

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA DIETA SUPLEMENTAR NA FASE DE CRIA SOBRE A
METILAÇÃO DO DNA DO MÚSCULO *LONGISSIMUS THORACIS*
DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE À DESMAMA**

Lucas Farias Rodrigues

Zootecnista

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA DIETA SUPLEMENTAR NA FASE DE CRIA SOBRE A
METILAÇÃO DO DNA DO MÚSCULO *LONGISSIMUS THORACIS*
DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE À DESMAMA**

Lucas Farias Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Luis Pereira

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

2023

Rodrigues, Lucas Farias

R696e

Efeito da dieta suplementar na fase de cria sobre a metilação do Dna do músculo Longissimus thoracis de bovinos f1 angus-nelore à desmama / Lucas Farias Rodrigues. -- Jaboticabal, 2024

97 p. : tabs., fotos

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

Orientador: Rogério Abdallah Curi

Coorientador: Guilherme Luis Pereira

1. Bovinos. 2. Epigenetics. 3. Nutrigenomics. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta dissertação investiga os padrões de metilação do DNA genômico em bovinos Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos, que foram ou não submetidos à suplementação via *creep-feeding* durante a fase de cria. O estudo visa compreender como esses perfis dietéticos afetam o estado epigenético e a expressão gênica desses animais, considerando seus desempenhos zootécnicos para a produção de carne. Além de contribuir para o avanço do conhecimento científico, essas informações podem ser utilizadas visando melhorar a qualidade da carne produzida e, assim, atender demandas de mercados mais exigentes e otimizar a eficiência da produção.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This dissertation investigates the patterns of genomic DNA methylation in Nelore cattle (*Bos indicus*) and their crosses, which were or were not subjected to supplementation by creep-feeding during the rearing phase. The study aims to understand how these dietary profiles affect the epigenetic state and gene expression of these animals, considering their zootechnical performances for meat production. In addition to contributing to the advancement of scientific knowledge, this information can be used to improve the quality of the produced meat, thus meeting the demands of more demanding markets, and optimizing production efficiency.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DA DIETA SUPLEMENTAR NA FASE DE CRIA SOBRE A METILAÇÃO DO DNA DO MÚSCULO *LONGISSIMUS THORACIS* DE BOVINOS F1 ANGUS-NELORE À DESMAMA

AUTOR: LUCAS FARIAS RODRIGUES

ORIENTADOR: ROGERIO ABDALLAH CURI

COORIENTADOR: GUILHERME LUIS PEREIRA

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

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



Documento assinado digitalmente
ROGERIO ABDALLAH CURI
Data: 20/03/2024 16:53:14 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Ass. Dr. WELDER ANGELO BALDASSINI (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ / UNESP - Botucatu/SP



Documento assinado digitalmente
WELDER ANGELO BALDASSINI
Data: 20/03/2024 09:09:35 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. GERMÁN DARÍO RAMÍREZ ZAMUDIO (Participação Virtual)
Depto. de Zootecnia / FZEA/USP - Pirassununga/SP



Documento assinado digitalmente
GERMAN DARIO RAMIREZ ZAMUDIO
Data: 20/03/2024 11:11:01 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lucas Farias Rodrigues, nascido em 17 de janeiro de 2000, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Filho de Lucivan Ferreira Rodrigues e Rosimeire Farias Sobrinho. Possui graduação em Zootecnia (2017-2021), pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campus de Campo Grande. Durante a graduação foi bolsista PET e ITI-A sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Carneiro Brumatti e Dra. Fabiane Siqueira. Em janeiro de 2022 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, área de Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Rogério Abdallah Curi, sendo bolsista CAPES.

“A verdadeira graça é bela em sua imperfeição, honesta em suas emoções e livre em sua fragilidade.”

Morgana.

Aos meus pais, Lucivan Ferreira Rodrigues e Rosimeire Farias Sobrinho e aos
meus irmãos, Barbara Farias, Matheus Farias Rodrigues, Sophia Farias e
Rodrigues e Rodrigo Farias Rodrigues

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, fonte de inspiração e força em todos os momentos da minha vida, sem ele não conseguiria nada.

Aos meus queridos pais, Lucivan Ferreira Rodrigues e Rosimeire Farias Sobrinho, pelo amor incondicional, apoio e incentivo constantes durante todos os processos de minha vida.

Aos meus amados irmãos, Barbara Farias, Matheus Farias Rodrigues, Sophia Farias Rodrigues e Rodrigo Farias Rodrigues, por compartilharem comigo alegrias e desafios, tornando esta jornada ainda mais especial.

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão ao Professor Rogério A. Curi, meu dedicado orientador, por sua orientação precisa, comprometimento e sabedoria ao longo desta jornada acadêmica.

Ao meu coorientador, o Professor Guilherme Pereira, pela valiosa assistência na área de Bioestatística, que foi fundamental para o sucesso deste estudo.

À minha querida família, por todo o apoio emocional e incentivo ao longo desta jornada acadêmica. Vocês são a base do meu crescimento e meu sucesso.

Quero expressar minha profunda gratidão ao meu companheiro Wilerson Diego Trevisan, cuja presença ao meu lado nesta jornada é realmente especial.

Aos meus amigos Thayze, Raul, Flávia, Rayssa, Cristiana, Rosana, Maryana, Thainá, Ana Luiza, Daniele, Suelen, Maria de Fátima e Maria Lúcia por estarem ao meu lado, compartilhando risos, dores e experiências ao longo destes anos. O apoio e a amizade de vocês são inestimáveis.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a Gustavo Tinoco, meu colega de mestrado, por sua colaboração, apoio e amizade ao longo desta jornada acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante todo o mestrado. E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio Pesquisa ao projeto (processo nº 2019/22621-3).

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

A todos que desempenharam papéis fundamentais na concretização deste trabalho em todos os seus aspectos meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
CAPÍTULO 1	1
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE.....	4
3. OBJETIVOS	4
4. REVISÃO DA LITERATURA	5
5. REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO 2	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
3. RESULTADOS	48
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS	72

RESUMO

Efeito da dieta suplementar na fase de cria sobre a metilação do DNA do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Angus-Nelore à desmama

Diferentes estratégias têm sido utilizadas para aumentar a deposição de gordura intramuscular na carne produzida no Brasil, a partir, principalmente da raça Nelore (*Bos indicus*) e de seus cruzamentos, visando melhorar a qualidade do produto e, desta forma, atender demandas de mercados mais exigentes. Uma dessas estratégias é a suplementação na fase de cria por meio do sistema *creep-feeding*. Entretanto, inexistem ou são escassas as pesquisas que avaliaram o efeito do *creep-feeding* sobre o estado epigenético e a expressão de genes em bovinos Nelore e em seus cruzamentos com raças taurinas (*Bos taurus*). Assim, este estudo teve como objetivo analisar os padrões de metilação do DNA genômico (metiloma) na fase de desmama de bovinos cruzados submetidos ou não à suplementação via *creep-feeding* durante a fase de cria. Foram utilizados 48 bovinos cruzados F1 Angus-Nelore machos, não castrados, meio-irmãos, mantidos a partir dos 30 dias de idade até o desmame sob dois diferentes tratamentos (n = 24/tratamento): grupo 1 (G1) – sem suplementação em *creep-feeding*; e G2 – com suplementação em *creep-feeding*. Os animais foram desmamados aos 210 dias, e, em seguida, foram confinados por 180 dias em baias coletivas (três animais/baia) recebendo dieta contendo 12,6% de volumoso e 87,4% de concentrado a base de milho. À desmama foi realizada coleta de amostras do músculo *Longissimus thoracis* (LT) por meio de biópsia. Após o abate e o resfriamento da carcaça por 24 horas, bifes com 2,54 cm de espessura foram coletados do músculo LT, localizado entre a 12^a e a 13^a vértebras torácicas da meia-carcaça esquerda. Com as amostras do músculo LT do lado esquerdo da carcaça foram determinados: área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de marmorização (IM), teor de gordura intramuscular (IMF) e força de cisalhamento aos sete e 14 dias de maturação (FC7 e FC14). A partir das alíquotas do LT das biópsias da meia carcaça direita foram analisadas as diferenças na expressão gênica global por meio da técnica de sequenciamento do RNA mensageiro (RNA-Seq), entre os tratamentos (G1 vs G2 – 12 indivíduos/grupo) no momento da desmama. A partir do DNA extraído

