obesity and type 2 diabetes: Results from a cross-sectional study. **Biology**, 9(9), 244.

Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, Mason CE (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. **Genome biology**, 13(10), 1-9.

Almeida LSPD, Lobato JFP (2004) Efeito da idade de desmame e suplementação no desenvolvimento de novilhas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33, 2086-2094.

Andrade PL, Bressan MC, Gama LTD, Gonçalves TDM, Ladeira MM, Ramos EM (2010) Qualidade da carne maturada de bovinos Red Norte e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39, 1791-1800.

Andrews S (2019) FastQC: a quality control analysis tool for high throughput sequencing data.

Attianese GMG, Desvergne B (2015) Integrative and systemic approaches for evaluating PPAR β/δ (PPARD) function. **Nuclear receptor signaling**, 13(1), nrs 13001.

Balieiro CDC, Aspectos genéticos e fenotípicos de características produtivas, temperamento e repelência em bovinos da raça Nelore. Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal—Pirassununga: Universidade de São Paulo, 14 mar. 2008.

Beef Report 2022 – ABIEC (2022) Disponível em: Acesso em: 14 ago. 2023

Beretta V, Lobato JFP, Mielitz Netto CG (2002) Produtividade e eficiência biológica de sistemas de produção de gado de corte de ciclo completo no Rio Grande de Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31, 991-1001.

Birsoy K, Chen Z, Friedman J (2008) Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. **Cell metabolism**, 7(4), 339-347.

Browning Jr R, Leite-Browning ML, Neuendorff DA, Randel RD (1995) Prewaning growth of Angus - (*Bos taurus*), Brahman - (*Bos indicus*), and Tuli - (Sanga) sired calves and reproductive performance of their Brahman dams. **Journal of Animal Science**, 73(9), 2558-2563.

Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, ... & Collins S (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. **Molecular and cellular biology**, 24(7), 3057-3067.

Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, ... & Ma'ayan A (2013) Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC bioinformatics**, 14(1), 1-14.

Cho YC, Jefcoate CR (2004) PPAR γ 1 synthesis and adipogenesis in C3H10T1/2 cells depends on S-phase progression but does not require mitotic clonal expansion. **Journal of cellular biochemistry**, 91(2), 336-353.

Crouse MS, Caton JS, Claycombe-Larson KJ, Diniz WJ, Lindholm-Perry AK, Reynolds LP, ... & Ward AK (2022) Epigenetic modifier supplementation improves mitochondrial respiration and growth rates and alters DNA methylation of bovine embryonic fibroblast cells cultured in divergent energy supply. **Frontiers in Genetics**, 13, 812764.

Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. **Molecular and cellular biology**, 22(9), 3157-3173.

De Assis JR, De Assis ACM, Fernandes GA, Olini LMG, Da Conceição VHT, Mousquer CJ, ... & Costa FM (2021) Nutrigenômica sobre a deposição de gordura na carne de ruminantes.

De Assis JR, De Assis ACM, Gallardo WB (2020) NUTRIGENÔMICA APLICADA AO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E MARMOREIO NA CARNE DE RUMINANTES. **BIOFARM - Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, 16(2), 196-214.

De Menezes LFG, Restle J, Pascoal LL, Brondani IL, Rosa JRP, Pizzuti LA, Dalla Chieza E (2008) Fontes energéticas para suplementação de bezerros desmamados precocemente, mantidos em pastagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, SCHUM.). **Ciência Animal Brasileira**, 9(1), 30-42.

Djouder N, Tuerk RD, Suter M, Salvioni P, Thali RF, Scholz R, ... & Krek W (2010). PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis. **The EMBO journal**, 29(2), 469-481.

Dodson MV, Jiang Z, Chen J, Hausman GJ, Guan LL, Novakofski J, ... & Reecy JM (2010) Allied industry approaches to alter intramuscular fat content and composition in beef animals. **Journal of Food Science**, 75(1), R1-R8.

Dommel S, Hoffmann A, Berger C, Kern M, Klötting N, Kannt A, Blüher M (2021) Effects of whole-body Adenylyl Cyclase 5 (*Adcy5*) deficiency on systemic insulin sensitivity and adipose tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(9), 4353.

EMBRAPA - GADO DE CORTE (1995) Suplementação de bezerros de corte. n. 11

Feil R, Fraga MF (2012) Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature reviews genetics**, 13(2), 97-109.

