UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

Influência do ácido guanidinoacético no desempenho e no transcriptôma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore em confinamento

Iasmin Myrele Santos Calaça de Farias

Zootecnista, Mestre

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE JABOTICABAL

Influência do ácido guanidinoacético no desempenho e no transcriptôma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore em confinamento

Discente: Iasmin Myrele Santos Calaça de Farias
Orientador: Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto
Coorientadora: Dra. Juliana Akamine Torrecilhas

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

2025

F224i

Farias, Iasmin Myrele Santos Calaça de

Influência do ácido guanidinoacético no desempenho e no transcriptôma do músculo Longissimus thoracis de bovinos Nelore em confinamento / Iasmin Myrele Santos Calaça de Farias. -- Jaboticabal, 2025

65 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Otávio Rodrigues Machado Neto

Coorientadora: Juliana Akamine Torrecilhas

1. Creatina. 2. Desempenho produtivo. 3. Eficiência alimentar. 4. RNA. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DO ÁCIDO GUANIDINOACÉTICO NO DESEMPENHO E NO TRANSCRIPTÔMA DO MÚSCULO *Longissimus thoracis* DE BOVINOS NELORE EM CONFINAMENTO

AUTORA: IASMIN MYRELE SANTOS CALAÇA DE FARIAS

ORIENTADOR: OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO

COORIENTADORA: JULIANA AKAMINE TORRECILHAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciência Animal, área: Nutrição Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Assoc. OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO (Participaçao Virtual)
Departamento de Producao Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
gov.br
OTAVIO RODRIGUES MACHADO NETO
Data: 04/09/2025 11:29:40-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

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

Documento assinado digitalmente
gov.br
GERMAN DARIO RAMIREZ ZAMUDIO
Data: 04/09/2025 12:01:43-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Pós-Doutorando SÉRGIO ANTONIO GARCIA PEREIRA JUNIOR (Participaçao Virtual)
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - São Carlos/SP

Documento assinado digitalmente
gov.br
SERGIO ANTONIO GARCIA PEREIRA JUNIOR
Data: 04/09/2025 14:54:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO (Participaçao Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutricao Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
gov.br
LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO
Data: 04/09/2025 16:06:19-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. WELDER ANGELO BALDASSINI (Participaçao Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutricao Animal / FMVZ Unesp Botucatu

Documento assinado digitalmente
gov.br
WELDER ANGELO BALDASSINI
Data: 04/09/2025 16:21:10-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Jaboticabal, 04 de setembro de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Iasmin Myrele Santos Calaça de Farias, natural de Maceió, estado de Alagoas, nasceu em 09 de maio de 1995. Concluiu o Ensino Médio entre os anos de 2010 e 2013 no Instituto Federal de Alagoas – Campus Satuba, onde também finalizou o curso técnico em Agropecuária. Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Alagoas – Campus Maceió em 2014, tendo concluído a graduação em 2019, período no qual desenvolveu atividades na área de nutrição de pequenos ruminantes. No mesmo ano, iniciou o mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus Botucatu, com término em 2021, desenvolvendo pesquisas voltadas à qualidade de carne de cordeiros. Em 2021, ingressou no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus Jaboticabal, sob orientação do Professor Doutor Otávio Rodrigues Machado Neto, realizando atividades na área de nutrição de bovinos confinados. Durante o doutorado, participou do Programa de Doutorado Sanduíche, com atividades desenvolvidas na University of Montana e na Virginia Tech (Virginia Polytechnic Institute and State University), nos Estados Unidos, durante o período de um ano.

Corte&costura

Meu pai algumas noites alinhava alguns pesadelos
medonhos

Costurada meus sonhos... eu voltava a dormir em seus
cerzidos contos de fadas.

Bento Calaça

Dedico este trabalho aos meus pais, que foram meus maiores incentivadores; ao meu esposo, que nunca mediu esforços para me ajudar e apoiar; e aos meus irmãos, que sempre estiveram presente na minha vida.

Dedico também a todas as mulheres batalhadoras que fazem parte da minha vida, aquelas que, de alguma forma, me curam, me apoiam, me incentivam sem rivalidade ou disputa. Em especial, dedico às mulheres que atuam na mesma área de trabalho que eu, que diariamente precisam provar sua capacidade, sem margem para erros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por segurar minha mão nos momentos de dificuldade;

Ao meu esposo Lucas, por ser meu porto seguro, minha calmaria e por me apoiar sem medida;

Ao meu pai, Bento Calaça, meu maior incentivador, mentor, amigo e tudo que eu poderia ter de um pai (*in memorian*);

À minha mãe, Joana D'arc, por colocar doçura na minha vida e sempre me trazer leveza aos dias difíceis;

Aos meus irmãos, Mylena e João, por estarem comigo em todos os momentos e por me presentearem com a benção de ser tia de dois grandes amores: Gabriela e Bento;

À minha filha, Morgana, que ainda se encontra no forninho, mas que já mudou tanto minha visão de mundo e, sem saber, me dá força para seguir;

A todos os meus amigos, seria impossível menciona todos aqui, pois Deus me presentou com tantas pessoas especiais. Mas, em especial, agradeço ao Pedro, Flabiele, Hozane, Irene, Carolina, Jessica, Aline, Janaina;

Ao meu orientador, Otávio, por acreditar em mim, pelos ensinamentos e pela paciência;

À minha coorientadora, Juliana, por todo o apoio, amizade e dedicação a tudo que faz;

Ao Sérgio Pereira, por toda a paciência e pelos ensinamentos na análise de transcriptoma;

A todos os colegas e estagiários que me ajudaram durante o experimento;

Aos funcionários do confinamento e da fábrica de ração, que realizaram seu trabalho com entusiasmo e dedicação;

A todos que contribuíram para este trabalho e para minha evolução profissional e pessoal. Em especial, aos Prof. Dr. Welder e Chardulo, por todo ensinamento até aqui;

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

Meu muito obrigada!

Sumário

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais 1

Introdução 1

Revisão de literatura 2

Metabolismo da creatina 2

Ácido guanidinoacético como precursor da creatina 3

Ácido guanidinoacético sobre o desempenho animal e expressão gênica 5

Considerações finais 7

Referências bibliográficas 7

CAPÍTULO 2 - Influência do ácido guanidinoacético no desempenho e no transcriptôma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore em confinamento 15

Resumo 15

Introdução 16

Material e métodos 17

Consumo de matéria seca e desempenho produtivo 19

Características de carcaça 20

Extração do RNA e preparo das bibliotecas 20

Análise bioinformática 21

Análise estatística 22

Resultados 23

Desempenho e consumo de matéria seca 23

Caractéristas de carcaça 24

Perfil do transcriptoma 24

Discussão 30

Desempenho e características de carcaça 30

Perfil do transcriptoma 32

Conclusão 41

Referências bibliográficas 41

Influência do ácido guanidinoacético no desempenho e no transcriptôma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore em confinamento

Resumo

O ácido guanidinoacético (GAA) é eficientemente transformado em creatina no fígado, a creatina é uma importante molécula do metabolismo energético, que contribui para o aporte de fosfocreatina e consequentemente de ATP. Além disso, o GAA parece ter uma biodisponibilidade maior que a creatina, provavelmente devido a várias interações do GAA com transportadores celulares, como o transportador de taurina (SLC6A6), de ácido Y-aminobutírico (SLC6A13) e transportador de creatina (SLC6A8). Os estudos demonstram que o GAA pode melhorar o desempenho dos animais, aumentando a concentração de creatina, ATP e creatina quinase muscular e plasmático e podendo influenciar a expressão dos genes relacionados ao metabolismo energético. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito do GAA sobre o desempenho animal, características de carcaça e expressão de gênica no transcriptona de touros Nelore (*Bos tauros indicus)* em confinamento.

Palavras-chave: creatina, desempenho produtivo, eficiência alimentar, RNA.

Influence of Guanidinoacetic Acid on Performance and the Transcriptome of *Longissimus thoracis* Muscle in Feedlot Nellore Cattle

Abstract

Guanidinoacetic acid (GAA) is efficiently converted into creatine in the liver. Creatine is an important molecule in energy metabolism, contributing to the supply of phosphocreatine and consequently ATP. In addition, GAA appears to have higher bioavailability than creatine, likely due to various interactions between GAA and cellular transporters, such as the taurine transporter (SLC6A6), the gamma-aminobutyric acid transporter (SLC6A13), and the creatine transporter (SLC6A8). Studies show that GAA can improve animal performance by increasing creatine, ATP, and both muscular and plasma creatine kinase concentrations, and it may also alter gene expression. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effect of GAA on animal performance, carcass traits, and gene expression in the transcriptome of feedlot Nellore (*Bos taurus indicus*) bulls.

Keywords: creatine, productive performance, feed efficiency, RNA.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

Introdução

O ácido guanidinoacético é o precursor imediato da creatina, ele é sintetizado nos rins e no pâncreas por enzimas que transferem grupo amidino da arginina para a glicina. No fígado, o ácido guanidinoacético é metilado e transformado em creatina (OSTOJIC, 2015), em seguida, a creatina entra na corrente sanguínea e é transportada para as células e tecidos para fornecer energia (LI et al., 2018). No músculo, a enzima creatina quinase faz a transferência do grupo fosfato de ATP para o grupo guanidino da creatina para produzir ADP e fosfocreatina (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000) e o fosfato da creatina servirá como fonte de energia para os tecidos com alta demanda energética (BROSNAN; BROSNAN, 2010). Em comparação com a cretina suplementar, o ácido guanidinoacético é mais vantajoso na nutrição animal, por apresentar maior estabilidade térmica, maior biodisponibilidade e menor custo (BAKER, 2009). Portanto, o ácido guanidinoacético pode ser mais eficaz em aumentar a concentração de creatina nos tecidos, em comparação com a suplementação de creatina (McBREAIRTY et al., 2015; OSTOJIC; DRID; OSTOJIC, 2016). Uma vez que foi observado um aumento no nível de creatina plasmática quando o GAA foi ofertado aos animais (ARDALAN et al., 2020; ARDALAN; BATISTA; TITGEMEYER, 2020; LI et al., 2020; LIU et al., 2020; GRANT; MIESNER; TITGEMEYER, 2021)

Estudos demostraram que a suplementação de ácido guanidinoacético (GAA) melhorou o desempenho, a eficiência alimentar (EF) e digestibilidade dos nutrientes em touros (LI et al., 2020), também aumentou a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen, a população microbiana total (LIU et al., 2021), e a expressão de genes no metabolismo da síntese de proteínas (LIU et al., 2020). Entretanto, esses estudos foram realizados com animais *Bos taurus taurus*, poucos estudos testaram a eficácia do GAA em dietas para animais *Bos taurus indicus*. Os animais zebuínos são predominante nos rebanhos bovinos brasileiro, devido a sua resistência ao clima e habilidade de se adaptarem a pastagem (MALHEIROS et al., 2020). Segundo Young et al. (2005), a resposta do animal a suplementação de creatina, pode ser variável de acordo com a raça, e sendo classificada como responsivos, não responsivos e quase responsivos a creatina dietética. Além disso, nos estudos com *Bos taurus*, os autores utilizaram uma dieta rica em fibras, enquanto no presente estudo avaliamos os efeitos do GAA em uma dieta com elevado teor de carboidratos, típica de confinamento.

Hipotetizamos que o GAA pode contribuir para o suprimento de creatina muscular, e modular a expressão de genes importantes para o desenvolvimento animal. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do ácido guanidinoacético sobre o desempenho animal e expressão de gênica no transcriptoma do músculo *Longissimus thoracis* de touros Nelore (*Bos tauros indicus)* em confinamento.

Revisão de literatura

Metabolismo da creatina

A creatina, ou ácido α-metilguanidina acético, é um composto natural de nitrogênio essencial para o metabolismo energético do músculo esquelético e do cérebro (ZHANG et al., 2017). Aproximadamente 95% da creatina do corpo é armazenada nos músculos esqueléticos, enquanto os 5% restantes estão distribuídos entre o cérebro, fígado, testículos e rins (DEMINICE et al., 2009). No músculo, a creatina é armazenada na forma de fosfocreatina (PCr), que fornece energia imediata para a síntese de ATP através da desfosforilação. A PCr transporta moléculas de alta energia da mitocôndria para os filamentos de miosina e age como uma reserva de fosfato para regenerar ATP a partir de ADP (WALKER, 1960). A creatina é convertida em fosfocreatina pela enzima creatina quinase (CK) e essa reação ocorre no sarcoplasma (GOMIDE; RAMOS; FONTE, 2013). Cerca de 17% da creatina é excretada diariamente na forma de creatinina pela urina (WYSS, KADDURAH-DAOUK, 2000), para que os níveis corporais de creatina sejam mantidos de maneira equilibrada, a ingestão dietética e a biossíntese endógena são necessárias (WYSS, SCHULZE, 2002).

A síntese endógena de creatina ocorre em duas etapas principais: Na primeira, a L-arginina amidinotransferase (AGAT) transfere um grupo amidino da arginina para a glicina, formando guanidinoacetato e L-ornitina, com a reação ocorrendo principalmente no pâncreas e nos rins. Na segunda etapa, a guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) no fígado transfere um grupo metila da S-adenosil-metionina para o guanidinoacetato, produzindo creatina e S-adenosil-homocisteína. Esta última é reciclada para S-adenosil-metionina com a ajuda de ácido fólico e vitamina B12 (WALKER, 1979; BROSNAN; BROSNAN, 2007; BROSNAN; SILVA; BROSNAN, 2011; OVIEDO-RONDON; CÓRDOVA-NOBOA, 2020). Nesse processo até 40% dos grupos metila da S-adenosil-metionina podem ser consumidos. A creatina formada é então liberada na corrente sanguínea e absorvida por tecidos que expressam o transportador da creatina (SLC6A8),

dependente de sódio e cloreto (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000; SNOW; MURPHY, 2001). Dentro das células, a creatina é fosforilada pela creatina quinase (CK) para formar fosfocreatina (PCr), e o equilíbrio entre PCr/Cr e ATP/ADP é mantido pelas isoformas citosólicas e mitocondriais de CK, enquanto a creatina livre retorna às mitocôndrias, completando o ciclo (SCHLATTNER et al., 2006; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000).

A suplementação com creatina aumentou a massa corporal em humanos (BAKER et al., 2016; BACKX et al., 2017; WANG et al., 2018; WU et al., 2022) e melhorou a atividade muscular e a recuperação, mesmo sem treinamento físico (WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000; GOTSHALK et al., 2008; DEL FAVERO et al., 2012). Em camundongos com distrofia muscular mdx, a creatina reduziu a necrose muscular, melhorou a respiração mitocondrial e reduziu o estresse induzido por altas concentrações de [Ca2+] ao aumentar os níveis de fosfocreatina (PULIDO et al., 1998; PASSAQUIN et al., 2002). Ao adicionar creatina ao meio de diferenciação de células C2C12, houve indução à hipertrofia dos miotubos enquanto o diâmetro dos miotubos aumentou em 40%, além de elevar a concentração de proteína muscular (LOUIS et al., 2003).

Em suínos, a creatina suplementar elevou as concentrações de creatina, ATP e ADP no músculo *Longissimus thoracis* e aumentou a expressão de GAMT e do transportador de creatina no músculo, fígado e rins (LI et al., 2015; LI et al., 2018). No entanto, essa resposta variou entre raças: suínos Duroc foram mais responsivos do que os Landrace (YOUNG et al., 2005). Em estudos com miotubos de suínos Duroc e Landrace, a síntese de proteína foi aumentada em ambas as raças, mas os níveis plasmáticos de IGF-I e a expressão de IGF-I foram menores em Landrace (YOUNG et al., 2007).

Como a creatina é um ingrediente compartilhado na dieta humana, seu custo pode ser elevado e alternativas, como o ácido guanidinoacético (GAA), têm sido pesquisadas. Os estudos começaram em 1930 e ganharam destaque quando Beard e Barnes (1931), demonstraram que 1g de GAA aumentava os níveis de creatina muscular em camundongos em 48,5% após 24 horas. Em outro estudo, o GAA foi mais eficiente em elevar as concentrações de creatina hepática e muscular do que a creatina dietética (MCBREAIRTY et al., 2015).

Ácido guanidinoacético como precursor da creatina

O ácido guanidinoacético ou N - [aminoiminometil] - glicina (fórmula química: $C_3H_7N_3O_2$), pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como alfa aminoácidos

e é o precursor primário da creatina (OSTOJIC, 2016). Como mencionado anteriormente, o ácido guanidinoacético é sintetizado na primeira reação na síntese da creatina, quando catalisada pela enzima AGAT, um grupo amidino é transferido da arginina para o grupo amino da glicina formando o guanidinoacetato e L-ornitina (WALKER, 1979). Em comparação com a creatina, o ácido guanidinoacético (GAA) tem maior biodisponibilidade e estabilidade química (BAKER, 2009), e por isso, está bem estabelecido como uma fonte de creatina para a fabricação de ração para monogástricos (OVIEDO-RONDON; CÓRDOVA-NOBOA, 2020). O uso de GAA como uma fonte de creatina está classificado na Europa, como membro do grupo funcional de aminoácidos, sais e análogos (EFSA, 2009, 2016), bem como nos Estados Unidos (FDA 21 CFR § 573.496). Além de ser um precursor imediato da creatina, o GAA também pode ter várias funções metabólicas que não estão relacionadas à creatina, incluindo possível estimulação da liberação hormonal e neuromodulação, alteração da utilização metabólica de aminoácidos, vasodilatação e sintonia oxidante-antioxidante (OSTOJIC, 2015).