das amostras do LT das biópsias foram analisados os padrões de metilação do genoma (G1 vs G2 – cinco indivíduos/grupo) a fim de investigar se as diferenças de expressão encontradas foram devido à diferenças de metilação do DNA. Para tanto, foi utilizada a técnica de *reduced regions bisulfite sequencing* (RRBS) em conjunto com pacotes do programa *R* para análises de bioinformática. Observou-se para os animais do grupo G2 um nível médio de metilação em todo o genoma de 4,25% de CpG, 0,54% de CHG (onde H = A, T ou C) e 0,46% de CHH para os animais do grupo G2. Os valores para os animais do grupo G1 foram de 4,07% de CpG, 0,50% de CHG e 0,43% em CHH, resultando em um nível médio de metilação maior (0,18% de CpG, 0,04% de CHG e 0,03% de CHH) nos animais do grupo suplementado na fase de cria. Foram identificadas ao desmame um total de 974 regiões que apresentaram diferenças nos níveis de metilação (DMRs: >25% e valor $q < 0,05$). Dessas regiões, 431 evidenciaram hipermetilação no G2, correspondendo a 44,25% do conjunto total, enquanto 543 evidenciaram hipometilação, representando 55,75%. As 974 DMRs prospectadas se sobrepuseram a 241 genes diferencialmente metilados (DMGs). A partir dos 241 DMGs, 39 genes foram relacionados a DEGs com $\log_2$ do *Fold Change* (FC) maior ou igual a 0,5 entre as duas condições experimentais. Análise de enriquecimento funcional mostrou regulações epigenéticas relacionadas a genes envolvidos com crescimento muscular, sinalização PPAR, adipogênese, resposta à insulina, metabolismo lipídico e imunidade. Essas alterações biológicas potencialmente resultaram nos fenótipos observados nos animais suplementados, incluindo melhores desempenho até a desmama e características de qualidade da carne, como a deposição de gordura intramuscular.

Palavras-chave: Adipogênese, *Bos indicus*, metilação do DNA, nutrigenômica, transcriptoma.

ABSTRACT

EFFECT OF SUPPLEMENTARY DIET AT COW-CALF PHASE ON DNA METHYLATION OF THE *LONGISSIMUS THORACIS* MUSCLE OF F1 ANGUS-NELLORE CATTLE AT WEANING

Different strategies have been used to increase intramuscular fat deposition in beef produced in Brazil, mainly from Nelore cattle (*Bos indicus*) and their crosses, aiming to improve product quality and meet the demands of more demanding markets. One of these strategies is supplementation during the suckling phase through creep-feeding systems. However, there is a lack of research or scarce research evaluating the effect of creep-feeding on the epigenetic state and gene expression in Nelore cattle and their crosses with taurine breeds (*Bos taurus*). Therefore, this study aimed to analyze the patterns of genomic DNA methylation (methylome) during the weaning phase of crossbred cattle subjected or not to creep-feeding supplementation during the suckling phase. Forty-eight F1 Angus-Nelore crossbred male calves, not castrated, half-siblings, were used from 30 days of age until weaning under two different treatments (n = 24/treatment): group 1 (G1) - without creep-feeding supplementation; and group 2 (G2) - with creep-feeding supplementation. The animals were weaned at 210 days, and then confined for 180 days in collective pens (three animals/pen) receiving a diet containing 12.6% forage and 87.4% corn-based concentrate. Samples of the *Longissimus thoracis* (LT) muscle were collected at weaning through biopsy. After slaughter and 24-hour carcass chilling, 2,54 cm thick steaks were collected from the LT muscle, located between the 12th and 13th thoracic vertebrae of the left half-carcass. From the left side LT muscle samples, the following parameters were determined: rib eye area (REA), backfat thickness (BT), marbling index (MI), intramuscular fat content (IMF), and shear force at seven and 14 days of aging (SF7 and SF14). Differences in global gene expression were analyzed from right side LT biopsy samples using messenger RNA sequencing (RNA-Seq) between treatments (G1 vs G2 - 12 individuals/group) at the time of weaning. DNA extracted from LT biopsy samples was analyzed for genome methylation patterns (G1 vs G2 - five individuals/group) to investigate whether the differences in expression were due to DNA methylation differences. The reduced regions

bisulfite sequencing (RRBS) technique was used along with R program packages for bioinformatics analysis. The animals in group G2 showed an average genome-wide methylation level of 4.25% CpG, 0.54% CHG (where H = A, T, or C), and 0.46% CHH, while the values for group G1 were 4.07% CpG, 0.50% CHG, and 0.43% CHH, resulting in a higher average methylation level (0.18% CpG, 0.04% CHG, and 0.03% CHH) in the creep-feeding group during the suckling phase. At weaning, a total of 974 regions with differential methylation levels (DMRs: >25% and q value < 0.05) were identified. Of these regions, 431 showed hypermethylation in G2, accounting for 44.25% of the total set, while 543 showed hypomethylation, representing 55.75%. The 974 identified DMRs overlapped with 241 differentially methylated genes (DMGs). Among the 241 DMGs, 39 were related to differentially expressed genes (DEGs) with a log₂ Fold Change (FC) greater than or equal to 0.5 between the two experimental conditions. Functional enrichment analysis revealed epigenetic regulations related to genes involved in muscle growth, PPAR signaling, adipogenesis, insulin response, lipid metabolism, and immunity. These biological changes potentially resulted in the observed phenotypes in the supplemented animals, including superior performance up to weaning and meat quality characteristics, such as intramuscular fat.

Keywords: Adipogenesis, *Bos indicus*, DNA methylation, meat quality, nutrigenomics, transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Relações esperadas entre o nível de metilação das regiões gênicas e a expressão em organismos eucariotos.47
- Figura 2.** Porcentagem de reads geradas por RRBS alinhadas e não alinhadas ao genoma de referência bovino. RC1, RC2, RC8, RC9 e RC12 – amostras do G1; RC16, RC17, RC19, RC21 e RC24 – amostras do G2. Barra na cor azul: porcentagem de reads alinhadas unicamente a uma região do genoma de referência; barra na cor roxo: porcentagem de reads alinhadas a duas ou mais regiões do genoma de referência; barra na cor preto: porcentagem de reads não alinhadas a regiões do genoma de referência.49
- Figura 3.** Proporção de DMRs entre G1 e G2 detectadas nas diferentes porções do genoma. Sobreposição a regiões intergênicas, de corpo gênico (éxon e íntron) e regiões promotoras (A). Sobreposição a ilhas CpG (CpGi), margens e outras (B).51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados gerados pelo sequenciamento de bissulfito de representação reduzida.....	50
Tabela 2. Conjunto de genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.....	53
Tabela 3. Processos biológicos enriquecidos (GO_BP) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.....	57
Tabela 4. Vias metabólicas enriquecidas (KEGG Pathway) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.....	58
Tabela 5. Vias metabólicas enriquecidas (Reactome Pathway) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.....	59
Tabela 6. Vias metabólicas enriquecidas (WikiPathways) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.....	60

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil situa-se atualmente como o maior exportador mundial de carne bovina e como o segundo maior país em volume de carne produzida e em tamanho de rebanho (USDA, 2021). Aproximadamente 80% do rebanho de bovinos de corte do país é de animais zebuínos (*Bos indicus*), sendo a raça Nelore a mais explorada nas regiões tropicais (ACNB, 2021; EVANGELISTA et al., 2019). Animais cruzados (zebuínos x europeus – *Bos taurus*) têm sido também bastante utilizados uma vez que podem demonstrar melhor desempenho, características de carcaça e qualidade de carne quando comparados à animais zebuínos puros (WOOD, 2020). Por essas razões, tal estratégia é crescentemente adotada no intuito de melhorar os ganhos e desempenho produtivo, especialmente quando os animais são terminados em confinamento. Uma das razões para isso é o fato de animais zebuínos puros apresentarem baixo potencial genético para deposição de gordura intramuscular, o que contribui para que os seus cortes cárneos tenham menor valor agregado.