Fernyhough ME, Okine E, Hausman G, Vierck JL, Dodson MV (2007) PPAR γ and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. **Domestic Animal Endocrinology**, 33(4), 367-378.

Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno JT, Klemm DJ (2006) Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α , C/EBP β , or PPAR γ 2. **Journal of Biological Chemistry**, 281(52), 40341- 40353.

Gasser CL, Behlke EJ, Grum DE, Day ML (2006) Effect of timing of feeding a high concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. **Journal of animal science**, 84(11), 3118-3122.

Gilbert CD, Lunt DK, Miller RK, Smith SB (2003) Carcass, sensory, and adipose tissue traits of Brangus steers fed casein-formaldehyde-protected starch and/or canola lipid. **Journal of Animal Science**, 81(10), 2457-2468.

Goni L, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Corrales FJ, Ortiz L, Cuervo M, Martínez JA (2018) Interaction between an ADCY3 genetic variant and two weight-lowering diets affecting body fatness and body composition outcomes depending on macronutrient distribution: a randomized trial. **Nutrients**, 10(6), 789.

Gorocica-Buenfil MA, Fluharty FL, Bohn T, Schwartz SJ, Loerch, SC (2007) Effect of low vitamin A diets with high-moisture or dry corn on marbling and adipose tissue fatty acid composition of beef steers. **Journal of animal science**, 85(12), 3355-3366.

Habinowski SA, & Witters LA (2001). The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, 286(5), 852-856.

Ho D, Zhao X, Yan L, Yuan C, Zong H, Vatner DE, ... & Vatner SF (2015). Adenylyl cyclase type 5 deficiency protects against diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, 64(7), 2636-2645.

Kostusiak P, Slószar J, Gołębiewski M, Grodkowski G, Puppel K (2023) Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality. **Current Issues in Molecular Biology**, 45(6), 4749-4762.

Krueger F, Andrews SR (2011) Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *bioinformatics*, 27(11), 1571-1572.

Krueger F (2019) FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.3 - add default decompression path. [s.l.] Zenodo.

Lee JE, Schmidt H, Lai B, Ge K (2019) Transcriptional and epigenomic regulation of adipogenesis. **Molecular and cellular biology**, 39(11), e00601-18.

Li YU et al. (2011) AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. **Cell metabolism**, 13(4), 376-388.

Long NM, Tousley CB, Underwood KR, Paisley SI, Means WJ, Hess BW, ... & Ford SP (2012) Effects of early-to mid-gestational undernutrition with or without protein supplementation on offspring growth, carcass characteristics, and adipocyte size in beef cattle. **Journal of animal science**, 90(1), 197-206.

Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM (2006). Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 50, 177-189.

Mckay JA, Mathers JC (2011) Diet induced epigenetic changes and their implications for health: Nutrition, epigenetics and health. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 2, p. 103-118.

McKay S et al. (2018) 115 Profiling conservation of DNA methylation in cattle. **Journal of Animal Science**, 96(suppl_3), 370-370.

Mentch SJ, Locasale JW (2016) One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1363(1), 91-98.

Niciura SCM, Saraiva NZ (2015) Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e a vegetal. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.

Niehof M, Manns MP, Trautwein C (1997) Creb controls LAP/C/EBP beta transcription. **Molecular and cellular biology**.

Obsen T, Faergeman NJ, Chung S, Martinez K, Govern S, Loreau O, ... & McIntosh M (2012) Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases de novo lipid synthesis in human adipocytes. **The Journal of nutritional biochemistry**, 23(6), 580-590.

Ostrom KF, LaVigne JE, Brust TF, Seifert R, Dessauer CW, Watts VJ, Ostrom RS (2022) Physiological roles of mammalian transmembrane adenylyl cyclase isoforms. **Physiological reviews**, 102(2), 815-857.

Pacini F, Cantara S (2016) Molecular Diagnosis of Thyroid Cancer. Em: **Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders**. [s.l.] Elsevier, p. 153–162.

Pedro AE (2023) Efeito da desmama precoce suplementada com concentrado sobre a expressão gênica do *Longissimus thoracis* em bezerros da raça nelore.