Para avaliar a estabilidade térmica do GAA e da creatina monoidratada (CrM), concentrações de ambas as moléculas foram recuperadas em uma ração com adição de 1,5 g/kg de GAA e 1,5 g/kg de CrM, submetidas a processos de extrusão simulados em diferentes temperaturas (100; 130; 160 e 190° C), em dois estágios diferentes de produção (Amostra 1: adição do GAA e CrM antes do processamento; Amostra 2: adição de GAA e CrM diretamente após extrusão) e dois tipos de processamento (Amostra 3: extrusão após tratamento pneumático; Amostra 4: extrusão após o processo de secagem e resfriamento). A porcentagem recuperada de CrM variou, em 130° C as amostras 2, 3 e 4 foram 87, 87 e 55%, respectivamente recuperadas, em 160° C as mesmas amostras foram 90, 92 e 53%, respectivamente recuperadas e em 190° C as amostras supracitadas foram 87, 89, e 56%, respectivamente recuperadas, a amostra 1 com CrM foi recuperada em 100% independente do tratamento. Enquanto a porcentagem de GAA, independente do tratamento térmico, estágio de produção e tipo de processamento, foi 100% recuperada (KHAJALI; LEMME; HEILSHORN, 2020).

Com relação a biodisponibilidade, o GAA foi 3,3 vezes superior em aumentar a bioenergética no músculo esquelético e cérebro em humanos, que a própria creatina suplementar (OSTOJIC et al., 2016), provavelmente devido a maior captação de GAA pelos tecidos alvos por meio de várias interações com transportadores celulares, como o transportador de taurina (SLC6A6), de ácido Y-aminobutírico (SLC6A13) e transportador de creatina (SLC6A8), a creatina por sua vez, conta com um transportador

específico (SLC6A8) que poderia limitar seu transporte pela célula em comparação ao GAA (OSTOJIC, 2022). Talvez essa seja uma explicação para os resultados encontrados no estudo de McBreairty et al. (2015), que testaram a adição de GAA ou creatina na dieta de suínos, e observaram que apesar dos animais tratados com creatina, apresentarem aumento da creatina plasmática, os animais que receberam GAA tiveram concentrações de creatina hepáticas e musculares mais elevadas que os animais tratados com creatina.

Para a síntese de GAA há a utilização dos aminoácidos arginina e glicina. Entretanto, quando ofertamos o GAA na dieta, pode haver um efeito poupador de arginina, isso porque, quando o GAA é de origem exogena, a primeira etapa da síntese de creatina é dispensada, de modo que a arginina endógena pode ser melhor utilizada para síntese proteica e para outras funções fisiológicas (DILGER et al., 2013; PORTOCARERO; BRAUN, 2021). Nos mamíferos, a arginina participa de múltiplas funções como síntese de ornitina, poliaminas, prolina, óxido nítrico, citrulina, glutamato e agmatina (WU; MORRIS, 1998), também é considerada um potente secretagogo de insulina, hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) (NEWSHOLME; BRENNAN; RUBI, 2005).

Ácido guanidinoacético sobre o desempenho animal e expressão gênica

O GAA tem sido amplamente estudado em monogástricos, mas o interesse em sua aplicação para ruminantes surgiu apenas nos últimos anos. A maioria dos estudos tem se concentrado na investigação do desempenho animal, com resultados promissores quando o GAA é incluído na dieta. No entanto, as explicações para esses mecanismos ainda não foram totalmente exploradas, e algumas respostas podem ajudar a esclarecer melhor seu funcionamento no metabolismo muscular. A adição de GAA na dieta de touros melhorou a fermentação ruminal, aumentou a concentração total AGCC e promoveu uma resposta positiva da população microbiana e da atividade enzimática, além de melhorar a digestibilidade dos nutrientes e a EF (LI et al., 2020; LIU et al., 2020; REN et al., 2022). De acordo com os autores, a suplementação com GAA melhora o desempenho dos animais devido ao aumento na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, fibra detergente neutro e ácido, além de aumentar as concentrações de AGCC e da síntese de proteína microbiana (LIU et al., 2020; LIU et al., 2021; LI et al., 2022; REN et al., 2022). O GAA também promoveu o crescimento de diversas populações bacterianas ruminais e estimulou a atividade de enzimas como celobiose, pectinase, protease, carboximetilcelulase e xilanase (LIU et al., 2021; LIU et al., 2022; LI et al.,

2020). Em novilhos Holstein, a adição de 15 g/dia de GAA, melhorou a retenção de nitrogênio e aumentou a concentração de creatina plasmática, superando os resultados do controle e do tratamento secundário com 16,8 g/dia de creatina (GRANT; MIESNER; TITGEMEYER, 2021). Além disso, foi observado que o GAA aumentou a concentração plasmática de IGF-I, creatina, proteína total, ATP e creatina quinase nos ruminantes (RENT et al., 2022; LI et al., 2022; ZHANG et al., 2022).

Touros Angus (433 ± 9,7 kg de peso vivo), alocados em tratamento com 0,6 g/kg de GAA, tiveram melhora na EF (0,13 kg/kg), em comparação aos animais do tratamento controle (0,11 kg/kg), que refletiu no ganho médio diário (GMD) (1,76 *vs.* 1,40 kg/d, para GAA e controle, respectivamente) e aos 60 dias de experimento, o peso final dos animais do tratamento GAA, foi superior (570 *vs.* 549 kg), sem diferença estatística para o consumo de matéria seca (CMS) (LIU et al., 2021). Esses resultados são consistentes com os observados em touros (LIU et al., 2020), em vacas em lactação (LIU et al., 2022) e em cordeiros (REN et al., 2022), onde também a EF e o GMD foram maiores quando o GAA foi fornecido na dieta dos animais, enquanto o CMS não foi influenciado. Em contraste, a oferta de níveis crescentes de GAA (0, 0,3, 0,6 e 0,9 g/kg de MS) para touros Angus com 391 ± 11,6 kg de peso vivo melhorou o GMD (1,48; 1,62; 1,87; 1,82 kg/d, respectivamente), o peso corporal aos 60 dias (496; 503; 515; 516 kg, respectivamente) e aos 90 dias (540; 552; 571; 570 kg, respectivamente). No entanto, não melhorou a EF e aumentou o CMS pelos animais (LI et al., 2020). Resultados semelhantes foram observados por Li et al. (2022) e Li et al. (2021).

Tais efeitos também se refletem na expressão de genes hepáticos (IGF-1, PI3K, Akt1, mTOR e P70S6K), envolvidos na síntese proteica aumentou quando os bovinos se alimentaram de uma dieta com a inclusão do GAA (LIU et al., 2020). Também foi sugerido que o GAA pode estimular a síntese de ácidos graxos (AG) no tecido muscular de ovelhas quando suplementadas com 0,75 ou 1 g/kg de GAA (JIN et al., 2024). Esse efeito foi evidenciado pelo aumento na expressão da acetil-CoA carboxilase (ACC), uma enzima limitante na taxa de síntese de AG de novo. Em contrate, 0,9 g/kg de GAA regulou negativamente a expressão de PPARy, CEBP, SREBP1C, genes importantes na adipogênese, o que reduziu a circunferencia da costela de cordeiros (ZHAO et al., 2023). De fato o GAA parece estar envolvido no metabolismo de lipídios, porém as informações sobre esse mecanismo ainda são escassas.

As variações no desempenho dos animais observadas nos estudos mencionados podem ser atribuídas a vários fatores. Primeiramente, o modo como o GAA foi ofertado, seja na forma de suplemento dietético, protegido ou diretamente no abomaso, esses fatores podem ter influenciado os resultados. Além disso, a dose específica de GAA adicionada à dieta dos animais desempenha um papel crucial, pois diferentes concentrações podem levar a respostas variadas. Por fim, o peso inicial dos animais também é um fator determinante, já que animais com pesos diferentes podem metabolizar de maneiras distintas. Portanto, essas variáveis combinadas podem explicar as diferenças nos resultados de desempenho observadas nos estudos analisados.

Considerações finais

Os estudos com GAA têm demonstrado seu potencial em melhorar o desempenho e o crescimento dos animais. No entanto, a maioria das pesquisas focadas no uso do GAA na produção animal tem se concentrado principalmente em monogástricos ou em ruminantes alimentados com dietas ricas em volumosos, nas quais o GAA parece promover o crescimento de bactérias celulolíticas. Ainda assim, existe uma necessidade significativa de aprofundar o conhecimento sobre o impacto do GAA em bovinos submetidos a diferentes tipos de dietas, explorando uma variedade de doses, possíveis efeitos adversos, além de avaliar seu efeito em diferentes raças e fases de desenvolvimento dos animais. Esses estudos futuros serão essenciais para otimizar o uso do GAA na produção animal, ampliando sua aplicação de forma segura e eficaz.

Referências bibliográficas

ARDALAN, M.; MIESNER, M. D.; REINHARDT, C. D.; THOMSON, D. U.; ARMENDARIZ, C. K.; TITGEMEYER, E. C. Effects of guanidinoacetic acid on lean growth and methionine flux in cattle. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**, v.6, p.1-5, 2020. https://doi.org/10.4148/2378-5977.7892

ARDALAN, M.; BATISTA, E.; TITGEMEYER, E. C. Effect of post-ruminal guanidinoacetic acid supplementation on creatine synthesis and plasma homocysteine concentrations in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 98, p.1-9, 2020. 10.1093/jas/skaa072

BACKX, E.M.P.; HANGELBROEK, R.; SNIJDERS, T.; VERSCHEIJDEN, M.L.; VERDIJK, L.B.; DE GROOT, L.; VAN LOON, L.J.C. Creatine loading does not preserve

muscle mass or strength during leg immobilization in healthy, young males: A randomized controlled trial. **Sports Medicine**, v.47, p.1661–1671, 2017. 10.1007/s40279-016-0670-2

BAKER, D. H. Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. **Amino Acids**, v. 37, p.29-41, 2009. 10.1007/s00726-008-0198-3

BAKER, T.P.; CANDOW, D.G.; FARTHING, J.P. Effect of preexercise creatine ingestion on muscle performance in healthy aging males. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v.30, p.1763–1766, 2016. 10.1519/JSC.0000000000001254

BEARD H. H., BARNES B. O. A influência de proteínas alimentares, aminoácidos e substâncias relacionadas sobre o metabolismo da creatina-creatinina. **J Biol Chem** v.94, p.49–69, 1931. cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19311402678

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Creatine metabolism and the urea cycle. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.100, p.s49-s52, 2010. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.02.020

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Creatine: Endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. **Annual Review of Nutrition**, v.27, p.241-261, 2007. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093621

BROSNAN, J. T.; SILVA, R. P.; BROSNAN, M. E. The metabolic burden of creatine synthesis. **Amino Acids**, v.40, p.1325-1331, 2011. 10.1007/s00726-011-0853-y

DEL FAVERO, S.; ROSCHEL, H.; ARTIOLI, G.; UGRINOWITSCH, C.; TRICOLI, V.; COSTA, A.; BARROSO, R.; NEGRELLI, A.L.; OTADUY, M.C.; DA COSTA LEITE, C.; LANCH-JUNIOR, A. H.; GULANO, B. Creatine but not betaine supplementation increases muscle phosphorylcreatine content and strength performance. **Amino Acids**, v.42, p.2299–2305, 2012. 10.1007/s00726-011-0972-5

DEMINICE, R.; PORTARI, G. V.; VANNUCCHI, H.; JORDAO, A. A. Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. **British Journal of Nutrition**, v.102, p.110-116, 2009. 10.1017/S0007114508162985

DILGER, R. N.; BRYANT-ANGEONI, K.; PAYNE, R. L.; LEMME, A.; PARSONS, C. M. Dietary guanidino acetic acid is an efficacious replacement for arginine for young chicks. **Poultry Science**, v.92, p.171-177, 2013. 10.3382 / ps.2012-02425

European Food Safety Authority (EFSA). Safety and efficiency of guanidino acetic acid as feed additive for chickens for fattening. **EFSA Journal**, v.988, p.1-30, 2009. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.988

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the safety and efficacy of guanidinoacetic acid for chickens for fattening, breeder hens and roosters, and pigs. **EFSA Journal**, v. 14, p.1-39, 2016. 10.2903/j.efsa.2016.4394

Food and Drug Administration (FDA US). **Code of Federal Regulations Title 21**, 2016. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=573.496. Acesso em: 11 jan 2024.GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, E. M.; FONTE, P. R. Ciência e qualidade da carne: fundamentos. **Viçosa, MG: Ed. UFV**, 197p. 2013.

GOTSHALK, L. A.; KRAEMER, W. J.; MENDONÇA, M. A. G.; VINGREN, J. L.; KENNY, A. M.; SPIERING, B. A.; HATFIELD, D. L.; FRAGALA, M. S.; VOLEK, J. S. Creatine supplementation improves muscular performance in olde woman. **European Journal of Applied Physiology**, v.102, p.223–231, 2008. https://doi.org/10.1007/s00421-007-0580-y

GRANT, M. S.; MIESNER, M. D.; TITGEMEYER, E. C. Effects of guanidinoacetic acid, creatine, and choline on protein deposition and creatine status in growing cattle. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**, v.7, p.1-4, 2021. https://doi.org/10.4148/2378-5977.8032

KHAJALI, F.; LEMME, A.; RADEMACHER-HEILSHORN, M. Guanidinoacetic acid as a feed supplement for poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.76, p.270-291, 2020. 10.1080/00439339.2020.1716651

JIN, H.; DU, Z.; FAN, X.; QIN, L.; LIU, W.; ZHANG, Y.; REN, J.; YE, C.; LIU, Q. Effect of Guanidinoacetic Acid on Production Performance, Serum Biochemistry, Meat Quality and Rumen Fermentation in Hu Sheep. Animals 2024, 14, 2052. https://doi.org/10.3390/ani14142052

LI, Z.; LIANG, H.; XIN, J.; XU, L.; LI, M.; YU, H.; ZHANG, W.; GE, Y.; LI, Y.; QU, M. Effects of dietary guanidinoacetic acid on the feed efficiency, blood measures, and meat quality of jinjiang bulls. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p.684295, 2021. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684295

LI, J.; ZHANG, L.; FU, Y.; LI, Y.; JIANG, Y.; ZHOU, G.; GAO, F. Creatine monohydrate and guanidinoacetic acid supplementation affects the growth performance, meat quality, and creatine metabolism of finishing pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p.9952-9959, 2018. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02534

LI, J.L.; GUO, Z. Y.; LI, Y. J.; ZHANG, L.; GAO, F.; ZHOU, G. H. Effect of creatine monohydrate supplementation on carcass traits, meat quality and postmortem energy metabolism of finishing pigs. **Animal Production Science,** v.56, p.48-54, 2015. https://doi.org/10.1071/AN14017

LI, S. Y.; WANG, C.; WU, Z. Z.; LIU, Q.; GUO, G.; HUO, W. J.; ZHANG, J.; CHEN, L.; ZHANG, Y. L.; PEI, C. X.; ZHANG, S. L. Effects of guanidinoacetic acid supplementation on growth performance nutrient digestion, rumen fermentation and blood metabolites in Angus bulls. **Animal**, v.14, p.2535-2543, 2020. https://doi.org/10.1017/S1751731120001603

LI, W. J.; WU, Q. C.; CUI, Z.Y.; JIANG, Y.W.; AISIKAER, A.; ZHANG, F.; CHEN, H. W.; WANG, W. K.; WANG, Y. L.; LV, L. K.; XIONG, F. L.; LIU, Y. Y.; LI, S. L.; YANG, H. J. Guanidine acetic acid exhibited greater growth performance in younger (13–30 kg) than in older (30–50 kg) lambs under high-concentrate feedlotting pattern. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 954675, 2022. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.954675

LIU, C.; WANG, C.; ZHANG, J.; LIU, Q.; GUO, G.; HUO, W. J.; PEI, C. X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. L. Guanidinoacetic acid and betaine supplementation have positive effects on growth performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Angus bulls. **Animal Feed Science and Technology**, v.276, p.114923, 2021. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114923

LIU, Y. J.; CHEN, J. Z.; WANG, D. H.; WU, M. J.; ZHENG, C. WU, Z. Z.; WANG, C.; LIU, Q. ZHANG, J.; GUO, G.; HUO, W. J. Effects of guanidinoacetic acid and coated folic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion and hepatic gene

expression in Angus bulls. **British Journal of Nutrition**, v.126, p.510-517, 2020. 10.1017/S0007114520004341

LIU, Y.; ZHANG, J.; WANG, C.; GUO, G.; HUO, W.; XIA, C.; CHEN, L.; ZHANG, Y.; PEI, C.; LIU, Q. Effects of guanidinoacetic acid supplementation on lactation performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 103, p. 1522-1529, 2022. https://doi.org/10.1002/jsfa.12249