Nota-se, assim, a crescente utilização de animais cruzados, sobretudo Angus x Nelore, para a produção de carne com maior quantidade de gordura intramuscular e maior maciez, buscando agregar valor ao produto e atender demandas de mercados interessados em carne de melhor qualidade. A deposição de gordura intramuscular na carne pode influenciar positivamente nos atributos organolépticos incluindo sabor, suculência e maciez (MARTINS et al., 2018). Do contrário, com menor teor de gordura intramuscular (marmoreio), tem-se prejuízo aos aspectos sensoriais como, sabor e maciez. Isto ocorre porque à medida que se reduz a adipogênese do tecido intramuscular, estimula-se a fibrogênese, refletindo assim em uma piora na qualidade da carne (DU et al., 2017).

Em bovinos de corte, além da utilização de animais cruzados, algumas estratégias de manejo alimentar têm sido utilizadas para elevar a deposição de gordura intramuscular. A estratégia nutricional conhecida como *creep-feeding* consiste em fornecer alimentação suplementar e privativa para bezerros, que pode ser de grãos ou de forragem, durante a fase de aleitamento (STEWART,

2017) a fim de se obter indivíduos mais pesados ao desmame, encurtando o tempo de acabamento (deposição de gordura) da carcaça para o abate, além de fornecer descanso para a matriz (DANTAS et al., 2010). Nos *Bos taurus* foi constatado que a glicose é a melhor precursora para síntese de ácidos graxos no tecido adiposo intramuscular, sendo o único composto carbônico com maior concentração de seus carbonos no tecido adiposo intramuscular em relação ao subcutâneo, além disso, notou-se também a menor incorporação da glicose em animais pós-púberes (SMITH & CROUSE, 1984). Desta forma, no período de cria, o aporte correto de concentrado, principalmente rico em amido/glicose (grãos), favorece a proliferação e o crescimento dos adipócitos. Isso, devido ao incremento do metabolismo da glicose, podendo levar ao aumento do marmoreio sem, contudo, aumentar a gordura nas vísceras, contribuindo para qualidade geral da carne e para o maior rendimento de carcaça (BALDASSINI et al., 2021). Por consequência, a suplementação durante a fase de cria (nascimento ao desmame), leva à adaptações metabólicas diferentes em relação aos animais que são desmamados de forma convencional (aos 210 dias de idade) (SCHEFFLER et al., 2014). Ademais, de acordo com Stewart (2017), foi demonstrado, por meio de diversos estudos, que a suplementação durante o aleitamento aumenta a gordura intramuscular, entretanto, para manter este aumento, é necessário que os animais permaneçam sendo alimentados com dietas contendo grãos até o abate.

Estudos em animais de produção mostraram que eventos durante a gestação e nos primeiros estágios pós-natais podem ter consequências de longo prazo para a saúde. Aprimorar os métodos de desmame pode ser um fator determinante para melhorar o desempenho e a saúde de bezerros de corte e, consequentemente, o bem-estar animal. O desmame pode ter um efeito negativo sobre o estresse e o sistema imunológico (CARROLL & FORSBURG, 2007; O'LOUGHLIN et al., 2011). Exemplos de práticas que se mostraram benéficas são o estabelecimento de calendário de vacinação e a suplementação energética (RICHESON et al., 2019; PATON, 2013). Os impactos imunológicos do estresse da desmama convencional em bezerros foram documentados (LEFCOURT & ELSASSER, 1995; LYNCH et al., 2010) como um dos principais contribuintes para o surgimento de doenças (BLECHA et al., 1984). Ademais, a ocorrência

de doenças e a necessidade de intervenções ao longo da vida do animal pode prejudicar o desempenho e qualidade do produto final da cadeia de corte.

Atualmente é conhecido que organismos podem responder a diferentes fatores ambientais/nutricionais, exibindo plasticidade fenotípica em decorrência de alterações nos padrões de expressão gênica (ZHANG, 2015). Assim, características dos animais podem ser modificadas por modulações nutricionais, o que significa que as exposições dietéticas podem ter consequências para o crescimento e para a saúde (McKAY & MATHERS, 2011). Há novas evidências de que estímulos nutricionais podem modificar a metilação do DNA e, portanto, afetar a expressão de genes e o fenótipo dos indivíduos (FARIAS et al., 2015; FARKAS et al., 2015; DAY et al., 2015). Ademais, tais modificações no padrão de metilação do DNA podem ocorrer em escala genômica ou em locos específicos (VUCETIC et al., 2010; BOGDARINA et al., 2010; JOUSSE et al., 2011; DUDLEY et al., 2011; ALTMANN et al., 2012).

A metilação do DNA é um processo biológico que resulta na adição de grupos metil (CH₃) a nucleotídeos citosina dos cromossomos e contribui para a rede epigenética que controla a expressão gênica e, conseqüentemente, os fenótipos (ZHANG, 2015). Marcas epigenéticas no genoma, as quais podem modificar a expressão gênica, mas não a sequência de DNA primário, podem ser adquiridas e perdurar ao longo de toda a vida dos indivíduos (MOORE et al., 2022) e podem também ser copiadas de células de uma geração para outra (REIK et al., 2001). A metilação ocorre comumente nas regiões promotoras de genes (regiões regulatórias) e está associada ao silenciamento gênico. Assim, de maneira simplificada, quando as citosinas de sequências CpG não estão metiladas ocorre a expressão gênica e vice-versa (YUFEROV et al., 2010).

Neste contexto, considerando o uso crescente no Brasil de animais cruzados (zebuínos x taurinos) e da suplementação na fase de cria com o objetivo de aumentar a eficiência da produção de carne e produzir carne com maior teor de gordura intramuscular e também de melhorar a saúde e, conseqüentemente, o bem-estar animal, torna-se importante descrever os mecanismos fisiológicos modificados em função deste tipo de manejo. Poucos estudos descreveram a miogênese e a adipogênese durante o período gestacional, neonatal, até o desmame ou mesmo a sua persistência até a vida adulta. Até o momento, nenhum outro estudo foi conduzido com o intuito de

elucidar o efeito do *creep-feeding* sobre a metilação genômica, regulação das vias metabólicas, sinalização da miogenese e da adipogênese e marmorização da carne, estresse e sistema imunológico de bovinos cruzados Nelore x *Bos taurus* suplementados na fase de cria com dieta rica em energia. Deste modo, a obtenção destas informações pode ser de grande importância econômica para os sistemas de produção de animais que visam a obtenção de carne de melhor qualidade para alcançar seus objetivos, ou seja, mercados mais exigentes que pagam por qualidade.