Pedro AE. et al. (2023) Early Weaning Possibly Increases the Activity of Lipogenic and Adipogenic Pathways in Intramuscular Adipose Tissue of Nellore Calves. **Metabolites**, v. 13, n. 9, p. 1028.

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

Restle J, Vaz RZ, Alves Filho DC, Bernardes RADLC, Pascoal LL, Senna DBD, Polli VA (2001) Desempenho de vacas Charolês e Nelore desterнейradas aos três ou sete meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30, 499-507.

Rhoades RD, Sawyer JE, Ponce CH, Lunt DK, Smith SB (2009) Substrate utilization and dose response to insulin by subcutaneous adipose tissue of Angus steers fed corn or hay-based diets. **Journal of animal science**, 87(7), 2338-2345.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) “edgeR: a Bioconductor package for differential analysis of digital gene expression data.” **Bioinformatics**, 26(1), 139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.

Rogne M, Taskén K (2014) Compartmentalization of cAMP Signaling in Adipogenesis, Lipogenesis, and Lipolysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 46, n. 12, p. 833-840.

Rodrigues RTDS, Chizzotti ML, Vital CE, Baracat-Pereira MC, Barros E, Busato KC, ... & Martins TDS (2017) Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nelore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. **PloS one**, 12(1), e0170294.

Scheffler JM, McCann MA, Greiner SP, Jiang H, Hanigan MD, Bridges GA, ... & Gerrard DE (2014) Early metabolic imprinting events increase marbling scores in fed cattle. **Journal of animal science**, 92(1), 320-324.

Schoonmaker JP, Fluharty FL, Loerch SC (2004) Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on adipocyte cellularity and lipogenic enzyme activity in the intramuscular and subcutaneous fat depots of Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 1, p. 137–148.

Shimano H, Sato R (2017) SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology — divergent pathophysiology. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 12, p. 710-730.

Silva A, Souza Filho ED, Cunha SD (2008) Padrões de canal do rio Paraguai na região de Cáceres (MT). **Revista Brasileira de Geociências**, 38(1), 167-177.

Silveira LGG, Piona MNM, Mousquer CJ, Gomes RS, Silveira AC (2021) Sistemas de cria em áreas tropicais: desmama precoce. Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 15(1), 1-14.

Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 715–736.

Teixeira PD, Oliveira DM, Chizzotti ML, Chalfun-Junior A, Coelho TC, Gionbelli M, ... & 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.

Thomson JM (2016) Impacts of environment on gene expression and epigenetic modification in grazing animals. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. suppl_6, p. 63-73.

Uezumi A, Fukada SI, Yamamoto N, Takeda SI, & Tsuchida K (2010) Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. **Nature cell biology**, 12(2), 143-152.

Veland N, Chen T (2017) Mechanisms of DNA Methylation and Demethylation During Mammalian Development. Em: **Handbook of Epigenetics**. [s.l.] Elsevier. p. 11–24.

Vendramini JMB, Sollenberger LE, Dubeux Jr JCB, Interrante SM, Stewart Jr RL, & Arthington JD (2006). Concentrate supplementation effects on forage characteristics and performance of early weaned calves grazing rye–ryegrass pastures. **Crop science**, 46(4), 1595-1600.

Volpato AM, Schultz A, Magalhães-da-Costa E, Correia MLDG, Águila MB, Mandarim de-Lacerda CA (2012) Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. **Neuroendocrinology**, 96(4), 272-284.

Wei Y, Sowers JR, Nistala R, Gong H, Uptergrove GME, Clark SE, Stump CS (2006). Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, 281(46), 35137-35146.

Wu L, Shen C, Seed Ahmed M, Östenson CG, Gu HF (2016) Adenylate cyclase 3: a new target for anti-obesity drug development. **Obesity reviews**, 17(9), 907-914.

Yar MK, Jaspal MH, Ali S, Ijaz M, Badar IH, Hussain J (2022) Carcass characteristics and prediction of individual cuts and boneless yield of *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls differing in age. **Livestock Science**, 264, 105041.

Yin W, Mu J, & Birnbaum MJ (2003). Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, 278(44), 43074-43080.

Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, ... & Brown MS (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. **Cell**, 75(1), 187-197.

Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD (2004) Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein β gene during adipogenesis. **Journal of biological chemistry**, 279(6), 4471-4478.

Zhang N (2015) Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 144–151.