LOUIS, M.; BENEDEN, R. V.; DEHOUX, M.; THISSEN, J. P.; FRANCAUX, M. Creatine increases IGF-I and myogenic regulatory fator mRNA in C_2C_{12} cells. **FEBS Letters**, v. 557, p. 243-247, 2003. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01504-7

MALHEIROS, J. M.; ENRIQUEZ-VALENCIA, C. E.; SILVA, J. A. V.; CURI, R. A.; OLIVEIRA, H. N.; ALBUQUERQUE, L. G.; CHARDULO, L. A. L. Carcass and meat quality of Nellore cattle (*Bos taurus indicus*) belonging to the breeding programs. **Livestock Science**, v. 242, p.1-7, 2020. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104277

McBREAIRTY, L. E.; ROBINSON, J. L.; FURLONG, K. R.; BRUNTON, J. A.; BERTOLO, R. F. Guanidinoacetate is more effective than creatine at enhancing tissue creatine stores while consequently limiting methionine availability in Yucatan miniature pigs. **PLoS One**, v.10, p.e0131563, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131563

NEWSHOLME, P.; BRENNAN, L.; RUBI, B. New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. **Clinical Science**, v.108, p.185-194, 2005. 10.1042/CS20040290

OSTOJIC, S. M. Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. **European Journal of Nutrition**, v.54, p.1211-1215, 2015. https://doi.org/10.1007/s00394-015-1050-7

OSTOJIC, S. M.; DRID, P.; OSTOJIC J. Guanidinoacetic acid increases skeletal muscle creatine stores in healthy men. **Nutrition**, v.32, p.723-724, 2016. https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.11.006

OSTOJIC, S. Safety of dietary guanidinoacetic acid: A villain of a good guy? **Nutrients**, v.14, 75, 2022. https://doi.org/10.3390/nu14010075

OSTOJIC, S. M. Guanidinoacetic acid as a performance-enhancing agent. **Amino Acids,** v.48, p.1867–1875, 2016. https://doi.org/10.1007/s00726-015-2106-y

OVIEDO-RONDON, E. O.; CÓRDOVA-NOBOA, H. A. The potential of guanidino acetic acid to reduce the occurrence and severity of broiler muscle myopathies. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1-13, 2020. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00909

PORTOCARERO, N.; BRAUN, U. The physiological role of guanidinoacetic acid and its relationship with arginine in broiler. **Poultry Science**, v.100, p.1-10, 2021. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101203

PASSAQUIN, A. C.; RENARD, M.; KAY, L.; CHALLET, C.; MOKHTARIAN, A. WALLIMANN, T.; RUEGG, U. T. Creatine supplementation reduces skeletal muscle degeneration and enhaces mitochondrial function in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. 174-182, 2002. https://doi.org/10.1016/S0960-8966(01)00273-5

PULIDO, S. M.; PASSAQUIN, A. C.; LEIJENDEKKER, W. J.; CHALLET, C.; WALLIMANN, T.; RUEGG, U. T. Creatine supplementation improves intracellular Ca^{2+} handling and survival in mdx skeletal muscle cells. **FEBS Lett**, v.439, p. 357-362, 1998. 10.1016/s0014-5793(98)01399-4

REN, G.; HAO, X.; ZHANG, X.; LIU, S.; ZHANG, J. Effects of guanidinoacetic acid and betaine on growth performance, energy and nitrogen metabolism, and rumen microbial protein synthesis in lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v.292, p. 115402, 2022. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115402

SCHLATTNER, U.; TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; WALLIMANN, T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1762, p.164-180, 2006. 10.1016/j.bbadis.2005.09.004

SNOW, R. J.; MURPHY, R. M. Creatine and the creatine transporter: A review. **Mol Cell Biochem**, v.224, p.169-181, 2001. 10.1023/a:1011908606819

WALKER, J. B. Metabolic control of creatine biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.235, p.2357-2361, 1960. PMID: 13842518

WALKER, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, function. **Advances in Enzymology and Related Areas Molecular Biology**, v.50, p.177-242, 1979. 10.1002/9780470122952.ch4

WANG, Y.; MA, J.; QIU, W.; ZHANG, J.; FENG, S.; ZHOU, X.; WANG, X.; JIN, L.; LONG, K.; LIU, L.; XIAO, W.; TANG, Q.; ZHU, L.; JIANG, Y.; LI, X.; LI, M. Guanidinoacetic acid regulates myogenic differentiation and muscle growth through miR-133a-3p and miR-1a-3p co-mediated Akt/mTOR/S6K signaling pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p.1-19, 2018. 10.3390/ijms19092837

WU, G.; MORRIS S. M. JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v.336, p.1-17, 1998. 10.1042/bj3360001

WU, S.-H.; CHEN, K.-L.; HSU, C.; CHEN, H.-C.; CHEN, J.-Y.; YU, S.-Y.; SHIU, Y.-J. Creatine supplementation for muscle growth: a scoping review of randomized clinical trials from 2012 to 2021. **Nutrients**, v.14, p.1255, 2022. https://doi.org/10.3390/nu14061255

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80, p.1107-1213, 2000. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107

WYSS, M.; SCHULZE, A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? **Neuroscience**, v.112, pp. 243-260, 2002. 10.1016/s0306-4522(02)00088-x

YOUNG, J. F.; BERTRAM, H. C.; ROSENVOLD, K.; LINDAHL, G.; OKSBJERG, N. Dietary creatine monohydrate affects quality atributes of Duroc but not Landrace pork. **Meat Science**, v.70, p.717-725, 2005. 10.1016/j.meatsci.2005.03.008

YOUNG, J. F.; BERTRAM, H. C.; THEIL, P. K.; PETERSEN, A. –G. D.; POULSEN, K. A.; RASMUSSEN, M.; MALMENDAL, A.; NIELSEN, N. C.; VESTERGAARD M.; OKSBJERG. *In vitro* and *in vivo* studies of creatine monohydrate supplementation to Duroc and Landrace pigs. **Meat Science**, v.76, p. 342-351, 2007. 10.1016/j.meatsci.2006.11.015

ZHANG, L.; WANG, X.; LI, J.; ZHU, X.; GAO, F.; ZHOU, G. Creatine monohydrate enhances energy status and reduces glycolysis via inhibition of AMPK pathway in pectoralis major muscle of transport-stressed broilers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, p.6991-6999, 2017. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02740

ZHANG J. H.; LI H. H.; ZHANG G. J.; ZHANG Y. H.; LIU B.; HUANG S.; GUYADER J.; ZHONG R. Z. Supplementation of guanidinoacetic acid and rumen-protected methionine increased growth performance and meat quality of Tan lambs. **Animal Bioscience**, v.35, p.1556-1565, 2022. https://doi.org/10.5713/ab.22.0008

ZHAO, J.-M.; LI, F.-Q.-Y.; LI, X.-Y.; JIAO, D.-R.; LIU, X.-D.; LV, X.-Y.; ZHAO, J.-X. Guanidinoacetic Acid Attenuates Adipogenesis through Regulation of miR-133a in Sheep. **Animals** 2023, 13, 3108. https://doi.org/10.3390/ani13193108

CAPÍTULO 2 - Influência do ácido guanidinoacético no desempenho e no transcriptôma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos Nelore em confinamento

Resumo

O ácido guanidinoacético (GAA) é eficientemente transformado em creatina no fígado e contribui com o aporte de creatina, ATP e fosfocreatina, assim, pode maximizar o desenvolvimento do tecido muscular e o desempenho animal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do ácido guanidinoacético no desempenho de bovinos Nelore (*Bos taurus indicus*) em confinamento, além de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) por meio da análise do transcriptoma do músculo esquelético. Foram utilizados 117 bovinos com peso corporal inicial de 345 ± 18,31 kg aos 24 ± 1 mês de idade, machos não castrados, do mesmo rebanho. Os animais foram alocados aleatoriamente em blocos leves e pesados, em dois tratamentos experimentais: dieta basal sem GAA (controle); ou suplementados com 0,2% de GAA na dieta total. O período experimental foi de 20 dias de adaptação (Fase 1) e 81 dias de terminação (Fase 2). Para a análise do perfil do transcriptoma, foram coletadas amostras do músculo *Longissimus thoracis*, lado esquerdo a altura da 13° costela. O sequenciamento foi realizado em 6 amostras selecionadas aleatoriamente para cada um dos grupos experimentais. Os animais alimentados com GAA no período de adaptação apresentaram maior ($P \leq 0.05$) eficiência alimentar e ganho de peso médio diário em relação aos animais do tratamento controle. Entretanto, ao final do experimento as variáveis de desempenho e características de carcaça não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelo GAA. A análise do transcriptoma identificou 61 DEGs (P ajustado < 0,05), entre os grupos experimentais, destes 45 foram regulados positivamente para GAA e 16 regulados negativamente para o controle. A análise de enriquecimento do transcriptoma destacou um conjunto de genes-chave para a regulação do metabolismo energético, como *ADIPOQ, FABP4, FASN, PCK, PLIN, ACAT2, ELOVL6, GNAI1, CIDEC, FADS1*, com importante função nas vias AMPK, metabolismo de ácidos graxos, biossíntese de ácidos graxos insaturados, PPAR, e regulação da lipólise em adipócitos. O efeito do GAA suplementar foi evidenciado no período de adaptação onde melhorou o ganho de peso diário e eficiência alimentar dos animais. O uso do GAA influenciou os DEGs ligados ao metabolismo lipídico,

destacando os principais fatores moleculares que regulam a expressão desses genes em bovinos Nelores confinados.

Palavras-chave: creatina, eficiência alimentar, RNA

Introdução

A creatina, é um composto de nitrogênio natural que atua principalmente no metabolismo da energia celular (Zhang et al., 2017), apoiando o desenvolvimento muscular por meio da regeneração do ATP (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000; Wallimann e Tokarska-Schlattner, 2011). O ácido guanidinoacético é precursor da creatina, onde é sintetizado nos rins e no pâncreas por transferência de um grupo guanidino da arginina para a glicina, e ao chegar no fígado o ácido guanidinoacético é metilado para transforma-se em creatina (Ostojic, 2016), que é armazenada em células com alta exigência energética (Verhoeven et al., 2005).

A estabilidade térmica do ácido guanidinoacético e da creatina foram testados, independente do tratamento térmico, estágio de produção e tipo de processamento, a recuperação do ácido guanidinoacético foi de quase 100%, enquanto a creatina apresentou grande variação (Khajali, Lemmeb, Redemacher-Heilshomb, 2020). Ou seja, o ácido guanidinoacético é mais estável que a molécula de creatina, o que pode ser uma característica importante sob condições comerciais.

Estudos mostraram que a suplementação de ácido guanidinoacético melhorou o desempenho, a eficiência alimentar e digestão de nutrientes em touros Angus (Li et al., 2020), aumentou a produção de AGCC no rúmen, bem com a população microbiana (Liu et al., 2021), proporcionou aumento na expressão de genes relacionado ao metabolismo da síntese de proteínas em touros (Liu et al., 2020). Além disso, aumentou o nível de creatina plasmática (Ardalan et al., 2020; Ardalan; Batista; Titgemeyer, 2020; Li et al., 2020; Liu et al., 2020; Grant; Miesner; Titgemeyer, 2021). Entretanto, a maioria dos estudos avaliou os efeitos do GAA em dietas ricas em fibras. Considerando que uma dieta com alto teor de concentrado pode modular a expressão de diferentes genes e enriquecer outras vias metabólicas, como a regulação enzimas envolvidas na lipogênese (Ladeira et al., 2016).

A eficácia do GAA tem sido demonstrada em diversos estudos com raças *Bos taurus taurus* (Ardalan, 2015; Li et al., 2020; Liu et al., 2020; Speer 2020, Ardalan et al.,

2021, Eckhardt; Kim; Kim, 2022) e em cordeiros (Liu et al., 2021; Zhang et al., 2022; Li et al., 2022; Ren et al., 2022), poucos estudos testaram a eficácia do GAA em dietas para animais *Bos taurus indicus* que são maioria nos rebanhos brasileiros. Contudo, é fundamental ampliar o escopo das pesquisas sobre o GAA para entender melhor sua eficácia. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do ácido guanidinoacético no desempenho de bovinos Nelore (*Bos taurus indicus*) em confinamento, além de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) por meio da análise do transcriptoma total do músculo esquelético desses animais.

Material e métodos

O estudo foi conduzido no Confinamento Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, no período entre outubro de 2021 a janeiro de 2022. Foram utilizados 117 animais Nelores com peso corporal inicial médio de 345 ± 18,31 kg, machos não castrados, provenientes da mesma fazenda de gado de corte em Marília, São Paulo (200 km de Botucatu), onde eram mantidos a pasto antes do início do estudo.

Antes de iniciar o experimento, os animais permaneceram por cinco dias em seis baias coletivas para se adaptarem ao ambiente, nesse período foi ofertado aos animais uma dieta com silagem de milho e farelo de soja. Após esse período de cinco dias, os animais passaram por um período de jejum alimentar de 16 horas para pesagem inicial. Em seguida foram submetidos a um protocolo sanitário padrão utilizado nos confinamentos brasileiros, com administração de vacinas contra Raiva (Raivacel Multi, MSD Saúde Animal), Pneumonia (Inforce 3, Zoetis Saúde Animal), Clostridium (Fortaleza, Zoetis Saúde Animal), e tratamento contra endo e ectoparasitas.

O experimento foi realizado em delineamento em blocos casualizados e os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois blocos (“leve” e “pesado”) com base no peso corporal inicial (PCI) visando uma distribuição homogênea dos grupos. Os animais foram alojados em baias coletivas com 5 animais/baia. As baias foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos, totalizando 12 repetições/baia para cada tratamento. As baias possuíam dimensões de 8 x 8 metros, piso de concreto reforçado e estavam equipadas com cocho e bebedouro automático. O período experimental foi dividido em duas fases e teve duração total de 101 dias. A fase 1 foi caracterizada com 20

dias iniciais destinados à adaptação dos animais e a fase 2 compreendeu 81 dias de terminação.

O protocolo de adaptação (ADAP) utilizado foi o de escada (*step-up*), com o objetivo de reduzir a proporção de volumoso na dieta e aumentar a quantidade de concentrado. No primeiro período (step 1), os animais foram alimentados com uma dieta composta por 36% de volumoso e 64% de concentrado (v:c), durante 10 dias. No segundo período (step 2), a dieta foi ajustada para 28:72% por 5 dias. No último período da adaptação (step 3), os animais foram alimentados com uma dieta de 20:80% durante 5 dias. Para a fase de terminação, foi adotado uma proporção de 13:87%, mantida por um período de 81 dias (Tabela 1).

Tabela 1: Ingredientes e composição química da dieta experimental

Item	**Step1**[1]	**Step 2**	**Step 3**	**Terminação**
Ingredientes [2]				
Bagaço de cana	16,6	16,0	16,0	13,0
Silagem	20,0	12,74	4,88	0,0
Milho moído	42,0	52,0	62,0	69,88
Farelo de soja	17,9	15,76	13,62	13,62
Suplemento vitamínico-mineral [3]	3,50	3,50	3,50	3,50
Composição nutricional [2]				
Matéria seca	66,12	60,78	59,39	65,25
Matéria mineral	5,78	3,28	4,55	5,49
Proteína bruta	14,33	13,57	15,18	14,81
Extrato etéreo	2,33	1,50	2,03	1,26
Fibra em detergente neutro	34,48	32,68	23,90	19,00
Fibra em detergente ácido	19,04	17,35	12,15	8,75

[1] Adaptation diet. [2] % of diet DM. [3] Mineral-vitamin supplement containing: 715 mg Sodium monensin; 490 g urea; 5,49 % GAA; 240 g Ca; 19 g S; 208,08 mg F; 10,30 g P; 15 g Mg; 46 g Na; 8,5 mg Co; 428 mg Cu; 285 mg Fe; 21 mg I; 1285 mg Mn; 5,70 mg Se; 71000,00 UI Vit A; 11430,00 UI Vit D3; 105,00 UI Vit E; 1714,00 mg Zn.

Foram avaliados os tratamentos: sem adição do GAA (controle) ou tratamento com 0,2% de GAA (GuanAMINO, ® Evonik Operations GmbH, Hanau-Wolfgang, Alemanha) na dieta total (base MS). O GAA foi incorporado ao suplemento vitamínico-mineral (Cargill Nutrição Animal, Itapira, SP, Brasil). A composição da dieta basal incluía ingredientes comumente utilizados nos confinamentos do Brasil incluindo milho moído, farelo de soja, silagem de milho, bagaço de cana-de-açúcar e suplemento vitamínico-mineral (com base na matéria seca; Tabela 1). As dietas foram fornecidas duas vezes ao dia, às 9:00h e às 14:00h, permitia-se sobras de 3% (com base na quantidade total de alimento oferecido). Os concentrados (suplemento com GAA, milho e soja) foram pré-misturados semanalmente na fábrica de ração da universidade e, diariamente, eram pesados e misturados ao volumoso.