2. HIPÓTESE

O presente estudo propõe a hipótese de que a suplementação de bezerros cruzados (F1) Angus x Nelore, logo após o nascimento, explorando uma janela adipogênica e de hipertrofia muscular de grande importância, pode, por meio, principalmente, de alterações no padrão de metilação do genoma, modificar a expressão de genes e proteínas relacionados ao desenvolvimento do tecido muscular, deposição de gordura intramuscular, estresse e sistema imunológico, favorecendo aspectos quantitativos e qualitativos da carcaça e da carne produzida, bem como a saúde e o bem-estar animal.

3. OBJETIVOS

Dada a falta de informação a respeito do tema, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação na fase de cria (*creep-feeding*) sobre o padrão de metilação do DNA genômico do músculo esquelético (*Logissimus thoracis*) ao abate e sobre as características da carcaça e da carne de bovinos F1 Angus-Nelore.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Produção de carne no Brasil

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com aproximadamente 224,6 milhões de animais, é o segundo maior produtor de carne, gerando mais de nove milhões toneladas métricas de equivalente carcaça por ano (IBGE, 2021). No ano de 2022 o país totalizou mais de 2,26 milhões de toneladas de carne bovina destinadas à exportação, representando um faturamento total em relação as exportações brasileiras de 3,9% (ABIEC, 2023). Desde 2004, o país exporta para mais de 180 países e estas exportações acumularam valores próximos à US\$ 8 bilhões (ABIEC, 2022). Apesar de os números do setor da bovinocultura de corte do Brasil serem expressivos e impactantes, sendo responsável por movimentar mais 8,5% do produto interno bruto (PIB) ou R\$ 913 bilhões (ABIEC, 2022), há possibilidades para aumentos expressivos em decorrência de possíveis melhoras nos setores ligados à produção.

Embora aconteçam aumentos na produção, a produtividade ainda é baixa, indicando um grande potencial para melhora e expansão deste setor da economia. Outros problemas da indústria de carne bovina no Brasil são a falta de uniformidade da idade de abate dos animais e das gorduras de cobertura e intramuscular da carne, fatores estes que influenciam na maciez e palatabilidade do produto, e, por consequência, na satisfação por parte do consumidor (SARCINELLI et al., 2007). Neste sentido, melhorar a eficiência produtiva e a qualidade da carne brasileira são ações estratégicas com benefícios econômicos e ambientais. A integração destes fatores é de fundamental importância na determinação das ações de sucesso e evolução do setor pecuário de corte.

4.2 Ferramentas genômicas e impactos na bovinocultura de corte

A bovinocultura de corte desempenha um papel crítico no abastecimento de carne mundial, sendo uma fonte importante de proteína de qualidade para a alimentação humana. A crescente necessidade de produção mais eficiente e a demanda por carne de alta qualidade têm impulsionado avanços no setor em paralelo ao desenvolvimento de ferramentas genômicas (MENEZES et al., 2013). A integração da genômica proporcionou avanços inovadores na seleção

de animais, no melhoramento genético, na eficiência produtiva, no bem-estar animal e na sustentabilidade ambiental da bovinocultura (HOCQUETTE et al., 2007).

Inicialmente, as ferramentas genômicas na bovinocultura trabalhavam na identificação e aplicação de marcadores genéticos, como os microssatélites, para compreender a diversidade genética e as suas relações com fenótipos animais. Devido à sua alta cobertura genômica, a descoberta e utilização de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) como marcadores genéticos promoveram um avanço significativo, associando regiões genômicas à características como resistência a doenças, crescimento e qualidade de carne (NEJATI-JAVAREMI et al., 1997). Por fim, o sequenciamento completo do genoma bovino (ELSIK et al., 2009) representou um marco biotecnológico importante, estabelecendo uma base sólida para análises mais avançadas no setor. Outras técnicas, como a análise do metiloma e do estado de compactação/acessibilidade do DNA, permitem entender ainda como os genes são ativados ou desativados em diferentes estágios do desenvolvimento e em resposta a diferentes condições ambientais, ajudando a compreender o metabolismo animal e os processos fisiológicos (FANTAPPIÉ, 2013). Com o aprimoramento dessas técnicas junto à seleção e ao acasalamento, a escolha de animais com maior probabilidade de transmitir características desejadas tornou-se mais precisa, reduzindo o tempo necessário para obter características de interesse nas proles animais, melhorando assim o desempenho e a produtividade dos rebanhos.

No futuro breve, o uso de ferramentas genômicas na bovinocultura de corte poderá revolucionar a produção de carne. Técnicas como o CRISPR-Cas9 estão em estudo, permitindo a edição precisa de genes e, conseqüentemente, de características genéticas (IKEDA, 2017). Isso poderá resultar na construção de animais mais resistentes às doenças, com maior eficiência na produção de carne e adaptados à diferentes ambientes e condições climáticas. À medida que a tecnologia genômica avança, essas ferramentas têm o potencial de contribuir ainda mais para a produção sustentável e para a qualidade da carne bovina, atendendo às crescentes demandas do mercado.

4.3 Qualidade da carne

O Brasil é, a cerca de 20 anos, o maior exportador mundial de carne bovina (ABIEC, 2023). Aproximadamente 80% do rebanho de bovinos de corte do país é de animais zebuínos (*Bos indicus*), sendo a raça Nelore a mais explorada nas regiões tropicais (FERRAZ & FELICIO, 2010). Animais cruzados (zebuínos x europeus – *Bos taurus*) têm sido também bastante utilizados uma vez que podem demonstrar melhor desempenho, características de carcaça e qualidade de carne quando comparados à animais zebuínos puros (MIGUEL et al., 2014). Por estas razões, o uso dessa estratégia é progressivamente adotado para melhorar os ganhos genéticos e o desempenho produtivo, especialmente quando os animais são terminados em confinamento.

A deposição de gordura subcutânea na carcaça é condição de fundamental importância para a qualidade dos cortes cárneos de bovinos. Neste sentido, frigoríficos exigem animais que apresentem cobertura de gordura de no mínimo quatro milímetros. Carcaças leves e com pouca gordura subcutânea estão mais sujeitas ao encurtamento das fibras pelo frio (*cold shortening*), resultando em menor maciez da carne, principalmente quando resfriadas rapidamente (TAIT et al., 2005; CHARDULO et al., 2013). Quando destinados à produção de carne, os machos têm sido castrados com o objetivo principal de assegurar a deposição de gordura na carcaça, aumentando a gordura subcutânea. Esta por sua vez, é uma característica muito associada à condição nutricional e o grupo genético utilizado para a produção de carne (LADEIRA et al., 2016).

Entretanto, mais recentemente, com o mencionado aumento da utilização do cruzamento industrial na produção de carne nacional, a quantidade de gordura intramuscular tem recebido maior atenção do consumidor e da indústria por melhorar aspectos organolépticos da carne. Nesse cenário, uma vez que animais zebuínos (predominantes no país) produzem carne com pouca, ou mesmo completa ausência de marmoreio (RUBIANO et al., 2009), tende-se aumentar a utilização de animais cruzados, sobretudo Angus x Nelore, para a produção de carne com maior quantidade de gordura intramuscular e maior maciez, agregando valor ao produto e atendendo demandas de mercados interessados em carne de melhor qualidade.

Em bovinos, a deposição do tecido adiposo intramuscular é resultado do manejo alimentar, nutrição, sexo, idade e grupo genético/genótipo (PFLANZER

& DE FELÍCIO, 2011). A gordura intramuscular é uma característica bastante valorizada em diversos países com consumidores mais exigentes, como Coréia, Japão, Austrália e Estados Unidos (PARK et al., 2018) e mais recentemente no Brasil. A deposição de gordura intramuscular na carne pode influenciar positivamente nos atributos sensoriais incluindo sabor, suculência e maciez (HOCQUETTE et al., 2010). Do contrário, com menos gordura intramuscular (marmoreio), tem-se prejuízo aos aspectos sensoriais. Isto ocorre porque à medida que se reduz a adipogênese no tecido intramuscular, estimula-se a fibrogênese, reduzindo o marmoreio, além de aumentar o conteúdo do tecido conjuntivo diminuindo o perfil de qualidade da carne para o consumidor (DU et al., 2017).