Consumo de matéria seca e desempenho produtivo

A dieta fornecida foi determinada com base nas exigências do animal, conforme estabelecido pelo NRC, e calculada como uma porcentagem do peso vivo, inicialmente foi fornecido 1,8% do peso vivo do animal. O ajuste da quantidade fornecida diariamente e o consumo de matéria seca (CMS) foram realizados com base na pesagem das sobras no dia anterior. O bagaço de cana-de-açucar foi pesado diariamente e a matéria seca (MS) foi mesurada para ajustar a quantidade fornecida de bagaço. Além disso, foi adicionado água na dieta dos animais, para ajustar o teor de matéria seca em 65%. As quantidades diárias de ração ofertada e sobras por baia foram pesadas para obter o consumo médio diário nas fases de adaptação e terminação.

Durante o período experimental, foram realizadas três pesagens de cada animal: primeira pesagem foi realizada com a entrada dos animais ao confinamento, a segunda ao final do período de adaptação, que marcou também o primeiro dia de terminação, e a última pesagem ao final do período experimental. Antes de cada pesagem, os animais passaram por período de jejum de sólidos (16 horas). Com base nas informações de pesagem, foi calculado o ganho de peso médio diário (GMD), a conversão alimentar (CA) e a eficiência alimentar (EF).

$$GMD: \frac{Peso\ corporal\ final\ (PCF) - Peso\ corporal\ inicial\ (PCI)}{dias\ experimentais}$$

$$CA: \frac{Consumo\ de\ matéria\ seca\ (CMS)}{GMD}$$

$$EF: \frac{GMD}{CMS}$$

Para as características de carcaça, foi utilizada a técnica de ultrassonografia conforme descrito por Pinheiro et al. (2011). A área de olho de lombo (AOL; cm²), a espessura de gordura no lombo (EGL; mm) e a espessura de gordura na garupa (EGG; mm) foram mensuradas por meio de imagens de ultrassonografia obtidas entre a 12ª e a 13ª costela do lado direito do músculo *Longissimus thoracis (LT)*. As medições foram realizadas com um aparelho de ultrassom Pie Medical modelo 401347-Aquila (Esaote Europe B.V.), equipado com uma sonda linear de 3,5 MHz (18 cm). As imagens foram adquiridas e armazenadas utilizando o software Echo Image Viewer 1.0 (Pie Medical Equipment B.V., 1996).

Características de carcaça

Após 101 dias de experimento todos os animais foram conduzidos para o abatedouro comercial (Frigorífico Estrela, na cidade de Estrela D´Oeste, São Paulo), localizado cerca de 400 km de Botucatu. Os animais foram abatidos seguindo as diretrizes para Abate Humanizado de Bovinos de acordo com o Regulamento de Inspeção Sanitária e Industrial de Produtos de Origem Animal. Foi utilizado a técnica de concussão cerebral e secção da veia jugular, seguido de remoção do couro e evisceração, para obtenção da carcaça. Foi calculado o ganho por arroba (GA) e o rendimento de carcaça (RC). Este foi calculado com base no peso de carcaça quente (CQ) obtido no frigorífico.

$$RC: \left(\frac{CQ}{PCF}\right) * 100$$

$$GA: \frac{(PCF - PCI)}{30@}$$

Extração do RNA e preparo das bibliotecas

Para análise global do perfil do transcriptoma por RNAseq, foi realizado a biopsia para a coleta de 100 a 200 mg de amostra do músculo LT, lado esquerdo na altura da 13ª costela, com auxílio de agulhas tipo Bergström. As amostras foram imediatamente

armazenadas em criotubos e colocadas nitrogênio líquido até serem devidamente armazenadas em ultra freezer a -80°C para posterior análise.

O sequenciamento foi realizado em 6 amostras aleatoriamente selecionadas para cada um dos grupos experimentais, totalizando 12 amostras coletadas. O RNA total foi extraído do tecido muscular utilizando kit comercial (RNeasy Mini Kit cat 74704, Qiagen, Hilden - Germany) seguindo as instruções do fabricante. A pureza e integridade do RNA extraído foram checadas em fluorômetro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) e Bioanalyzer RNA (Pico High Sensitivity RNA kit, Agilent, Santa Clara, CA - EUA), respectivamente. Para cada amostra, 500 ng de RNA foi utilizado para preparação da biblioteca de acordo com protocolo descrito em TruSeq RNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, San Diego, CA - EUA). O tamanho médio das bibliotecas foram de 300 bp estimados em Bioanalyzer DNA (High Sensitivity DNA kit, Agilent, Santa Clara, CA - EUA). Bibliotecas quantificadas foram diluídas e indexadas usando TruSeq DNA CD Index Plate (96 indices, 96 amostras Illumina, San Diego, CA - EUA) e agrupadas em concentração equimolar.

Todas as amostras foram sequenciadas em 2 x 100 bp paired-end em equipamento NovaSeq X Plus (Illumina, San Diego, CA - EUA) com kit de sequenciamento NovaSeq™ X Series 1.5B Reagent Kit (200 ciclos, cat no 20104704), seguindo as instruções do fabricante. Todo o preparo de extração de RNA e montagem das bibliotecas foi realizado a encargo do Laboratório Multiusuário de Biologia Celular e Molecular (LMBCM) na UFSCar localizado na cidade de São Carlos, São Paulo.

Análise bioinformática

Leituras de baixa qualidade e complexidade foram inicialmente filtradas e removidas por meio do software fastp v. 0.23.4 (Shen, 2023). Somente seguiram para análise leituras com comprimento maior que 15 nucleotídeos e qualidade Phread score acima de 33. O genoma referência utilizado para mapeamento foi Bos_taurus_ARS_UCD_2.0, por meio do software de alinhamento STAR v.2.7.11 com parâmetros default. A abundância (read counts) de mRNAs para todos os genes anotados foi calculado utilizando a função feature-Counts do pacote Rsubread (Liao et al., 2019).

Para identificação de genes diferencialmente expressos (DEG) foi aplicado filtros sobre a tabela de contagem ao qual: (i) genes com zero contagens em todas as amostras

foram considerados como genes não expressos; (ii) genes com contagens menores que uma contagem por amostra na média foram removidas – expressão muito baixa e (iii) genes que não tiveram contagem em ao menos 50% das amostras foram excluídos – genes raramente expressos. Após a aplicação dos filtros os genes foram submetidos a análise de expressão diferencial através do pacote DESeq2 v. (Love et al., 2014).

A abordagem de seleção dos DEGs foi mediante o ajuste do *P*-valor de acordo com Benjamini-Hochberg, sendo considerado, portanto, genes que tiveram expressão absoluta (log2 Fold Change) maior que 0.5 e *P*-valor ajustado (FDR) < 0.05.

Análises complementares foram realizadas a fim de se obter os genes exclusivos para cada condição experimental. Genes com contagens em todas as amostras de um grupo, mas zero contagens em todas as amostras do outro grupo experimental, foram considerados genes exclusivos. Adicionalmente, os genes foram submetidos à análise de fatores de impacto regulatório e correlação parcial e teoria da informação, primariamente descrita por Reverter et al., (2010) e Reverter e Chan, (2008), com o objetivo de identificação de genes fatores de transcrição e hubgenes em pacote CeTF (Biagi-Junior et al., 2023).

A visualização gráfica dos dados foi feita em software RStudio v.4.4.1 por meio de pacotes como factoextra v.1.0.7 para análise de componentes principais (PCA), pheatmap v.1.0.12 para análise de mapas de calor, ggplot v.3.5.1 para volcano plot e clusterProfiler v. 4.12.6 para os gráficos de enriquecimento funcional.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o procedimento Misto do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA, 9.4) em um delineamento de blocos casualizados. A unidade experimental considerada foi a baia, o tratamento foi denominado como efeito fixo, e o bloco foi considerado como efeito aleatório. Os resultados foram apresentados como Médias dos Quadrados Mínimos (LSMEANS).

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk utilizando o procedimento PROC UNIVARIATE do SAS (versão 9.4, 2015). Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foram transformados utilizando o procedimento PROC RANK. Para determinar as diferenças entre as médias dos

tratamentos, foi aplicado o teste de Tukey. Foi considerado significativo quando o valor de $P \leq 0,05$, e tendência quando $0,05 < P < 0,10$.

Resultados

Desempenho e consumo de matéria seca

As principais variáveis de desempenho foram analisadas para avaliar o efeito do GAA, os resultados estão apresentados na Tabela 2. Ao final do período de adaptação (20 dias), a suplementação com GAA aumentou ($P = 0,06$) o GMD em 260 g/dia e a EF em 30 g/kg de MS ($P < 0,05$) dos animais GAA em comparação ao tratamento controle. No entanto, as variáveis de conversão alimentar e o consumo de matéria seca não foram afetados ($P > 0,05$) quando o GAA foi adicionado à dieta dos animais. No período de terminação, não houve diferença ($P > 0,05$) para nenhuma das variáveis de desempenho entre os tratamentos.

Tabela 2. Efeito da suplementação de GAA na dieta de terminação de touros Nelore sobre o desempenho e consumo de matéria seca

Item	Tratamentos		EPM[1]	*P*-value
Fase 1	GAA	Controle		
PCI (kg)	344,33	345,83	14,85	0,4450
PCF (kg)	378,86	376,03	11,71	0,3018
GMD (kg/d)	1,76	1,50	0,15	0,0674
EF (kg)	0,20	0,17	0,02	0,0180
CA (kg)	5,06	5,36	0,44	0,2028
CMS	8,73	8,90	0,23	0,4066
Fase 2				
PCI (kg)	378,98	376,03	11,78	0,2844
PCF (kg)	526,28	523,98	10,11	0,6615
GMD (kg/d)	1,80	1,83	0,04	0,4518
EF (kg)	0,17	0,17	0,00	0,1587
CA (kg)	5,83	5,77	0,15	0,6288
CMS	10,43	10,37	0,16	0,7785

[1]EPM: Erro padrão da média; Fase 1: Fase de adaptação - 20 dias; Fase 2: Fase de terminação - 81 dias; PCI: Peso corporal inicial; PCF: Peso corporal final; GMD: Ganho médio de peso por dia; EF: Eficiência alimentar; CA: Conversão alimentar; CMS: Consumo de matéria seca.

Caractéristas de carcaça

Ao final do experimento, o GAA não influenciou (P > 0,05) os parâmetros de carcaça (PC, RC, GA, AOL, EGL e EGG). Embora uma diferença numérica tenha sido observada para AOL entre os tratamentos, essa variação não foi estatisticamente significativa (P > 0,05) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da suplementação de GAA na dieta de terminação de touros Nelore sobre as características da carcaça

Item	Tratamentos		EPM[1]	*P*-value
Características de carcaça	GAA	Controle		
PC (kg)	284,41	284,59	6,52	0,9482
RC (%)	54,19	54,31	0,37	0,7286
GA (kg)	6,01	6,03	0,21	0,9051
AOL (cm^2)	63,12	61,20	0,94	0,1613
EGL (mm)	3,30	3,24	0,18	0,7751
EGG (mm)	7,23	7,38	0,19	0,5879

[1]EPM: Erro padrão da média; PC: Peso da carcaça; RC: Rendimento da carcaça; GA: Ganho de arroba; AOL: Área do olho de lombo; EGL: Espessura de gordura no lombo; EGG: Espessura de gordura na garupa.

Perfil do transcriptoma

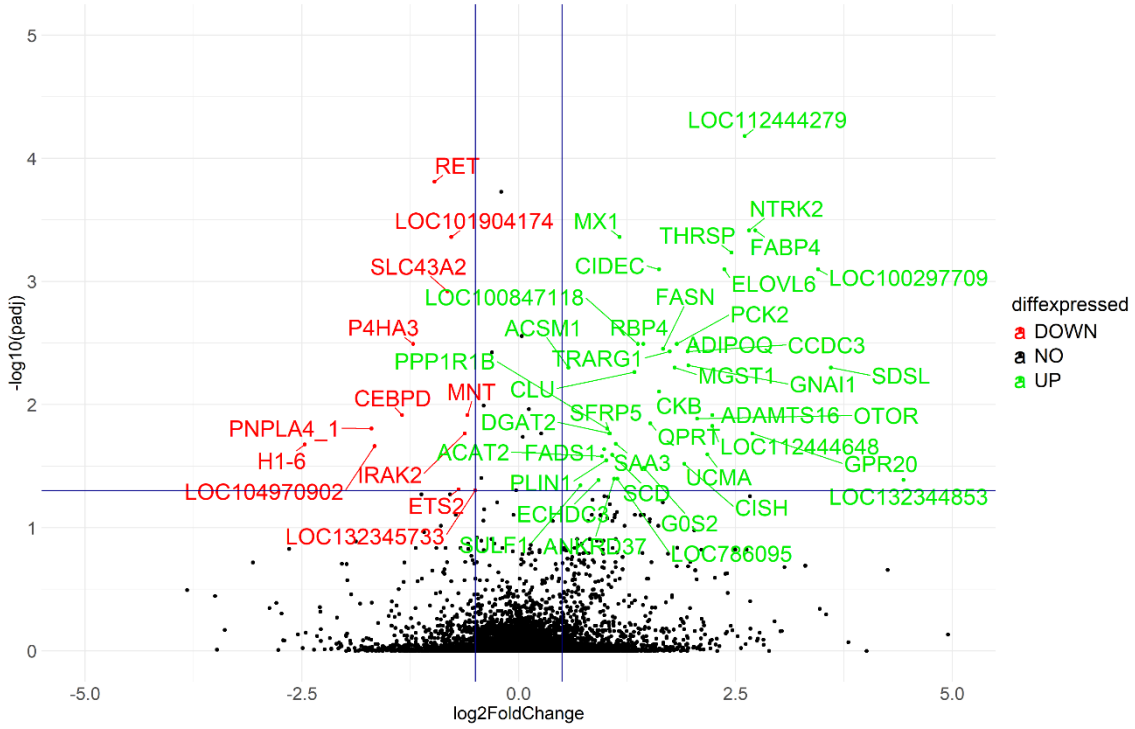
A análise de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos (DEGs) destacou um conjunto de genes-chave para a regulação do metabolismo energético, como adiponectina *(ADIPOQ),* proteína ligadora de ácidos graxos 4 (*FABP4),* sintase de ácidos graxos (*FASN),* fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PCK),*

perilipina *(PLIN)*, estearoil-CoA dessaturase (*SCD)*, acetil-CoA acetiltransferase 2 (*ACAT2)*, elongase de ácidos graxos 6 (*ELOVL6)*, subunidade alfa da proteína G inibidora 1 (*GNAI1)*, proteína envolvida na expansão de gotas lipídicas (*CIDEC)*, dessaturase de ácidos graxos 1 (*FADS1)*, os quais enriqueceram vias metabólicas importantes. Dentre as vias metabólicas significativamente enriquecidas, cinco foram selecionadas por seu papel central no metabolismo energético, na lipogênse e no metabolismo lipídico geral, atuando de forma integrada, destacamos as vias de sinalização AMPK; Metabolismo de ácidos graxos; Biossíntese de ácidos graxos insaturados; Via de sinalização PPAR e Regulação da lipólise em adipócitos. Tais vias podem nos ajudar a explicar as diferenças encontradas no estudo.

O transcriptoma completo de 6 amostras do músculo LT de bovinos Nelore em confinamento foi sequenciado utilizando a tecnologia RNA-Seq. A concentração e a integridade do mRNA de todas as amostras encontram-se descritas na Tabela Suplementar. Os dados de sequenciamento foram analisados comparando os grupos GAA vs. Controle, resultando na identificação de 16.832 genes expressos, que foram utilizados na análise de genes diferencialmente expressos (DEGs) e fatores de transcrição centrais (CeTFs).

A análise do transcriptoma identificou 61 DEGs (P ajustado < 0,05; Figura 1A), dos quais 45 apresentaram regulação positiva e 16 regulação negativa para o grupo GAA em comparação ao grupo controle. A análise do mapa de calor com todos os genes mais importantes permite uma visualização entre os clusters/grupos formados entre os tratamentos GAA vs. controle (Figura 1B).