Para o consumidor, os principais aspectos que são considerados na compra de carne no varejo são, por ordem de importância, segurança alimentar (onde a origem e a marca do produto são fundamentais), tipo e tamanho de corte, coloração e gordura de cobertura ou subcutânea (CHARDULO et al., 2013). Ressalta-se que, em mercados consumidores mais exigentes, características como marmoreio, por exemplo, estão sendo gradativamente mais desejadas para o consumo (EGAN, et al., 2001).

A marmorização está intimamente relacionada com a satisfação do consumidor, e, a aceitação global do produto, e parece atingir um patamar considerado ótimo entre 3 e 7% de teor de lipídios na porção intramuscular (HOCQUETTE et al., 2010). A concentração de gordura intramuscular avaliada no *Longissimus thoracis* em animais Nelore, por exemplo, pode variar com o grau de maturidade do indivíduo, atingindo comumente teores entre 2 e 3% (OLIVEIRA et al., 2012; BALDASSINI et al., 2017), embora valores acima de 4% já tenham sido descritos na literatura (PFLANZER & DE FELÍCIO, 2011). O teor de gordura e o perfil de ácidos graxos tem relação estreita com o sabor da carne (CALKINS & HODGEN, 2007), mas também tem atraído o consumidor pelo seu possível efeito na saúde, já que alguns de seus ácidos graxos são apontados como benéficos (HOCQUETTE et al., 2012). Em estudos realizados com o mercado consumidor investigou-se as percepções dos consumidores brasileiros sobre carne marmorizada, e os resultados demonstraram o interesse pela presença e quantidade de gordura subcutânea e de marmoreio, sendo estas

associadas ao prazer sensorial pelo consumo de carne bovina (BOITO et al., 2021).

Em laboratório, a quantidade de gordura intramuscular da carne bovina pode ser medida pelo método químico (BLIGH & DYER, 2017), por determinação da composição centesimal (ENSMINGER, 1976) ou por meio de escores de marmorização de escalas variáveis, desenvolvida em países como os Estados Unidos (USDA, 1997) e Austrália (AUS-MEAT, 2018).

4.4 Desenvolvimento dos tecidos muscular, adiposo e conjuntivo

Os tecidos musculares dos bovinos representam de 55 a 60% do peso total das carcaças, sendo a hiperplasia das fibras musculares (número de fibras) nos animais determinada no segundo trimestre de gestação (PICARD & GAGAOUA, 2020). Por outro lado, de forma geral é descrito que a hipertrofia do tecido muscular (crescimento de fibras) ocorra de forma mais acentuada até a puberdade, sendo dependente da proporção de adesão de fibras satélites (até 50%) que ocorre neste período (LAWRENCE & FOWLER, 2002; CUNNINGHAM, 2004). Fibras satélites, são pequenas células miogênicas mononucleadas, fusiformes, dispostas paralelamente às fibras musculares dentro da lâmina basal que envolve as fibras (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2002). Essas células contribuem para o crescimento do músculo no feto e no período pós-natal e são quiescentes (possuem capacidade de proliferação) no indivíduo adulto. Têm potencial para, quando ativadas, se diferenciarem em mioblastos, o que é estimulado por altas taxas de IGF-1 e citocinas, entre outros (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2002). Tendo em vista que as fibras satélites são gradualmente inativadas ao longo da vida do animal, o estímulo logo no início do crescimento pós-natal é de relevante importância, podendo levar ao desenvolvimento do tecido muscular e, conseqüentemente, a possíveis aumentos no ganho de peso e no rendimento de carcaça.

Em geral, a síntese de tecido adiposo nos animais aumenta à medida que a do tecido muscular diminui, ou seja, após a puberdade, quando o crescimento (ou desenvolvimento) muscular é pequeno e chega-se ao ponto onde o ganho de peso é composto, basicamente, por gordura (OWENS et al., 1995). Entretanto, o desenvolvimento do tecido adiposo não é uniforme, havendo sítios e momentos distintos para a sua deposição (PETHICK et al., 2004). A deposição

de gordura na carcaça inicia-se pela interna (abdominal, renal-inguinal e pélvica), seguida da intermuscular (entre os grupos musculares), da subcutânea (de cobertura) e pôr fim da gordura intramuscular (marmoreio/entremeada). Desta forma, estas deposições ocorrem em períodos específicos do desenvolvimento e, portanto, devem ser, se de interesse, estimuladas, uma vez que a formação pode desacelerar com a idade. Cabe ressaltar que a hiperplasia do tecido adiposo intramuscular (adipogênese) ocorre durante o terço final de gestação e, também, durante um período pós-parto de aproximadamente 250 dias. Neste sentido, a adipogênese inicia-se em período próximo à miogênese primária, persistindo por alguns meses após o nascimento com redução gradual do desenvolvimento de novas células (DU et al., 2015).

Simultaneamente à adipogênese ocorre a fibrogênese, fase em que se origina os primórdios do tecido conjuntivo, responsável pela conexão entre células e órgãos. Assim, os adipócitos e os fibroblastos surgem em paralelo durante o período fetal, pois são oriundos de uma mesma matriz precursora (DU et al., 2015). As células mesenquimais se diferenciam em fibroadipogênicas e então em fibroblastos ou adipócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2019). Ambos os processos (adipogênese e fibrogênese) estão fortemente associados à estrutura dos músculos, com efeito posterior direto sobre aspectos organolépticos da carne. Favorecer a proliferação de linhagens miogênicas, além da diferenciação majoritária de células progenitoras fibroadipogênicas em adipócitos, é de fundamental importância para obter-se carnes de melhor qualidade, com maior teor de gordura entremeada e redução de tecido conjuntivo. Desta maneira, é possível produzir carnes com maciez e palatabilidade superiores (DUARTE, 2013). Para tanto, proporcionar a oferta de nutrientes em quantidade e qualidade adequadas, durante períodos críticos da gestação e do pós-natal, apresenta efeitos importantes sobre o desempenho, desde o maior peso ao desmame (BOHNERT et al., 2013) até carcaças com avaliação de qualidade superior (SHOUP et al., 2015).

4.5 Suplementação de bezerros na fase de cria

Segundo Patel e Srinivasan (2011), a nutrição adequada nos primeiros meses após nascimento induz positivamente o metabolismo da glicose, pelo acoplamento do eixo somatotrópico. Deste modo, a nutrição de alto valor

energético neste período crítico pode favorecer o crescimento do tecido muscular, a deposição de gordura entremeada, bem como, o desenvolvimento do trato reprodutivo, melhorando a qualidade da carcaça de machos e antecipando a puberdade em novilhas. Embora o acetato seja um dos principais doadores de grupos acetil para a deposição de gordura intramuscular, a glicose oriunda de suplementos ricos em concentrado também são contribuidores importantes para a deposição de gordura de marmoreio (SMITH et al., 2018). Portanto, no período de cria, o aporte correto de concentrado, principalmente rico em amido (grãos), favorece a proliferação e o crescimento dos adipócitos. Isso, devido ao incremento do metabolismo da glicose, o que pode levar ao aumento do marmoreio sem, contudo, aumentar a gordura nas vísceras, o que contribui para qualidade geral da carne e para o maior rendimento de carcaça. Em conjunto, a elevação do nível de proteína na dieta dos animais pode também incrementar a deposição de gordura intramuscular. Foi proposto por Lopez et al. (2001) que maiores níveis de proteína bruta na dieta elevam a digestão e a absorção intestinal do amido, e promovem a elevação plasmática de insulina e glicose, o que, por consequência, aumenta a deposição de tecido adiposo intramuscular, por favorecer precursores dos ácidos graxos.