(A)


-log10(padj)
log2FoldChange
diffexpressed
DOWN
NO
UP
LOC112444279
RET
NTRK2
LOC101904174
MX1
THRSP
FABP4
SLC43A2
CIDEC
ELOVL6
LOC100297709
LOC100847118
FASN
PCK2
P4HA3
ACSM1
RBP4
ADIPOQ
CCDC3
PPP1R1B
TRARG1
MGST1
GNAI1
SDSL
CEBPD
MNT
CLU
CKB
SFRP5
ADAMTS16
OTOR
PNPLA4_1
DGAT2
QPRT
LOC112444648
H1-6
ACAT2
FADS1
SAA3
GPR20
IRAK2
UCMA
PLIN1
SCD
LOC132344853
LOC104970902
ETS2
CISH
ECHDC3
G0S2
LOC132345733
SULF1
ANKRD37
LOC786095

(B)

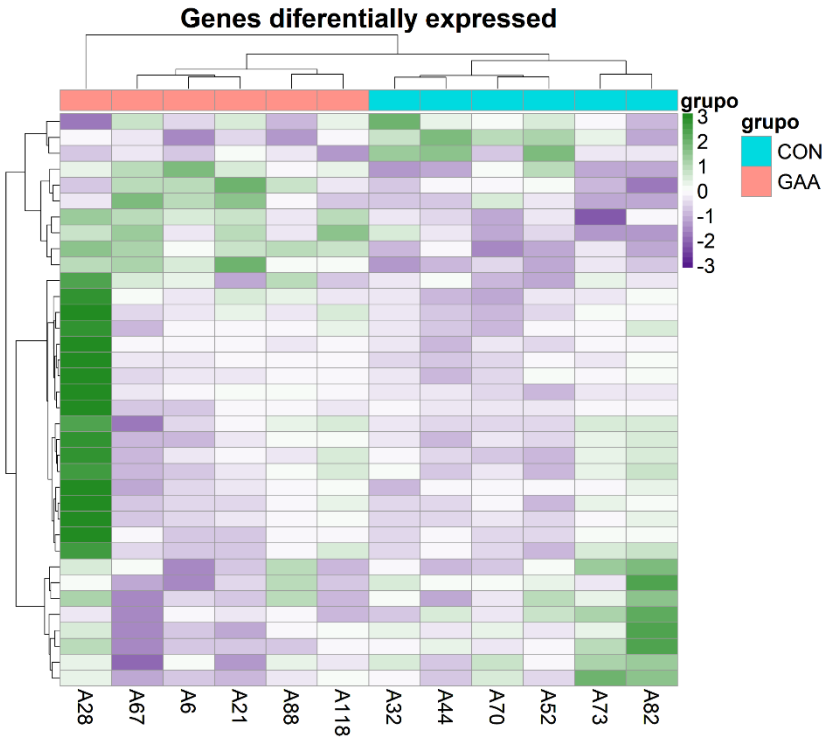


Figura 1. (A) Gráfico volcano plot apresentando os genes diferencialmente expressos entre GAA vs. controle; (B) Gráfico de mapa de calor (heatmap) de todos os genes diferencialmente expressos do *Longissimus thoracis* de touros nelore terminados em confinamento suplementados ou não com GAA.

A análise de componentes principais com base nos DEGs revelou a formação de grupos distintos entre os dois tratamentos, com o componente principal 1 explicando 55% da variabilidade total e o componente principal 2 respondendo por 21,1% da variância entre as amostras (Figura 2). A dieta GAA foi distribuída no lado positivo do Componente Principal 1 (Dim1), com influência de genes como *FABP4*, *PLIN1*, *PCK2*, *FASN*, *MGST1*, *G0S2*, *ELOVL6*, *THRSP*, *CCDC3*, *CIDEC*, *PPP1R1B*, *DGAT2*, *CIDEC*, *SCD*, *CLU*. Enquanto isso, a dieta controle foi distribuída no lado negativo do Componente Principal 1 (Dim1), com influência de genes como *DGAT2*, *CLU*, *CIDEC*.

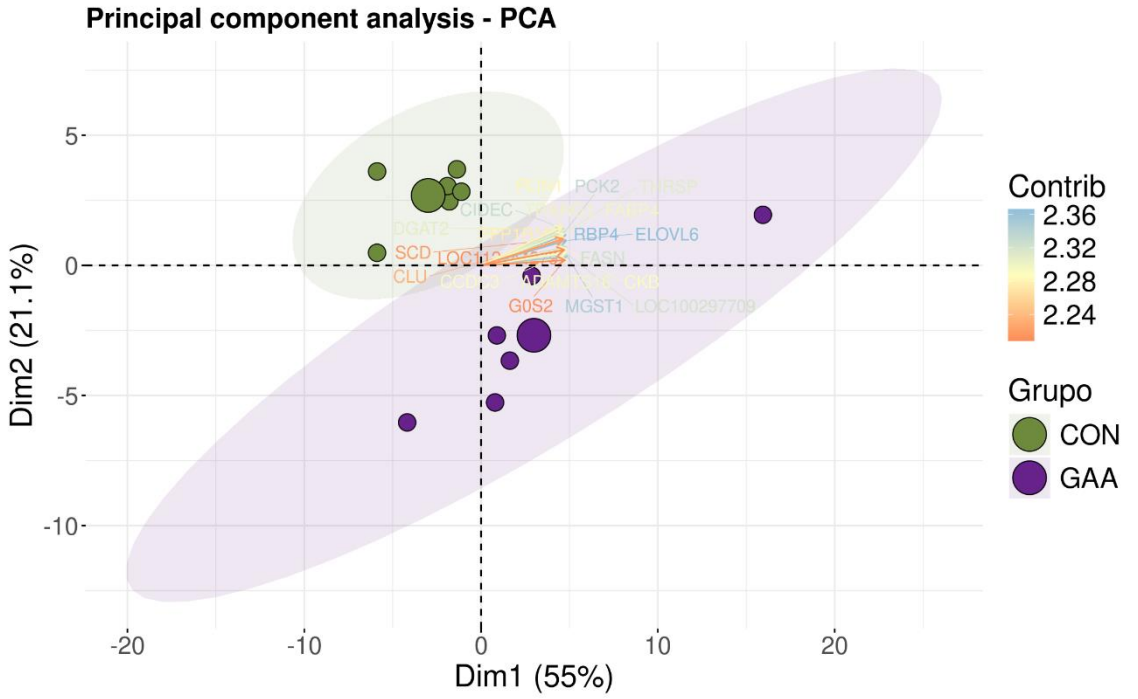
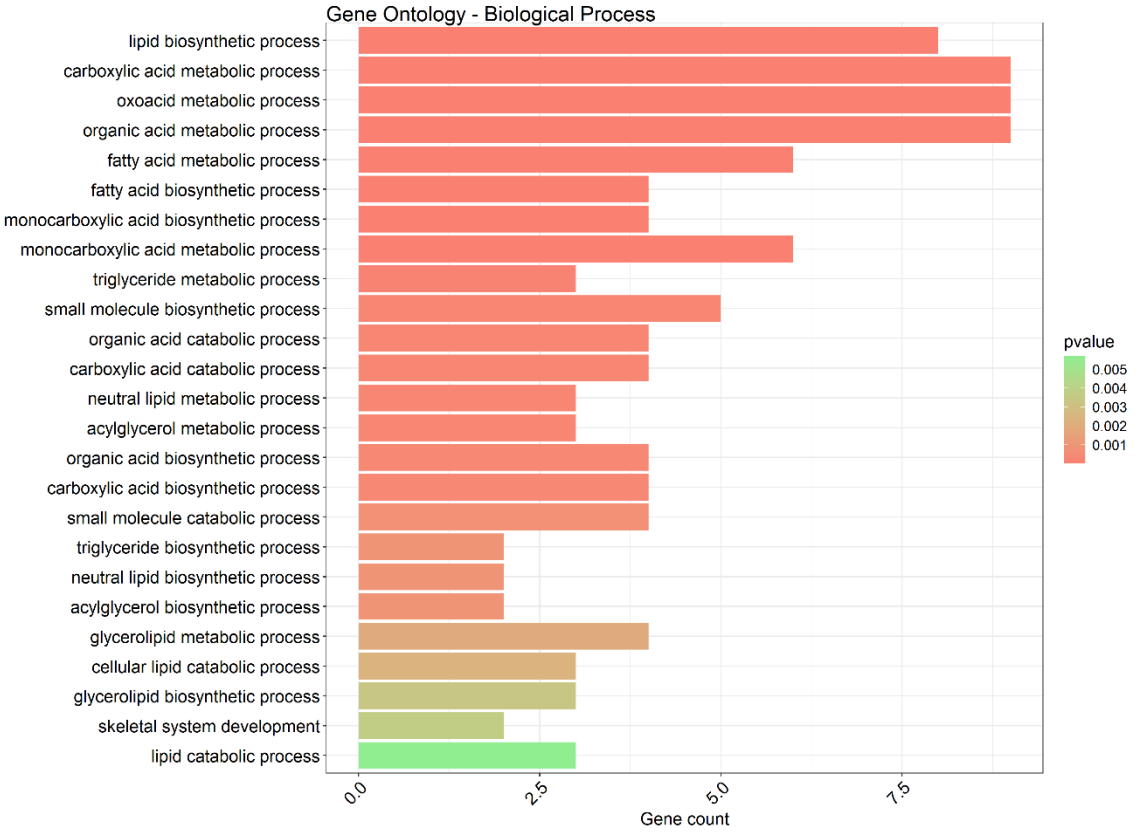


Figura 2. Análise de componentes principais gráfico de dispersão baseado em genes diferencialmente expressos do *Longissimus thoracis* de touros nelore terminado em confinamento suplementados ou não com GAA, $n = 6$ por dieta.

A análise de enriquecimento funcional (Gene ontology – GO) foi conduzida com todos os DEGs usando o pacote ClusterProfiler no software R, agrupando processos biológicos em termos GO e vias de sinalização da Kyoto Encyclopedia of Genes Genomes (KEGG). As vias super-reguladas são ilustradas na figura 3 (Tabela suplementar), destacando-se: Processo metabólico de ácidos graxos (GO:0006631, $P < 0.01$); Processo biossintético de lipídios (GO: 0008610, $P < 0.01$); Processo biossintético de ácidos graxos (GO: 0006633, $P < 0.01$); Processo metabólico de glicerolipídeos (GO:0046486, $P < 0.01$); Processo metabólico de Triglicerídeos (GO: 0006641, $P < 0.01$). No banco de dados KEGG 110 vias foram enriquecidas (Tabela suplementar), destacando vias como: Via de sinalização AMPK (bta01040, $P < 0.01$); Metabolismo de ácidos graxos (bta01212, $P < 0.01$); Biossíntese de ácidos graxos insaturados (bta04152, $P < 0.01$); Via de sinalização PPAR (bta03320, $P < 0.01$); Regulação da lipólise em adipócitos (bta04923, $P < 0.01$).

(A)



(B)

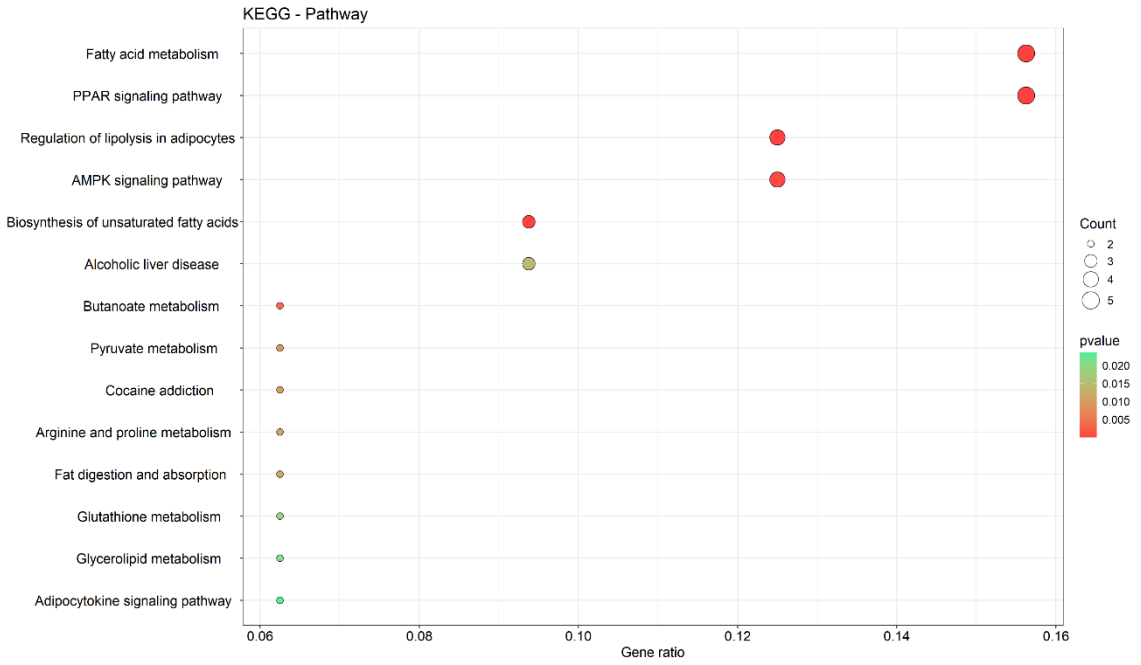


Figura 3. (A) Gráfico de Birplot com os principais termos ontológicos super-reguladas em GO, (B) Análise de enriquecimento de caminhos/vias na Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) de touros nelore terminados em confinamento

suplementados ou não com GAA. E as principais vias super-reguladas na KEGG, mostrando expressão no contraste entre animais em dieta GAA *vs* controle, $n = 6$ por dieta.

Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do GAA sobre o desempenho de bovinos Nelore terminados em confinamento, bem como caracterizar o transcriptoma do músculo esquelético desses animais. Estudos prévios indicam que o GAA, um precursor direto da creatina, atua como uma fonte adicional de energia, com efeitos positivos no desempenho de animais monogástricos. Em ruminantes, o uso do GAA começou a ser explorado, sobretudo em bovinos, evidenciando almento no GMD e na EF. Este estudo avalia os efeitos da suplementação de GAA na dieta de bovinos Nelore em confinamento, com foco no desempenho, características de carcaça e expressão gênica por meio do transcriptoma. Hipotetizamos que o GAA poderia melhorar o desempenho dos animais, e que a creatina gerada a partir do uso de GAA poderia melhorar o metabolismo energético, beneficiando tanto o desempenho dos animais quanto a expressão de genes.

Desempenho e características de carcaça

Os resultados indicam que a suplementação com GAA aumentou a EF dos animais, refletindo em um maior GMD durante a Fase 1 do experimento. A melhoria observada no GMD, durante a fase inicial pode estar relacionada ao uso do alimento volumoso no protocolo step-up durante esse período (36% no step 1, 28% no step 2 e 20% no step 3). Durante a fase 1 com uma dieta rica em fibra, a digestibilidade dos nutrientes e a eficiência da conversão alimentar podem ser mais sensíveis a fatores como a disponibilidade de energia e a capacidade de metabolizar a fibra. A suplementação com GAA pode ter contribuído para uma melhoria na EF nessa fase, fornecendo energia adicional ou otimizando o uso da energia (Asiriwardhana; Bertolo, 2022). Além disso, o GAA pode ter atuado como uma fonte de nitrogênio para as bactérias ruminais, especialmente aquelas celulolíticas que utilizam o nitrogênio para apoiar seu crescimento, estudos demonstraram que aproximadamente 50% do GAA é degradado no rúmen, o que pode estimular o crescimento das bactérias presentes nesse ambiente (Speer et al., 2020). Devido à sua característica de liberação lenta, o GAA, é decomposto de forma gradual; inicialmente, a guanidina é hidrolisada em amônia e ureia, e posteriormente, a ureia é

hidrolisada, resultando em uma liberação de nitrogênio que acompanha a taxa de utilização de amônia pelas bactérias ruminais (Belasco, 1954).

Estudos que corroboram nossos achados demonstram que animais suplementados com GAA em dietas ricas em volumoso apresentaram maior GMD e melhor EF, sem aumento no CMS (Liu et al., 2020; Li et al., 2021; Yi et al., 2024). Quando o GAA foi ofertado em diferentes doses (0,3, 06 e 0,9 g/kg de MS), foi observado efeito linear na digestibilidade da FDN e FDA e na concentração de AGCC, além de aumentar as populações de bactérias celulolíticas (Liu et al., 2022). Pesquisa *in vitro,* avaliou doses de GAA (0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,1, 1,3, 1,5 g/kg de MS) sobre a degradabilidade da FDN e FDA em uma dieta para ovinos (concentrado:volumoso de 75:25), uma resposta quadrática às doses foi observada, o ponto máximo de degradabilidade foi a nível de 0,9 e 1,1 g/kg de MS (Li et al., 2023).

Contrariamente às nossas expectativas, no presente estudo, à medida que a dieta se tornou mais concentrada na Fase 2, o efeito do GAA na EF foi atenuado. Esse efeito pode estar relacionado à maior eficiência do GAA na utilização pelas bactérias celulolíticas, que apresentam maior atividade em dietas com maior teor de volumoso (Liu et al., 2022, Li et al., 2023). Além disso, dietas com alto teor de concentrado promovem uma fermentação mais rápida e melhoram a digestibilidade dos nutrientes (Chen et al., 2021), o que pode ter reduzido a diferença potencial que o GAA poderia ter causado em uma dieta mais fibrosa. Adicionalmente, no estudo de Li et al. (2023), a inclusão de GAA em doses elevadas (1,3 e 1,5 g/kg) resultou em efeitos adversos, com redução na degradabilidade da fibra, atribuída pelos autores a um desequilíbrio da homeostase provocado por uma possível sobredosagem de GAA. Considerando que, neste estudo, também foi utilizada uma dose elevada (2,0 g/kg), pode ser que esse fator tenha limitado os efeitos positivos do GAA nos animais. De forma consistente com os nossos resultados, Eckhardt et al. (2024), também não observaram efeitos significativos da suplementação com doses elevadas de GAA (1 ou 2 g/100 kg PV) sobre o GMD, peso corporal final ou características de carcaça de touros Angus terminados em confinamento com dieta altamente concentrada (88:12, concentrado:volumoso). No entanto, no mesmo estudo, foi observada uma tendência de aumento no GMD durante os primeiros 28 dias do experimento, período em que os animais receberam uma dieta com maior proporção de volumoso (52:48, concentrado:volumoso).

A alta dose de GAA pode também limitar a conversão de GAA em creatina por conta da alta demanda de grupos metila. Alguns estudos sugerem que a suplementação com GAA pode levar a uma deficiência nos grupos metila, devido ao aumento na demanda por S-adenosil-metionina (SAM) para a conversão de GAA em creatina (Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000; Brosnan, Silva, Brosnan, 2011; Yi et al., 2024). Quando o GAA é convertido em creatina pela ação da enzima guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) (Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000), esta enzima transfere um grupo metila da SAM para o guanidinoacetato, resultando na formação de creatina. A suplementação com GAA promove um aumento na produção de creatina, o que intensifica o uso de SAM para fornecer os grupos metil necessários para essa conversão. Dessa forma, com a elevação na demanda de SAM para a síntese de creatina, pode ocorrer uma redução na disponibilidade de SAM para outras reações bioquímicas que também requerem grupos metil (Walker, 1979, Edison et al., 2007, Brosnan, Silva, Brosnan, 2011, Oviedo-Rondón, Córdova-Noboa, 2020). Se a taxa de consumo de SAM ultrapassar a capacidade do organismo de reciclá-la, isso pode levar a uma deficiência de grupos metil.

A deficiência de metila pode ser evidenciada por indicadores de deficiência de metionina, como a redução dos níveis plasmáticos de metionina e o aumento da homocisteína (Sousa et al., 2024). Assim, no estudo de Ardalan et al. (2021), a suplementação com GAA junto com a metionina tendeu a aumentar a retenção de nitrogênio mas quando apenas o GAA foi ofertado, esse efeito não foi observado e a concentração de homocisteína plasmática aumentou.

Em nosso estudo, embora os indicadores de deficiência de metionina não tenham sido avaliados, é possível que a abordagem com uma dose elevada de GAA sem suplementação adicional de doadores de grupos metila tenha sido um fator limitante durante a fase 2 do experimento. Como consequência, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para as variáveis avaliadas. Embora a AOL tenha apresentado diferença numérica entre os grupos, essa variação não foi suficênte para a significância estatística, possivelmente também em função do tamanho amostral.

Perfil do transcriptoma

O GAA, precursor da creatina, aprimora o armazenamento e a utilização de energia nas células, favorecendo processos anabólicos, como a deposição de gordura intramuscular e subcutânea. Nesse contexto, observamos um aumento na ativação da via

de sinalização da AMPK, sugerindo um impacto direto no metabolismo energético e lipídico.

Via de sinalização AMPK

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK), é um sensor central da homeostase energética celular que regula processos anabólicos e catabólicos para manter a eficiência energética, especialmente em condições de baixo ATP ou altos níveis de AMP/ADP (Oliveras-Ferraros et al., 2009). Em nosso estudo, os DEGs que enriqueceram à via AMPK, foram: *ADIPOQ, PCK2, FASN* e *SCD.*

Os DEGs que enriqueceram essa via estão associados à síntese de ácidos graxos (AG), o que contraria a resposta típica esperada de uma ativação clássica da AMPK, geralmente relacionada à inibição da lipogênese (Ou-Yang et al., 2018). Entre os genes regulados, destaca-se o *ADIPOQ*, cuja expressão aumentada indica maior produção de adiponectina, uma adipocina secretada pelos adipócitos (Kadowaki, Yamauchi, 2005). A adiponectina desempenha um papel relevante na ativação da AMPK e tem sido descrita como capaz de inibir a lipólise basal e a lipólise induzida por catecolaminas por meio de mecanismos dependentes dessa via (Wedellová et al., 2011). Assim, a ativação da AMPK pela adiponectina pode ter contribuído para a modulação da lipólise; no entanto, a concomitante regulação de genes relacionados à lipogênese sugere a existência de uma resposta compensatória ou a ativação de outras vias lipogênicas, refletindo uma possível adaptação do metabolismo lipídico dos adipócitos.

O aumento no AMP/ATP ativa a AMPK, que, por sua vez, regula várias vias metabólicas para restaurar o equilíbrio energético da célula, promovendo, entre outros, a oxidação de AG e inibindo a síntese de lipídios (Hardie, 2015). A razão fosfocreatina/creatina (PCr/Cr) foi considerada análoga ao sistema ATP/AMP, de forma que PCr/Cr parece interagir com a AMPK, ainda que controverso. Foi observado em experimento *in vitro* que PCr e Cr poderia ativar ou inibir a via AMPK, e a Cr livre poderia ativá-la (Ponticos et al., 1998; Zhang et al., 2017; Duan et al., 2022). Ao que parece a suplementação de creatina aumenta de forma desproporcional a concentração de creatina livre em relação à PCr, reduzindo a razão PCr/Cr, e essa redução é interpretada como um estado de energia alterado, levando à ativação da AMPK (Ceddia, Sweeney, 2004). O fato é que essa interação parece ser um mecanismo de ajuste fino, por exemplo, a creatina quinase (CK), responsável por fosforilar a Cr recebe feedback negativo da PCr (Vranes

et al., 2020), que por um momento poderia acumular Cr. Dessa forma, a suplementação com GAA, ao elevar os níveis de Cr livre, pode ter contribuído para a ativação da AMPK.

Além disso, como o GAA pode atuar como uma fonte de energia celular ao restaurar os níveis de PCr e ATP, é possível que esse efeito tenha contribuído para o aumento da expressão de enzimas envolvidas na lipogênese, como *FASN* (ácido graxo sintase) e a *SCD* (desaturase de ácido graxo), uma vez que diversos estudos relatam que a expressão de ambos os genes é fortemente modulada pela dieta, em que dietas mais energéticas, estimulam a expressão desses genes (Baldwin et al., 2006; Graugnard et al., 2009; Ward et al., 2010; Zhang et al., 2014).

Metabolismo de Ácidos Graxos

A síntese de lipídeos ocorre com a incorporação de triglicerídeos ao tecido adiposo, seja pela absorção de AG da dieta ou pela síntese de novo (Foufelle, Ferré, 2013). O metabolismo lipídico inicia-se com a entrada do AG nas células, mediada por transportadores como *FATP* e *CD36*. No citoplasma, os AG são ativados a acil-CoA e, dependendo do estado energético celular, podem ser transportados para a mitocôndria para β-oxidação (geração de energia) ou utilizados na síntese e armazenamento de lipídios (Glatz, Luiken, Bonen, 2010). Os DEGs que enriqueceram essa via, incluem: *ELOVL6, ACAT2, FASN, SCD e FADS1*, que desempenham papéis centrais na modulação do armazenamento de lipídios nos adipócitos (Cinti et al., 1992; Seebacher et al., 2020).

A síntese de AG é estimulada quando há excesso de ATP e acetil-CoA, esse processo ocorre principalmente quando há excesso de glicose disponível, que é metabolizada nas células, gerando intermediários que podem ser convertidos em lipídios (Zhang et al., 2022). Nesse caso, o citrato, que é oriundo apartir do acetil-CoA mais o oxaloacetato pela enzima citrato sintase, não segue o ciclo de Krebs para gerar energia, pois o ATP excedente inibe a isocitrato desidrogenase desviando o citrato para fora da mitocôndria para ser destinado à síntese de lipídios (Berchielli, Pires, Oliveira, 2011). É esse acetil-CoA que será utilizado pelo complexo enzimático ácido graxo sintetase *FASN* para a formação do triacilglicerol (TGL). A alta disponibilidade de acetil-CoA no citoplasma, juntamente com a ativação de enzimas sensíveis à insulina, promove a síntese de AG, TAG e colesterol, direcionando o metabolismo para o armazenamento e formação de lipídios (Shi, Tu, 2015).

Estudo *in vitro* indicou que a suplementação com creatina pode aumentar o funcionamento da citrato sintase, a enzima mitocondrial responsável por catalisar a junção do oxaloacetato ao acetil-CoA para formar citrato (Ceddia, Sweeney, 2004). Embora o trabalho citado tenha utilizado creatina, poderíamos sugerir que o GAA, como precursor da creatina, também poderia atuar de forma semelhante, contribuindo para a produção de ATP. A maior disponibilidade de ATP proporcionada pelo GAA possivelmente favoreceu as reações energicamente dependentes, como a catalisada pela citrato sintase, aumentando, assim, a disponibilidade de citrato no citoplasma. Esse citrato poderia ser utilizado tanto na biossíntese de ácidos graxos e colesterol quanto na regulação metabólica. Além disso, o metabolismo de lipídios é dependente de insulina para seu funcionamento, as proteínas que participam do metabolismo como *ACC, FASN, ACAT, LPL*, entre outras, são responsíveis a insulina (Zhang et al., 2022).

Quando ocorre um aumento significativo de insulina chegando na célula, pode haver acúmulo de citrato na mitocôndria. Como a creatina está associada a um aumento na secreção de insulina pelo pâncreas (Gempel et al., 1996; Rooney et al., 2002), o GAA como seu precursor, também tem potencial para estimular a secreção de insulina (Alsever et al., 1970). Newman et al. (2003), observaram que os níveis plasmáticos de insulina em jejum tenderam a aumentar em aproximadamente 30% após a suplementação de creatina. O grupo guanidino presente na creatina e no GAA exibe uma estrutura semelhante à da arginina e esta tem sido descrita como um promotor da liberação de insulina (Rorsman, Ashcroft, 2018).

Além disso, o GAA pode ter aumentado a expressao dos genes *FASN* e *ACC* por meio do fator de transcrição *Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1* (*SREBP1* - tabela complementar), que por sua vez possui um importante papel no metabolismo lipidico. O fator de transcrição *SREBP1* está diretamente relacionado a expressão de *FASN*, a redução desse fator reduziu a síntese de AG de novo, inibindo a *FASN* em pré-adipócitos bovinos (Choi et al., 2015). Em conformidade com Cui et al., (2022), que também observaram aumento na expressão do fator de transcrição *SREBP1*, bem como maior expressão de proteínas envolvidas com a síntese de AG, como a ACC, para o tratamento com GAA em suínos. Em contraste, estudo com ovinos suplementados com 1g/kg de GAA, observaram menor expressão de *FASN* e *ACC* (Li et al., 2023, Zhao et al., 2023). Enquanto ovelhas suplementadas com GAA apresentaram aumento na expressão de *ACC* e nos níveis de Lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Jin et al., 2024).

Biossíntese de Ácidos Graxos Insaturados

A biossíntese de ácidos graxos insaturados (UFAs) complementa o metabolismo dos ácidos graxos, compartilhando etapas cruciais de elongação e dessaturação. Os DEGs *ELOVL6, SCD* e *FADS1* desempenham papéis fundamentais na modulação da fluidez das membranas celulares e na formação de lipídios bioativos essenciais para diversas funções celulares (Paton, Ntambi, 2009; Bispo, Rodrigues, Bandarra, 2025). Enzimas dessaturases, como estearoil-CoA e delta-6 dessaturase introduzem uma ligação dupla em ácidos graxos, resultando na produção de UFAs. Dependendo da posição da ligação dupla, as enzimas são classificadas em diferentes grupos, como delta-9, delta-6, delta-5 e delta-4 dessaturases (Nakamura, Nara, 2004). Enquanto enzima alongase, como elongase de ácidos graxos de cadeia longa, adicionando unidades de dois carbonos à cadeia de AG existentes.

O gene *SCD* codifica a estearoil-CoA delta-9 dessaturase, uma enzima crucial na formação de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) (Paton, Ntambi, 2009). Essa enzima introduz uma ligação dupla na nona ligação carbono-carbono da extremidade carboxílica de ácidos graxos saturados (SFAs), como o ácido esteárico (18:0), formando ácido oleico (18:1n-9), e o ácido palmítico (16:0), que é convertido em ácido palmitoleico (16:1n-7) (Miyazaki, Bruggink, Ntambi, 2006). O *FADS1*, codifica a enzima multifuncional que catalisa a dessaturação de Δ5 e Δ7 introduzindo uma ligação dupla no 5° e 7° carbono, é uma enzima limitante na síntese de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Ele é essencial para a produção de AG como o ácido araquidônico (n-6) e o EPA (n-3) (Park et al., 2018). A *ELOVL6* codifica uma elongase responsável pela extensão da cadeia de AG e desempenha um papel essencial na elongação PUFAs, como o ácido gamma-linolênico (18:3n-6), convertendo-o em dihomo-gamma-linolênico (20:3n-6). Além disso, a *ELOVL6* também é capaz de alongar ácidos graxos da série n-3, como o ácido tetraenoico (18:4n-3), formando ácido eicosatetraenóico (20:4n-3) (Guillou et al., 2010).

O GAA demonstrou potencial para modificar o perfil de AG, em diferentes espécies animais. Estudos indicaram que o GAA aumentou os níveis de DHA e EPA no músculo (Yang et al., 2021) e elevou as concentrações de ácido linoleico (C18:2n-6) em ruminantes (Azizollahi et al., 2024). Além disso, em porcos tibetanos, a suplementação com GAA resultou no aumento dos níveis de ácido linolênico (C18:3n-3), ácido araquidônico (C20:4n-6) e PUFAs totais no músculo *Longissimus thoracis* (Cui et al.,

2022). Em bovinos holandeses, foi observado um incremento nos níveis de ácido linoleico, ácido araquidônico e ácido miristoleico (C14:1) no músculo após suplementação com GAA (Giraldi et al., 2024). Esses efeitos podem estar relacionados à maior expressão da enzima Δ6-dessaturase, essencial para a síntese de PUFAs a partir de precursores dietéticos.

O GAA, ao modular positivamente a expressão dos genes alongasses e dessaturasses pode ter influenciado diretamente a composição lipídica, impactando a fluidez das membranas e favorecendo processos críticos, como a sinalização celular e a adaptação a condições de estresse metabólico (Cerone, Smith, 2022), contribuindo para a homeostase energética, especialmente em animais confinados submetidos a alto teor de concentrado. Além disso, as vias envolvidas no metabolismo de ácidos graxos e na biossíntese de ácidos graxos insaturados possuem elevada exigência energética. Apesar de ainda ser controverso, o GAA parece ter efeitos hipoglicemiantes, promovendo o aumento da captação de glicose por meio da liberação de insulina (Aynsley-Green, Alberti, 1974; Spasov et al., 2017).

Via de sinalização PPAR

A via PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissomo) é essencial para a regulação do metabolismo lipídico, da adipogênese e da homeostase energética, especialmente em tecidos como os adipócitos e músculos (Herzig, Shaw, 2017). O tratamento com GAA promoveu a regulação positiva dos DEGs *ADIPOQ, PCK2, FABP4, PLIN1* e *SCD*, indicando um possível papel central dessa via na modulação do metabolismo lipídico, principalmente na adipogênese dos animais tratados com GAA.

Os PPARs, apresentam três isoformas: *PPARα, PPARβ/δ, PPARγ* e funcionam como heterodímeros com receptor retinóide-X (RXR). Uma vez que o ligante se liga ao domínio de ligação ao ligante (LBD), ele produz uma modificação covalente da estrutura *PPAR*, ativando os receptores nucleares (Waku et al., 2009). O *PPAR* / RXR ativado se liga a uma sequência específica de DNA (elemento de resposta *PPAR*, PPRE) na região promotora de genes-alvo específicos, induzindo ou reprimindo sua expressão (Rizzo, Fiorucci, 2006). Como por exemplo, induzindo a expressão dos genes responsáveis por ativar as proteínas *ADIPOQ, PCK2, FABP4, PLIN1 e SCD* (Maeda et al., 2001; Albrecht et al., 2011; Muhlhausler, Morrison, McMillen, 2009; Nagai et al., 2004; Miller, Ntambi, 1996; Millward et al., 2010).

O *PPARy* é altamente expresso no tecido adiposo, onde atua como enzima limitante da síntese de AG e desempenha um papel crucial na diferenciação de adipócitos e a deposição de gordura, além de influenciar significativamente a sensibilidade à insulina (Ahmadian et al., 2013). A insulina, por sua vez, promove a captação de glicose, e regula o metabolismo dos lipídios, inibindo o catabolismo dos triglicerídeos por meio da supressão da lipase sensível a hormônios que resulta na diminuição da lipólise e na preservação dos estoques de gordura, favorecendo o armazenamento de lipídios em vez da sua liberação para a circulação. A atividade do PPARγ regula positivamente a *FABP4* (Wang et al., 2022). A *FABP4* é uma das principais proteínas que fazem o transporte de AG para a célula (Schwenk et al., 2010), e fornece AG de cadeia longa e ácido retinóico para seus receptores cognatos no núcleo do adipócito (Woll, Quelle, Sigmund, 2017), facilitando a captação de AG pela célula.

A *ADIPOQ* é uma proteína anti-inflamatória e sensibilizadora de insulina secretada pelo tecido adiposo (Paniagua et al., 2007), ela acelera a adipogênese e prolonga a expressão de *PPARy*, essa resposta aumenta a taxa de acúmulo de gotículas lipídicas citoplasmáticas, e a eficiência da síntese de triacilglicerol e facilita o transporte de glicose responsivo à insulina por meio da expressão do transportador de glicose 4 (Combs et al., 2002; Fu et al., 2005; Shetty et al., 2012).