Manejos nutricionais como a suplementação durante a fase de cria (nascimento ao desmame) levam a adaptações metabólicas diferentes em relação aos animais que são desmamados de forma convencional (aos 210 dias de idade) (SCHEFFLER et al., 2014). Neste sentido, dada a importância do desempenho produtivo e da qualidade da carne para a pecuária do país, práticas de manejo que visam os seus incrementos têm sido desenvolvidas e aplicadas nos sistemas de produção nacional, entre as quais a suplementação na fase de cria. Em conformidade, o *creep-feeding* consiste em fornecer alimentação privativa e suplementar, geralmente a base de grãos, para bezerros durante a fase de amamentação (STEWART, 2017) a fim de obter indivíduos mais pesados ao desmame, encurtando o tempo de acabamento da carcaça para o abate, além de fornecer descanso para a matriz (DANTAS et al., 2010). Moisés et al. (2013) relataram que bezerros que receberam *creep-feeding* com amido apresentaram maior deposição de gordura na carcaça quando comparados à animais submetidos ao desmame precoce com suplementação com amido e animais que foram desmamados de modo convencional. Ademais, de acordo com Stewart

(2017), foi demonstrado em diversos estudos que o uso de *creep-feeding* aumenta a gordura intramuscular, e, para manter este aumento, é necessário que os animais continuem sendo alimentados com dietas contendo grãos após o desmame até o abate. Em meta-análise realizada por Carvalho et al. (2019), que incluiu 18 estudos realizados entre 2007 e 2017, encontrou-se que, para bezerros Nelore machos criados a pasto e suplementados entre os 3 a 8 meses de idade, o ganho de peso diário adicional foi ao redor de 200 g e o ganho total à desmama foi de 30 kg quando comparado aos animais não suplementados. Os autores concluíram que a suplementação melhora o ganho de peso pré-desmame, com bezerros respondendo diferentemente de acordo com o sexo, e que os melhores resultados no ganho de peso foram alcançados com quantidades moderadas de suplementos proteicos. De fato, ofertas elevadas de concentrado (0,5% do peso corporal (PC), com teor de proteína bruta (PB) acima de 30%) podem afetar a digestão da fibra do pasto (LOPES et al., 2017), com consequências negativas para a eficiência alimentar (CREMIN Jr. et al., 1991; FAULKNER et al., 1994) e para o desempenho dos bezerros. No entanto, em trabalho conduzido com bovinos F1 Angus x Nelore, Ramírez-Zamudio et al. (2023), observaram maiores peso à desmama e maiores valores de espessura de gordura subcutânea e de gordura intramuscular (marmoreio) em grupo de animais suplementado em *creep-feeding* com 10 g de suplemento/Kg PC (suplementação de 10% do PC) em comparação ao não suplementado.

Ademais, a suplementação de bezerros durante a fase de cria pode desempenhar um papel fundamental na promoção da imunidade destes animais. A fase de cria é um momento crítico na vida dos bezerros, pois eles são mais suscetíveis a doenças e infecções, posto que sua imunidade ainda está em desenvolvimento (COSTA & SILVA, 2014). Neste contexto, está demonstrado que uma estratégia de suplementação adequada pode melhorar significativamente a saúde e a imunidade dos bezerros (KAMADA et al., 2007). Portanto, juntamente a outras práticas no sistema de produção, a complementação da dieta é fundamental e desempenha papel vital na maturação do sistema imunológico do bezerro.

4.6 Metilação do DNA

Mecanismos epigenéticos têm papel central na programação da expressão gênica e incluem um grande número de modificações pós-traducionais de histonas (acetilação e metilação, entre outras), variantes de histonas, metilação de DNA e RNAs de interferência (MARGUERON & REINBERG, 2010). Apesar da ocorrência de todos estes mecanismos de regulação epigenética, somente a metilação de DNA foi mostrada como hereditária na divisão celular (WIGLER et al., 1981). Assim, a metilação do DNA é modificação epigenética mais estável quando comparada com as modificações das histonas (consideradas mais facilmente reversíveis), pois regulam a plasticidade da transcrição do genoma (WONG et al., 2011). A metilação do DNA ocorre em muitos processos fisiológicos importantes, incluindo a inativação de um dos cromossomos X em fêmeas de mamíferos, o *imprinting* e o silenciamento de genes específicos da linha germinativa. Esta alteração no DNA, catalizada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), consiste na adição de um grupamento metil (CH₃) ao carbono da posição cinco da base nitrogenada da citosina (C) em dinucleotídeos CpG, que são regiões em que uma C precede uma G na sequência do DNA (C – grupo fosfato de ligação – G) (FRAGOU et al., 2013).

A metilação é comum em todo o genoma e aproximadamente 3% de todas as citosinas no DNA humano e cerca de 70% dos dinucleotídeos CpG estão metilados. Esses dinucleotídeos se agrupam no genoma, em regiões conhecidas como ilhas CpG (CpGi), que contém pelo menos 200 pares de base e um conteúdo G+C maior que 50%. Em humanos existem aproximadamente 45.000 ilhas CpG, que estão localizadas, em sua maioria, nas regiões promotoras de genes (regiões regulatórias), próximas ao sítio de início da transcrição (TSS). A metilação nessas regiões está associada ao silenciamento gênico e, assim, quando essas ilhas não estão metiladas ocorre a expressão gênica (OLIVEIRA et al., 2010; PORTELA & ESTELLER, 2010; YUFEROV et al., 2010). Dinucleotídeos CpG encontrados fora de ilhas, em regiões conhecidas como "margens (*shores*) da ilha CpG" são menos metilados quando comparadas com as ilhas em si (TSANKOVA et al., 2007; ROBISON & NESTLER, 2011), mas também podem estar associadas com a inativação transcricional. Entretanto, quando a metilação ocorre no corpo dos genes (exons e introns), também pode estar correlacionada com a sua expressão (DOI et al., 2009; IRIZARRY et al.,

2009; PORTELA & ESTELLER, 2010). CpGs no corpo gênico (exons/introns) e mais distantes do TSS podem inibir ou aumentar (desde que o promotor não esteja metilado) a expressão gênica dependendo do contexto genômico. Se a metilação (CpG) do corpo gênico ocorrer numa ilha CpG pode haver correlação negativa ou positiva com a expressão. Por outro lado, se a metilação não ocorrer numa CpGi, vai haver correlação positiva com a expressão, ou seja, com a metilação vai haver aumento de expressão gênica (VARLEY et al., 2013).

Existem três DNMTs com funções diferentes. As DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela adição do grupo metil *de novo*, ou seja, durante a embriogênese, enquanto a DNMT1 é responsável pela manutenção dos padrões de metilação do DNA durante a replicação celular. Assim, a DNMT1 copia as marcas de metilação no filamento parental para o filamento recém-sintetizado após a replicação do DNA. Ademais, as DNMT3A e DNMT3B completam o processo de metilação ao corrigir erros deixados pela DNMT1 (JONES & LIANG, 2009). Até recentemente imaginava-se que o processo de metilação do DNA seria irreversível. No entanto, a citosina metilada pode ser oxidada pela família de dioxigenases Tet α -KG dependentes para produzir 5-hidroximetilcitosina (hmC) (TAHILIANI et al., 2009; DAY et al., 2015). A marca hidroximetil em si é estável, no entanto, é também o primeiro passo na desmetilação ativa, e pela oxidação pela família de proteínas Tet para aldeído ou produtos de carboxilato ou mecanismos de desaminação seguidos de excisão de bases que então apagam a alquilação/metilação de citosinas (SONG et al., 2013).