O *SCD*, promove a desaturação de AG saturados alterando o perfil lipídico das células, isso favorece a formação de triglicerídeos e o armazenamento de gordura (Ravaut et al., 2020). O gene *PLIN* codifica a perilipina-1 que é a proteína associada a gotícula lipídica mais abundante e atua como uma proteína guardiã na regulação da lipólise intracelular em adipócitos (Sztalryd, Brasaemle, 2017). A *PLIN* se envolve e forma uma barreira protetora para evitar que as lipases acessem as gotículas armazenadas em lipídios, levando ao aumento do armazenamento de TAG, diminuindo a hidrólise de TAG mediada por lipase (Brasaemle et al., 2000). Além disso, o *PPARγ* pode se liga ao promotor de *PLIN*, e controlar a regulação de *PLIN* nas gotículas lipídicas (Nagai et al., 2004).

O gene *PCK2* codifica a forma mitocondrial da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK-M), é ativado por *PPARY* e fornece glicerol-3-fosfato para reesterificação de AG (Mandard, Muller, Kersten, 2004). A indução de *PCK2* nos animais tratados com GAA pode indicar ativação coordenada dos mecanismos que favorecem a mobilização e o armazenamento de lipídios, contribuindo para a manutenção da homeostase energética e funcional dos adipócitos.

A ativação de *PPARy* nos adipócitos é capaz de promover a sensibilização à insulina em todo o corpo, sem necessariamente causar modificações no fenótipo (Norris et al., 2003). As vias que regulam a adiposidade e a sensibilidade à insulina são complexas e fundamentais para a manutenção da homeostase metabólica. Por exemplo, a ativação de *PPARy/ADIPOQ* também interage com vias como da AMPK (Yamauchi et al., 2002), promovendo a oxidação de ácidos graxos e o uso eficiente da glicose muscular.

Sugere-se que o GAA, ao ser suplementado na dieta de animais, desempenhe um papel na modulação do perfil de ácidos graxos, contribuindo para o aumento dos teores de ácidos graxos insaturados, apesar de no presente estudo não ter sido avaliado o perfil de AG dos animais, Cui et al. (2022), relataram que o GAA na dieta (800 mg/kg), modificou o perfil de AG de suínos, influenciando a expressão de genes-chave como *SCD, FAS e ACC*, sem modificações nos parâmetros de desempenho e de carcaça, corroborando com o presente estudo. Isso levanta a possibilidade de que o GAA esteja promovendo alterações no perfil de ácidos graxos dos animais sem necessariamente causar mudanças fenotípicas detectáveis.

Regulação da lipólise em adipócitos

Em condições normais, o tecido adiposo regula a síntese de TAG (lipogênese) e sua degradação (lipólise), ajustando-se às demandas fisiológicas. O equilíbrio entre o estímulo lipogênico e a taxa de lipólise é fundamental para evitar elevações excessivas de AG livre no plasma (Girousse, Tavernier, Valle, 2013). Dessa forma, a capacidade dos adipócitos de armazenar lipídios desempenha um papel essencial na prevenção da lipotoxicidade. As gotículas lipídicas nos adipócitos são organelas dinâmicas e essenciais para o gerenciamento dos estoques de lipídios. Essas estruturas abrigam proteínas estruturais específicas e enzimas metabolizadoras de lipídios, que regulam a lipólise nos adipócitos. Os DEGs que enriqueceram esta via foram: *GNAI1, FABP4, PLIN1, CIDEC*.

A *PLIN1* desempenha um papel essencial na regulação da lipólise e no metabolismo lipídico (Londos et al., 1999). Estudos mostram que sua ausência pode levar a um fenótipo magro, caracterizado por adipócitos menores, aumento da lipólise basal e redução da lipólise estimulada (Tansey et al., 2001). A regulação da lipólise está diretamente ligada ao estado de fosforilação da *PLIN1*, quando a *PLIN1* está desfosforilada, a entrada da enzima hormônio sensível a lipase (*HSL*) nas gotículas lipídicas (GLs) é impedida, protegendo os TGA da ação hidrolítica da *HSL*. Por outro

lado, a fosforilação de *PLIN1* pela ação da *PKA* facilita a hidrólise de TGA (Zhai et al., 2010).

O *CIDEC* codifica a proteína 27 específica da gordura (*FSP27*), é predominantemente expresso em adipócitos subcutâneos, sendo regulado negativamente em resposta a uma ingestão reduzida de energia (Magnusson et al., 2008). O *CIDEC* desempenha um papel essencial no crescimento e fusão de GLs em adipócitos, promovendo a formação de GLs uniloculares características do tecido adiposo branco (Xu et al., 2024). Esse processo ocorre pela formação de poros lipídicos na GLs (Gong et al., 2011). Além disso, o *CIDEC* atua de forma cooperativa com a *PLIN1*, que aumenta a eficiência do *CIDEC* na medição da transferência de lipídios e promovendo a fusão de GLs menores com GLs maiores (Sun et al., 2013). Esses mecanismos resultam no aumento do tamanho das GLs, otimizando o armazenamento de lipídios nos adipócitos (Keller et al., 2008), regulando o tamanho das GLs e a manutenção da homeostase lipídica nos adipócitos (Puri et al., 2007; Lyu et al., 2021).

O gene *GNAI1* codifica uma subunidade α inibidora da proteína G (*Gαi*) (Leiss et al., 2020). Durante o estado alimentado, a insulina reduz os níveis de cAMP nos adipócitos, o que resulta na inibição da lipólise (Jaworski et al., 2007). No estado de jejum, o cAMP é essencial para ativar a *PKA*, que fosforila a *HSL* e a *PLIN1*, promovendo a lipólise (Brasaemle, 2007). A prostaglandina E2 (PGE2), ao ligar-se ao reeptor *EP3* acoplado à *Gαi* também reduz os níveis de cAMP, pois inibe a adenilato ciclase (AC) (Jaworski et al., 2009). O *GNAI1*, ao diminuir os níveis de cAMP via inibição da *AC*, bloqueia esse processo, regulando negativamente a lipólise. Isso demonstra o papel regulador do *GNAI1* na supressão da lipólise em resposta a estímulos como a insulina e a *PGE2*.

O mecanismo de ação dos genes supracitados pode ser particularmente relevante no contexto do GAA, que promove maior EF, sugerindo uma adaptação metabólica para preservar os estoques energéticos em condições de alta demanda. A regulação positiva dos DEGs *GNAI1, FABP4, PLIN1 e CIDEC* nos animais tratados com GAA sugere que esse composto pode atuar indiretamente na promoção de adipócitos com maior capacidade de armazenamento lipídico. Essa possível ação do GAA sobre metabolismo lipídico pode também estar relacionada à diferença numérica observada na AOL entre os grupos, ainda que sem significância estatística.

Os resultados sugerem que o GAA contribui para um equilíbrio mais eficiente entre lipogênese e lipólise, protegendo o tecido adiposo de estados de estresse metabólico e favorecendo a EF. Estudos futuros podem ser realizados para explorar os mecanismos diretos de interação entre o GAA e as vias de sinalização metabólica, especialmente no contexto da sinalização mediada por AMPK e PPAR.

Conclusão

A suplementação com ácido guanidinoacético (GAA) na dieta de bovinos Nelore em confinamento, alimentados com concentrado, promoveu melhorias no ganho médio diário (GMD) e na eficiência alimentar (EF) durante o período de adaptação. No entanto, esses efeitos não foram mantidos até o final do período experimental. Observou-se aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, especialmente aqueles envolvidos na lipogênese de novo. Esses genes estão associados a vias de sinalização como AMPK, metabolismo de ácidos graxos, biossíntese de ácidos graxos insaturados, PPAR e regulação da lipólise em adipócitos.

Esses achados contribuem para o avanço do conhecimento sobre os efeitos do GAA em bovinos zebuínos, fornecendo uma base para futuras estratégias voltadas à otimização da adaptação e do desempenho em dietas ricas em grãos. Nesse contexto, estudos adicionais são necessários para confirmar o potencial do GAA em melhorar de forma consistente o desempenho produtivo de bovinos Nelore em confinamento.

Referências bibliográficas

Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., Evans, R. M. (2013). PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, 19(5), 557-566. https://doi.org/10.1038/nm.3159

Albrecht E., Gotoh T., Ebara F., Xu J. X., Viergutz T., Nürnberg G., Maak S., Wegner J. (2011). Cellular conditions for intramuscular fat deposition in Japanese Black and Holstein steers. *Meat Science*, 89(1), 13–20, 2-s2.0-79956151595, https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.03.012.

Alsever, R. N., Georg, R. H., Sussman, K. E. (1970). Stimulation of insulin secretion by guanidinoacetic acid and other guanidine derivatives. *Endocrinology*, 86(2), 332-336.

Ardalan, M., Batista, E. D., Titgemeyer, E. C. (2020). Effect of post-ruminal guanidinoacetic acid supplementation on creatine synthesis and plasma homocysteine concentrations in cattle. *Journal of Animal Science*, 98(3), skaa072. https://doi.org/10.4148/2378-5977.7892

Ardalan, M., Batista, E., Armendariz, C., Titgemeyer, E. (2015). Guanidinoacetic acid as a precursor of creatine for cattle. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, 1(8), 2. https://doi.org/10.4148/2378-5977.1150

Ardalan, M., Miesner, M. D., Reinhardt, C. D., Thomson, D. U., Armendariz, C. K., Titgemeyer, E. C. (2020). Effects of guanidinoacetic acid on lean growth and methionine flux in cattle. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, 6(2), 9. 10.1093/jas/skaa072

Ardalan, M., Miesner, M. D., Reinhardt, C. D., Thomson, D. U., Armendariz, C. K., Smith, J. S., Titgemeyer, E. C. (2021). Effects of guanidinoacetic acid supplementation on nitrogen retention and methionine flux in cattle. *Journal of Animal Science*, 99(6), skab172. https://doi.org/10.1093/jas/skab172

Asiriwardhana, M., Bertolo, R. F. (2022). Guanidinoacetic acid supplementation: a narrative review of its metabolism and effects in swine and poultry. *Frontiers in Animal Science*, *3*, 972868. https://doi.org/10.3389/fanim.2022.972868

Aynsley-Green, A., Alberti, K. G. M. M. (1974). *In vivo* stimulation of insulin secretion by guanidine derivatives in the rat. *Pesquisa Hormonal e Metabólica,* 6(02), *115–120.* 10.1055/s-0028-1093873

Azizollahi, M., Ghasemi, H. A., Foroudi, F., Hajkhodadadi, I. (2024). Effect of guanidinoacetic acid on performance, egg quality, yolk fatty acid composition, and nutrient digestibility of aged laying hens fed diets with varying substitution levels of corn with low-tannin sorghum. *Poultry Science*, 103(2), 103297. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103297

Baldwin, R. L., McLeod, K. R., Baumann, R. G., Connor, E. E. (2006). Influence of carbohydrate infusion on lipogenic enzyme and regulatory protein gene expression in growing beef steers. *The FASEB journal*, 20(5), LB84-LB-84. https://doi.org/10.1096/fasebj.20.5.LB84-a

Belasco, I. J. (1954). New nitrogen feed compounds for ruminants—a laboratory evaluation. *Journal of animal science*, 13(3), 601-610.

Berchielli, T. T., Pires, A. V., Oliveira, S. G. D. (2011). Nutrição de ruminantes.

Bispo, P., Rodrigues, P. O., Bandarra, N. M. (2025). Dietary Oleic Acid and SCD16 and ELOVL6 Estimated Activities Can Modify Erythrocyte Membrane n-3 and n-6 HUFA Partition: A Pilot Study. *Current Issues in Molecular Biology*, *47*(2), 81. https://doi.org/10.3390/cimb47020081

Brasaemle D. L., Rubin B., Harten I. A., Gruia-Gray J., Kimmel A. R., Londos C., (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis, *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38486–38493, https://doi.org/10.1074/jbc.m007322200, 2-s2.0-0034623950.

Brasaemle, D. L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of lipid research*, 48(12), 2547-2559. 10.1194/jlr.R700014-JLR200

Brosnan, J. T., Da Silva, R. P., Brosnan, M. E. (2011). The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino acids*, 40, 1325-1331. 10.1007/s00726-011-0853-y

Ceddia, R. B., Sweeney, G. (2004). Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *The Journal of physiology*, 555(2), 409-421. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.056291

Cerone, M., Smith, T. K. (2022). Desaturases: Structural and mechanistic insights into the biosynthesis of unsaturated fatty acids. *Iubmb Life*, 74(11), 1036-1051. https://doi.org/10.1002/iub.2671

Chen, H., Wang, C., Huasai, S., Chen, A. (2021). Effects of dietary forage to concentrate ratio on nutrient digestibility, ruminal fermentation and rumen bacterial composition in Angus cows. *Scientific reports*, 11(1), 17023. 10.1038/s41598-021-96580-5

Choi, S. H., Park, S. K., Johnson, B. J., Chung, K. Y., Choi, C. W., Kim, K. H., Smith, B. (2015). AMPKα, C/EBPβ, CPT1β, GPR43, PPARγ, and SCD gene expression in single-and co-cultured bovine satellite cells and intramuscular preadipocytes treated with palmitic, stearic, oleic, and linoleic acid. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(3), 411. 10.5713/ajas.14.0598

Cinti, D. L., Cook, L., Nagi, M. N., Suneja, S. K. (1992). The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Progress in lipid research*, 31(1), 1-51. https://doi.org/10.1016/0163-7827(92)90014-A

Combs T. P., Wagner J. A., Berger J., Doebber, T., Wnag, W.-J., Zhang, B. B., Tanen, M., Berg, A. H., O'Rahilly, S., Savage, D. B., Chatterjee, K., Weiss, S., Larson, P. J., Gottesdiener, K., M., Gertz, B. J., Charron, M. J., Sche 9875rer, P. E., Moller, D. E. (2002). Induction of adipocyte complement related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology,* 143(3), 998–1007. https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8662

Cui, Y., Tian, Z., Yu, M., Liu, Z., Rong, T., Ma, X. (2022). Effect of guanidine acetic acid on meat quality, muscle amino acids, and fatty acids in Tibetan pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 998956. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.998956

Duan, B. B., Xu, J. W., Xing, T., Li, J. L., Zhang, L., Gao, F. (2022). Creatine nitrate supplementation strengthens energy status and delays glycolysis of broiler muscle via inhibition of LKB1/AMPK pathway. *Poultry Science*, 101(3), 101653. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101653

Eckhardt, E. P., Kim, W., Jaborek, J., Garmyn, A. J., Kang, D., Kim, J. (2024). Evaluation of guanidinoacetic acid supplementation on finishing beef steer growth performance, skeletal muscle cellular response, and carcass characteristics. *Journal of Animal Science,* 102, skae337. https://doi.org/10.1093/jas/skae337

Eckhardt, E. P., Kim, W., Kim, J. (2022). The Effects of Creatine Monohydrate and Guanidinoacetic Acid Supplementation on Bovine Satellite Cells. *Journal of Animal Science*, 100. https://doi.org/10.1093/jas/skac247.136

Edison, E. E., Brosnan, M. E., Meyer, C., Brosnan, J. T. (2007). Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(6), F1799-F1804. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00356.2007

Foufelle, F., Ferré, P. (2013). Mechanism of Storage and Synthesis of Fatty Acids and Triglycerides in White Adipocytes. In: Bastard, J. P., Fève, B. (eds) Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue. Springer, Paris. https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0343-2_8

Fu Y., Luo N., Klein R. L., Garvey W. T. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of Lipid Research,* 46(7): 1369–79. https://doi.org/10.1194/jlr.M400373-JLR200

Gempel K., Brdiczka D., KaddurahDaouk R., Wallimann T., Kaufhold P., Gerbitz K. D. (1996). The creatine analogue cyclocreatine increases insulin secretion in INS-1

cells via a K+ channel-independent mechanism. *In Diabetologia*, 39, 109-109). 175 FIFTH AVE, NEW YORK, NY 10010: SPRINGER VERLAG.

Girousse, A., Tavernier, G., Valle, C., Moro, C., Mejhert, N., Dinel, A. L., Langin, D. (2013). Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS biology*, 11(2), e1001485. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001485

Giraldi, G. C., Wolschick, G. J., Signor, M. H., Lago, R. V. P., de Souza Muniz, A. L., Draszevski, T. M. R., da Silva, A. S. (2024). Effects of Dietary Guanidinoacetic Acid on the Performance, Rumen Fermentation, Metabolism, and Meat of Confined Steers. *Animals*, 14(17), 2617. https://doi.org/10.3390/ani14172617

Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R. G., Li, P. (2011). Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *Journal of Cell Biology*, 195(6), 953-963. https://doi.org/10.1083/jcb.201104142

Glatz J. F., Luiken J. J., Bonen A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological Reviews,* 90(1):367–417. https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2009

Grant, M. S., Miesner, M. D., Titgemeyer, E. C. (2021). Effects of guanidinoacetic acid, creatine, and choline on protein deposition and creatine status in growing cattle. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, 7(1), 14. https://doi.org/10.4148/2378-5977.8032

Graugnard, D. E., Piantoni, P., Bionaz, M., Berger, L. L., Faulkner, D. B., Loor, J. J. (2009). Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus× Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC genomics, 10*, 1-15. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-142

Guillou H., Zadravec D., Martin P. G., Jacobsson A. (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progress in Lipid Research*, 49, 186–199. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002

Hardie, D. G. (2015). AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Current opinion in cell biology*, *33*, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.004

Herzig, S., Shaw, R. J. (2017). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 19(2), 121–135. 10.1038/nrm.2017.95

Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R. E., Ahmadian, M., Sul, H. S. (2007). Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(1), G1-G4. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00554.2006

Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R. E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K. A., Hellerstein, M. K., Sul, H. S. (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nature medicine*, 15(2), 159-168. https://doi.org/10.1038/nm.1904

Jin, H., Du, Z., Fan, X., Qin, L., Liu, W., Zhang, Y., Ren, J., Ye, C., Liu, Q. (2024). Effect of Guanidinoacetic Acid on Production Performance, Serum Biochemistry, Meat Quality and Rumen Fermentation in Hu Sheep. *Animals*, 14, 2052. https://doi.org/10.3390/ani14142052

Kadowaki, T., Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*, 26(3), 439-451. https://doi.org/10.1210/er.2005-0005

Keller, P., Petrie, J. T., De Rose, P., Gerin, I., Wright, W. S., Chiang, S. H., Nielsen, A. R., Fischer, C. P., Pedersen, B. K., MacDougald, O. A. (2008). Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 14355-14365. 10.1074/jbc.M708323200

Khajali, F., Lemme, A., Rademacher-Heilshorn, M. (2020). Guanidinoacetic acid as a feed supplement for poultry. *World's Poultry Science Journal*, 76(2), 270-291. 10.1080/00439339.2020.1716651

Ladeira, M. M., Schoonmaker, J. P., Gionbelli, M. P., Dias, J. C., Gionbelli, T. R., Carvalho, J. R. R., Teixeira, P. D. (2016). Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 918. 10.3390/ijms17060918

Leiss, V., Schönsiegel, A., Gnad, T., Kerner, J., Kaur, J., Sartorius, T., Nürnberg, B. (2020). Lack of Gαi2 proteins in adipocytes attenuates diet-induced obesity. *Molecular Metabolism*, 40, 101029. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101029

Li, W. J., Zhang, F., Pei, S. T., He, S. S., Xiong, F. L., Lv, L. K., Yang, H. J. (2023). The Effect of Guanidinoacetic Acid Addition on In Vitro Rumen Fermentation

Characteristics and Gas Production of Early-and Late-Stage Sheep-Fattening Diets. *Fermentation*, 9(6), 549. https://doi.org/10.3390/fermentation9060549

Li, Z., Liang, H., Xin, J., Xu, L., Li, M., Yu, H., Zhang, W., Ge, Y., Li, Y., Qu, M. (2021). Effects of dietary guanidinoacetic acid on the feed efficiency, blood measures, and meat quality of jinjiang bulls. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 684295. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684295

Liu, C., Wang, C., Zhang, J., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., PEI, C. X., CHEN, L., Zhang, Y. L. (2021). Guanidinoacetic acid and betaine supplementation have positive effects on growth performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Angus bulls. *Animal Feed Science and Technology*, 276, 114923. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114923

Liu, Y. J., Chen, J. Z., Wang, D. H., Wu, M. J., Zheng, C., Wu, Z. Z., Huo, W. J. (2020). Effects of guanidinoacetic acid and coated folic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion and hepatic gene expression in Angus bulls. *British Journal of Nutrition*, 126(4), 510-517. 10.1017/S0007114520004341

Liu, Y. J., Chen, J. Z., Wang, D. H., Wu, M. J., Zheng, C., Wu, Z. Z., WANG, C., LIU, Q. ZHANG, J., GUO, G., Huo, W. J. (2020). Effects of guanidinoacetic acid and coated folic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion and hepatic gene expression in Angus bulls. *British Journal of Nutrition*, 126(4), 510-517. 10.1017/S0007114520004341

Liu, Y., Zhang, J., Wang, C., Guo, G., Huo, W., Xia, C., Liu, Q. (2022). Effects of guanidinoacetic acid supplementation on lactation performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(3), 1522-1529. https://doi.org/10.1002/jsfa.12249

Londos, C., Brasaemle, D. L., Schultz, C. J., Segrest, J. P., Kimmel, A. R. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. In *Seminars in cell & developmental biology*, 10(1), 51-58. https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0275

Lyu, X., Wang, J., Wang, J., Yin, Y. S., Zhu, Y., Li, L. L., Huang, S., Peng, S., Xue, B., Liao, R., Wang, S.-Q., Long, M., Wohland, T., Chua, B. T., Sun, Y., Li, P., Chen, X.-W., Xu, L., Chen, F.J., Li, P. (2021). A gel-like condensation of Cidec generates lipid-permeable plates for lipid droplet fusion. *Developmental Cell*, 56(18), 2592-2606.10.1016/j.devcel.2021.08.015

Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Matsuzawa, Y. (2001). PPARγ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, 50(9), 2094-2099. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.9.2094

Magnusson, B., Gummesson, A., Glad, C. A., Goedecke, J. H., Jernås, M., Lystig, T. C., Svensson, P. A. (2008). Cell death–inducing DFF45-like effector C is reduced by caloric restriction and regulates adipocyte lipid metabolism. *Metabolism*, 57(9), 1307-1313. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.04.028

Mandard, S., Müller, M., Kersten, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor α target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(4), 393–416. 10.1155/2010/612089

Miller C. W., Ntambi J. M. (1996). Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *PNAS*, 93, 9443–9448. 10.1073/pnas.93.18.9443

Millward, C. A., DeSantis, D., Hsieh, C. W., Heaney, J. D., Pisano, S., Olswang, Y., Croniger, C. M. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1) helps regulate the triglyceride/fatty acid cycle and development of insulin resistance in mice [S]. *Journal of lipid research*, 51(6), 1452-1463. 10.1194/jlr. M005363

Miyazaki, M., Bruggink, S. M., Ntambi, J. M. (2006). Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Δ9-desaturase. *Journal of lipid research*, 47(4), 700-704. 10.1194/jlr.C500025-JLR200

Muhlhausler B. S., Morrison J. L., McMillen I. C. (2009). Rosiglitazone increases the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ target genes in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in the sheep fetus in late gestation. *Endocrinology*, 150(9), 4287–4294. https://doi.org/10.1210/en.2009-0462.

Nagai S., Shimizu C., Umetsu M., Taniguchi S., Endo M., Miyoshi H., Yoshioka N., Kubo M., Koike T. (2004). Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor responsive element within the murine perilipin gene. *Endocrinology*, 145(5), 2346–2356, 2-s2.0-2042437052. https://doi.org/10.1210/en.2003-1180.

Nakamura, M. T., Nara, T. Y. (2004). Structure, function, and dietary regulation of Δ6, Δ5, and Δ9 desaturases. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 345-376. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211

Newman, J. E., Hargreaves, M., Garnham, A., Snow, R. J. (2003). Effect of creatine ingestion on glucose tolerance and insulin sensitivity in men. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 35(1), 69-74.10.1249/01.MSS.0000043288.85309.2

Norris, A. W., Chen, L., Fisher, S. J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A. C., Hirshman, M. F., Rosen, E. D., Goodyear, L. J., Gonzalez, F. J., Spiegelman, B. M., Kahn, C. R. (2003). Muscle-specific PPARγ-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *The Journal of clinical investigation*, 112(4), 608-618. https://doi.org/10.1172/JCI17305.

Oliveras-Ferraros, C., Vazquez-Martin, A., Fernández-Real, J. M., Menendez, J. A. (2009). AMPK-sensed cellular energy state regulates the release of extracellular fatty acid synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(3), 488-493. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.067

Ostojic, S. M. (2016). Guanidinoacetic acid as a performance-enhancing agent. *Amino acids*, 48, 1867-1875. https://doi.org/10.1007/s00726-015-2106-y

Ou-Yang, Q., Lin, X. M., Zhu, Y. J., Zheng, B., Li, L., Yang, Y. C., Chen, L. (2018). Distinct role of nuclear receptor corepressor 1 regulated de novo fatty acids synthesis in liver regeneration and hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology*, 67(3), 1071-1087. 10.1002/hep.29562

Oviedo-Rondón, E. O., Córdova-Noboa, H. A. (2020). The potential of guanidino acetic acid to reduce the occurrence and severity of broiler muscle myopathies. *Frontiers in Physiology*, 11, 909. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00909

Paniagua, J. A., De La Sacristana, A. G., Romero, I., Vidal-Puig, A., Latre, J. M., Sanchez, E., Perez-Jimenez, F. (2007). Monounsaturated fat–rich diet prevents central body fat distribution and decreases postprandial adiponectin expression induced by a carbohydrate-rich diet in insulin-resistant subjects. *Diabetes care*, 30(7), 1717-1723. https://doi.org/10.2337/dc06-2220

Park, H. G., Engel, M. G., Vogt-Lowell, K., Lawrence, P., Kothapalli, K. S., Brenna, J. T. (2018). The role of fatty acid desaturase (FADS) genes in oleic acid metabolism: FADS1 Δ7 desaturates 11-20: 1 to 7, 11-20: 2. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 128, 21-25. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.11.004

Paton, C. M., Ntambi, J. M. (2009). Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(1), E28-E37. https://doi.org/10.1152/ajpendo.90897.2008

Ponticos, M., Lu, Q. L., Hardie, D. G., Partridge, T. A., Carling, D. (1998). Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *The EMBO Jounal*, 17, 1688–1699. https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1688

Puri, V., Konda, S., Ranjit, S., Aouadi, M., Chawla, A., Chouinard, M., Czech, M. P. (2007). Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 34213-34218. 10.1074/jbc.M707404200

Ravaut, G., Légiot, A., Bergeron, K. F., Mounier, C. (2020). Monounsaturated fatty acids in obesity-related inflammation. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 330. https://doi.org/10.3390/ijms22010330

Ren, G., Hao, X., Zhang, X., Liu, S., Zhang, J. (2022). Effects of guanidinoacetic acid and betaine on growth performance, energy and nitrogen metabolism, and rumen microbial protein synthesis in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 292, 115402. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115402

Rizzo, G., Fiorucci, S. (2006). PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Current opinion in pharmacology*, 6(4), 421-427. https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.03.012

Rooney, K., Bryson, J., Phuyal, J., Denyer, G., Caterson, I., Thompson, C. (2002). Creatine supplementation alters insulin secretion and glucose homeostasis in vivo. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 51(4), 518-522. 10.1053/meta.2002.31330

Rorsman, P., Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β-cell electrical activity and insulin secretion: of mice and men. *Physiological reviews*, 98(1), 117-214. https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017

Schwenk, R. W., Holloway, G. P., Luiken, J. J., Bonen, A., Glatz, J. F. (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 82(4-6), 149-154. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.029

Seebacher F., Zeigerer A., Kory N., Krahmer N. (2020). Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108, 72–81. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.011

Shetty S., Ramos-Roman M. A., Cho Y. R. (2012). Enhanced fatty acid flux triggered by adiponectin overexpression. *Endocrinology,* 153(1): 113–22. https://doi.org/10.1210/en.2011-1339

Shi, L., Tu, B. P. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current opinion in cell biology*, *33*, 125-131. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.003

Sousa, L. C. O., Matos, E. M. A., Santos, M. M., Detmann, E., Sampaio, C. B., Sancler-Silva, Y. F. R., Rennó, L. N., Serão, N. V. L., Paulino, P. V. R., Resende, T. L., Gionbelli, M. P., Duarte, M. S. (2024). Dietary guanidinoacetic acid as arginine spare molecule for beef cows at late gestation: effects on cow's performance and metabolism, and offspring growth and development. *Animal Feed Science and Technology*, 116047. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.116047

Spasov, A. A., Vassiliev, P. M., Lenskaya, K. V., Anisimova, V. A., Kuzmenko, T. A., Morkovnik, A. S., kuzmenko, A. Babkov, D. A. (2017). Hypoglycemic potential of cyclic guanidine derivatives. *Pure and Applied Chemistry*, 89(8), 1007-1016. https://doi.org/10.1515/pac-2016-1024

Speer, H. F., Pearl, K. A., Titgemeyer, E. C. (2020). Relative bioavailability of guanidinoacetic acid delivered ruminally or abomasally to cattle. *Journal of Animal Science*, 98(9), skaa282. https://doi.org/10.1093/jas/skaa282

Sun Z., Gong J., Wu H., Xu, W., Wu, L., Xu, D., Gao, J., Wu, J-W., Yang, H., Yang, M., Li, P. (2013). Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nature Communication*, 4(1):1594. 10.1038/ncomms2581

Sztalryd C., Brasaemle D. L. (2017). The perilipin family of lipid droplet proteins: gatekeepers of intracellular lipolysis, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 862(10), 1221–1232, 2-s2.0-85026534189. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.009

Tansey, J. T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D. L., Zee, J. V., Gavrilova, O., Reitman, M. L., Deng, C.-X., Li, C., Kimmel, A. R., Londos, C. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6494-6499. 10.1073/pnas.101042998

Ward, R. E., Woodward, B., Otter, N., Doran, O. (2010). Relationship between the expression of key lipogenic enzymes, fatty acid composition, and intramuscular fat content of Limousin and Aberdeen Angus cattle. *Livestock Science*, 127(1), 22-29. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.09.005

Waku T., Shiraki T., Oyama T., Fujimoto Y., Maebara K., Kamiya N., Jingami H., Morikawa K. (2009). Structural insight into PPARγ activation through covalent modification with endogenous fatty acids. Journal of molecular biology, 9;385(1):188-99. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.039

Walker, J. B. (1979). Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 50(177), 2.

Wang, X. W., Sun, Y. J., Chen, X., Zhang, W. Z. (2022). Interleukin-4-induced FABP4 promotes lipogenesis in human skeletal muscle cells by activating the PPAR γ signaling pathway. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 80(2), 355-366. https://doi.org/10.1007/s12013-022-01063-7

Wedellová, Z., Dietrich, J., Siklova-Vitkova, M., Kolostova, K., Kovacikova, M., Duskova, M., Polák, J. (2011). Adiponectin inhibits spontaneous and catecholamine-induced lipolysis in human adipocytes of non-obese subjects through AMPK-dependent mechanisms. *Physiological research*, 60(1), 139. https://doi.org/10.33549/physiolres.931863

Woll, A. W., Quelle, F. W., Sigmund, C. D. (2017). PPARγ and retinol binding protein 7 form a regulatory hub promoting antioxidant properties of the endothelium. *Physiological genomics*, 49(11), 653-658. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00055.2017

Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological reviews*, 80(3), 1107-1213. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107

Xu, L., Li, L., Wu, L., Li, P., Chen, F. J. (2024). CIDE proteins and their regulatory mechanisms in lipid droplet fusion and growth. *FEBS letters,* 598(10), 1154-1169. https://doi.org/10.1002/1873-3468.14823

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y. A., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine*, 8(11), 1288-1295. https://doi.org/10.1038/nm788

Yang, L. L., Wu, P., Feng, L., Jiang, W. D., Liu, Y., Kuang, S. Y., Zhou, X. Q. (2021). Guanidinoacetic acid supplementation totally based on vegetable meal diet improved the growth performance, muscle flavor components and sensory characteristics of on-growing grass carp (Ctenopharygodon idella). *Aquaculture*, *531*, 735841. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735841

Yi, S., Hu, S., Wang, J., Abudukelimu, A., Wang, Y., Li, X., Zhou, Z. (2024). Effect of Guanidinoacetic Acid Supplementation on Growth Performance, Rumen Fermentation, Blood Indices, Nutrient Digestion, and Nitrogen Metabolism in Angus Steers. *Animals*, 14(3), 401. https://doi.org/10.3390/ani14030401

Zhai, W., Xu, C., Ling, Y., Liu, S., Deng, J., Qi, Y., Londos, C., Xu, G. (2010). Increased lipolysis in adipose tissues is associated with elevation of systemic free fatty acids and insulin resistance in perilipin null mice. *Hormone and metabolic research*, *42*(04), 247-253. 10.1055/s-0029-1243599

Zhang, D., Wei, Y., Huang, Q., Chen, Y., Zeng, K., Yang, W., Chen, J. (2022). Important hormones regulating lipid metabolism. *Molecules*, *27*(20), 7052. https://doi.org/10.3390/molecules27207052

Zhang, H. B., Wang, Z. S., Peng, Q. H., Tan, C., Zou, H. W. (2014). Effects of different levels of protein supplementary diet on gene expressions related to intramuscular deposition in early-weaned yaks. *Animal Science Journal*, 85(4), 411-419. https://doi.org/10.1111/asj.12161

Zhang, J. H., Li, H. H., Zhang, G. J., Zhang, Y. H., Liu, B., Huang, S., Guyader, J., Zhong, R. Z. (2022). Supplementation of guanidinoacetic acid and rumen-protected methionine increased growth performance and meat quality of Tan lambs. *Animal bioscience*, 35(10), 1556. https://doi.org/10.5713/ab.22.0008

Zhang, L., Wang, X., Li, J., Zhu, X., Gao, F., Zhou, G. (2017). Creatine monohydrate enhances energy status and reduces glycolysis via inhibition of AMPK pathway in pectoralis major muscle of transport-stressed broilers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(32), 6991-6999. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02740

Zhao, J. M., Li, F. Q. Y., Li, X. Y., Jiao, D. R., Liu, X. D., Lv, X. Y., Zhao, J. X. (2023). Guanidinoacetic Acid Attenuates Adipogenesis through Regulation of miR-133a in Sheep. *Animals*, 13(19), 3108. https://doi.org/10.3390/ani13193108