Em roedores, o que possivelmente pode ser estendido a todos os mamíferos, foram identificados mecanismos de reprogramação epigenética envolvendo a metilação do DNA, conhecidos como ondas de desmetilação e remetilação (SMALLWOOD & KELSEY, 2012). Durante o processo de gametogênese, as células germinativas primordiais sofrem uma perda global de metilação. Posteriormente, essas células passam por um processo chamado metilação *de novo*, que cria metilomas específicos para cada sexo devido às diferenças no desenvolvimento das células germinativas. Após a fertilização, as marcas de metilação são novamente apagadas, com exceção de locais que sofrem *imprinted*, algumas regiões correspondentes à retrotransposons e genes específicos (STOUDER & PAOLONI-GIACOBINO, 2010). Embora esse processo ainda não esteja totalmente elucidado, acredita-se que ocorra de forma

semelhante em bovinos. Este processo indica que algumas regiões metiladas podem ser protegidas e herdadas entre as gerações, influenciando assim os fenótipos dos indivíduos.

4.7 Efeitos da dieta sobre a expressão gênica

A síntese de mRNA na expressão gênica é controlada, entre outros, pela ligação de fatores de transcrição em sequências específicas do DNA, no denominado controle genético, e pela metilação do DNA, modificações covalentes das histonas, interação dos mRNAs com micro-RNAs, nos controles epigenéticos (MENCK & SLUYS, 2017). É conhecido que muitos organismos podem responder a diferentes fatores ambientais/nutricionais, exibindo plasticidade fenotípica em decorrência de alterações nos padrões de expressão gênica (ZHANG, 2015). Neste sentido, o fenótipo dos animais pode ser modificado por modulações nutricionais por meio de mecanismos biológicos, o que significa que as exposições dietéticas podem ter consequências para o crescimento e para a saúde (McKAY & MATHERS, 2011). O interesse nos efeitos de nutrientes sobre o genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma em células, tecidos ou organismos constitui o ramo da genômica conhecido como nutrigenômica (DOLINOY & JIRTLE, 2008; SIMOPOULOS, 2010).

No controle genético da expressão gênica, a expressão dos fatores de transcrição e, conseqüentemente a sua atuação, é dependente do tecido, do estágio de desenvolvimento e da situação fisiológica do organismo. Deste modo, a dieta pode ter um efeito significativo sobre a expressão de fatores de transcrição, que são proteínas-chave envolvidas na regulação da expressão gênica. Os fatores de transcrição são responsáveis por ligar-se a regiões específicas do DNA (regiões gênicas reguladoras – *enhancers* e *silencers*) e controlar a ativação ou inibição da transcrição de um outro grande número de genes (KOLOVOS ET AL., 2012). Desta forma, efeitos nutricionais têm uma importância diferenciada na construção do transcriptoma de um tecido.

Diferentes componentes da dieta, como nutrientes, compostos bioativos e metabólitos, podem modular a expressão de fatores de transcrição. De acordo com McNeel e Mersmann (2000), a disponibilidade de nutrientes pode influenciar a expressão de fatores de transcrição relacionados ao metabolismo. Como exemplo, tem-se o receptor- α ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR-

α), o primeiro fator de transcrição identificado como um potencial receptor de ácidos graxos (BENATTI et al., 2004). O PPAR- α desempenha um papel na regulação de uma extensa rede de genes envolvidos no metabolismo da glicose e de lipídios. Em modelos animais, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) ω -6 e ω -3 são potentes indutores da oxidação de ácidos graxos e potentes supressores da síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis. É possível que os PUFA sejam ativadores de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) (JUGE-AUBRY, et al., 1995; POWER & NEWSHOLME, 1997). Os PPAR e as proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT (C/EBP) são duas famílias de fatores de transcrição que desempenham papéis importantes na diferenciação de adipócitos e na lipogênese (LADEIRA et al., 2016).

Nos últimos anos, foi elucidado que estímulos ambientais, como os nutricionais, podem modificar a metilação do DNA e, portanto, afetar a expressão de genes (FARIAS et al., 2015; FARKAS et al., 2015; DAY et al., 2015). Assim, a metilação do DNA, ou imprinting, é considerada componente chave de uma rede epigenética complexa que afeta o transcriptoma de um determinado conjunto de células (KUCHARSKI et al., 2008). A nutrição adequada nos primeiros meses após nascimento induz positivamente o metabolismo da glicose e causa efeitos a longo prazo na saúde e desempenho devido a alterações epigenéticas conhecidas como imprinting metabólico (PATEL & SRINIVASAN, 2011). Este processo epigenético inclui modificações na expressão dos genes que não são explicadas por alteração na sequência do DNA e que podem ocorrer durante períodos de reprogramação genética como, por exemplo, nos terços médio e final da gestação, em que tecidos, como o muscular e o adiposo são formados. Isto pode, também, ocorrer em um curto período pós-parto (até 250 dias de idade, aproximadamente) (ARTHINGTON & MORIEL, 2014; ZHANG, 2015). Todas estas modificações por sua vez, podem resultar em mudanças dentro da fisiologia dos animais durante sua vida (BURRIS & BACCARELLI, 2014).

Existem evidências crescentes que sustentam que nutrientes podem modificar o padrão de metilação do DNA, seja em escala global ou em *loci* específicos (JOUSSE et al., 2011; DUDLEY et al., 2011; ALTMANN et al., 2012). São, até o momento, conhecidas três maneiras pelas quais a nutrição influencia os padrões de metilação do DNA, entre as quais, pelo fornecimento de

substratos necessário para a metilação adequada do DNA; e pela provisão de cofatores que modulam a atividade enzimática das DNA metil transferases (DNMT). Como metil-doador universal para proteínas metiltransferase, a S-denosilmetionina (SAM) é sintetizada no ciclo da metionina a partir de vários precursores presentes na dieta (McKAY & MATHERS, 2011; FEIL & FRAGA, 2012). Todos estes precursores entram em pontos diferentes na via da metionina e contribuem para a síntese líquida do SAM. Assim, a disponibilidade reduzida de SAM resulta na hipometilação global do DNA, e vice-versa (ZHANG, 2015). É bem conhecido que as DNMTs exigem o SAM como um co-fator para sua ativação total. Doadores de metila da dieta podem contribuir para modular a atividade das DNMTs alterando a concentração intracelular de SAM. Além de uma regulação indireta dos padrões de metilação do DNA por meio da modulação de SAM, vários outros compostos da dieta podem também influenciar diretamente a expressão ou atividade das DNMTs (MUKHERJEE et al., 2015).

4.8 Efeito da desmama sobre a saúde animal

A percepção e a opinião do consumidor são preocupações dos dias atuais para a indústria agropecuária. Este desafio tem tornado mais difícil para os produtores continuarem com métodos tradicionais de produção. Há uma tendência do meio científico e do consumidor em melhorar o bem-estar animal, criando, por exemplo, uma necessidade de pesquisas em métodos de manejo de baixo estresse para bezerros de corte. Vários estudos exploraram diferentes métodos de desmame e as vantagens de uma estratégia de baixo estresse nos parâmetros de desempenho subsequentes (HALEY et al., 2005, ENRÍQUEZ, 2009). A forma mais tradicional de desmamar os bezerros de suas mães é apartá-los de forma abrupta e alojá-los em diferentes localizações, o que representa vários desafios para a cria. Lefcourt e Elsasser (1995) foram pioneiros ao medir os níveis de catecolaminas em bezerros que haviam sido separados abruptamente de suas mães e demonstrar a resposta fisiológica negativa ao estresse que os bezerros experimentam após este tipo de desmame.

Os ganhos em saúde e em desempenho de bezerros de corte é um fator determinante de incentivo para melhorar o método de desmame. O estresse do desmame pode ter um efeito negativo no sistema imunológico (CARROLL & FORSBURG, 2007; O'LOUGHLIN et al., 2011). Os impactos imunológicos do

estresse do desmame em bezerros foram documentados (LEFCOURT & ELSASSER, 1995; LYNCH et al., 2010) como um dos principais contribuintes para o surgimento de doenças (BLECHA et al., 1984).

Sabendo que o estresse do desmame induz uma resposta fisiológica dos hormônios adrenais, levantou-se a questão lógica de como esses hormônios afetam o sistema imunológico dos bezerros. Um dos primeiros estudos a investigar o impacto do estresse do desmame no sistema imunológico foi conduzido por Lynch et al. (2010), no qual concluíram que estratégias de desmame para minimizar o estresse devem ser consideradas para proteger a função imunológica dos bezerros. O estresse do desmame certamente inclui a separação materna, em conjunto a exposição de estressores adicionais, como novos ambientes e mudanças na dieta (CARROLL & FORSBERG, 2007). A ocorrência de estresse e doenças e a consequente necessidade de intervenções ao longo da vida pode prejudicar o desempenho animal e qualidade dos produtos, como a carne.

Exemplos de práticas que se mostraram benéficas são o estabelecimento de calendário de vacinação e de transporte e a suplementação energética (RICHESON et al., 2019; PATON, 2013). A dieta ao longo da fase de cria é uma preocupação para os produtores de bezerros, sendo o intuito aumentar o peso ao desmame e o valor econômico que receberão na comercialização da carcaça, o que dependerá de os bezerros estarem saudáveis com ingestão adequada de concentrado antes de passar para a próxima etapa de produção. O momento do desmame e o estado nutricional do bezerro nesse período também podem afetar a capacidade do animal de aumentar a quantidade de tecido adiposo intramuscular e, assim, melhorar a qualidade da carne (MOISÁ et al., 2014). Assim, o estresse do desmame pode alterar a qualidade da carcaça, ressaltando a importância de pesquisas nesta área.

4.9 Efeitos dos adipócitos sobre o sistema imunológico

O tecido adiposo é, tradicionalmente, reconhecido pelo seu papel no armazenamento energético estocando triacilglicerídeos, todavia estudos mais recentes o elucidaram como um componente biologicamente ativo, capaz de interagir com diversos componentes fisiológicos, impactando diversos aspectos do metabolismo animal, incluindo a imunidade (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo é composto principalmente por células adiposas, os adipócitos, porém carrega células imunes, células do estroma vascular, células em diferenciação e células nervosas, todas elas sujeitas a influências do tecido (AHIMA & FLIER, 2000). A conexão entre o tecido adiposo e o sistema imunológico está sendo mais bem elucidada, visto que tem um papel fundamental na modulação da resposta imune, principalmente pela secreção de biomoléculas em decorrência de condições ambientais vivenciadas pelos animais, como as dietas, por exemplo.

O tecido adiposo secreta uma ampla gama de marcadores bioativos, conhecidos como adipocinas. Entre essas adipocinas, destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), resistina e adiponectina, que desempenham papéis cruciais na modulação das respostas inflamatórias e imunológicas. Essas adipocinas não funcionam apenas localmente no tecido adiposo, mas também têm efeitos sistêmicos, influenciando a comunicação entre o tecido adiposo e os diferentes componentes do sistema imunológico (LUO & LIU, 2016). Alguns processos inflamatórios podem ser desencadeados pela liberação excessiva de adipocinas pró-inflamatórias produzidas no tecido adiposo. O TNF- α e a IL-6, por exemplo, estão associados na indução de um estado pró-inflamatório, que pode prejudicar a função dos leucócitos e comprometer a resposta imune (POPKO et al., 2010). Além disso, a resistina parece estar envolvida na resistência à insulina e na ativação de vias inflamatórias, contribuindo para uma pior imunocompetência (TRIPATHI et al., 2020). Por outro lado, a adiponectina, uma adipocina com propriedades anti-inflamatórias e reguladora da insulina, demonstrou ter efeitos benéficos na modulação da resposta imune. Estudos indicaram que a adiponectina provoca a diminuição da reatividade de linfócitos T, produção de linfócitos B, aderência de monócitos, ativação de TLR4, um receptor de membrana relacionado a ativação e produção de mediadores inflamatórios, e amplia a produção de compostos anti-inflamatórios no organismo (GHIGLIOTTI et al., 2014). Além disso, a adiponectina modula a adaptação metabólica, visando o sistema imunológico inato, incluindo a plasticidade e polarização dos macrófagos, a atividade linfocitária semelhante à inata e outras funções das células imunes inatas (LUO & LIU, 2016). Pecoraro et al. (2017) mostraram que a expressão da adiponectina é diminuída em pacientes portadores de imunodeficiência comum variável, uma

doença decorrente de imunodeficiência primária caracterizada por níveis séricos reduzidos de IgG, IgA e/ou IgM, o que resulta em produção prejudicada de anticorpos. Por fim, foi demonstrado que a adiponectina regula o metabolismo ósseo e a ingestão alimentar (KUBOTA et al., 2007; KAJIMURA et al., 2013; WU et al., 2014).

Assim, sugere-se que o equilíbrio entre as adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias exerça uma influência direta sobre a eficácia da resposta imunológica em animais. Nesse contexto, um perfil dietético adequado para os bezerros na fase de aleitamento pode desempenhar um papel crucial na adipogênese e lipogênese, consequentemente, na promoção de uma melhor imunidade. Desta forma, o fornecimento de nutrientes em conformidade com os processos fisiológicos que ocorrem ao longo da vida do animal garante melhores oportunidades para seu crescimento saudável, influenciando também as características da carne que será produzida.

4. 10 Relação da metilação do DNA com o crescimento, a deposição de gordura e o sistema imune

A metilação do DNA desempenha um papel vital no controle de numerosos processos biológicos e vias metabólicas. Essas modificações têm o potencial de desencadear alterações fenotípicas que podem, por sua vez, influenciar significativamente o desempenho dos animais de produção (FRANCO, 2013). Em particular, a regulação epigenética da expressão gênica pela metilação pode estar estreitamente associada a fatores de produção, como o desenvolvimento muscular, o acúmulo de gordura e a capacidade do sistema imunológico em animais. Isso, por sua vez, tem relação crítica com a produção de carne de alta qualidade, eficácia na produção e também na promoção do bem-estar dos animais. Em sistemas de produção de carne mais otimizados e exigentes, essas descobertas podem representar, no futuro, uma oportunidade inovadora para a aplicação de tecnologias visando ganhos de produtividade.

No que diz respeito ao crescimento muscular, a metilação do DNA pode influenciar a ativação ou a inibição de genes envolvidos na diferenciação e incidência das células musculares (BLAU et al., 1985; HUPKES et al., 2011). A metilação de alguns genes relacionados ao crescimento muscular pode resultar em um maior desenvolvimento da massa muscular, o que é benéfico na

produção de carne (NAITO et al., 2016). Neste cenário, algumas desmetilações de genes podem inibir o desenvolvimento muscular excessivo, interferindo na diferenciação miogênica e afetando a composição e o volume muscular (ZHAO et al., 2022). Um exemplo desse mecanismo é a metilação do DNA correspondente ao gene do hormônio do crescimento (*GH1*), que pode ocorrer em algumas espécies de produção. O hormônio do crescimento (GH) desempenha um papel fundamental na promoção do crescimento e no aumento da massa muscular, além de influenciar o metabolismo da gordura. Alguns estudos em animais de produção demonstraram que os perfis de metilação de genes relacionados ao GH resultou em diferentes padrões de crescimento, com animais fenotipicamente superiores (ZHONG et al., 2014).

Quando relacionada à deposição de gordura, a metilação do DNA também desempenha um papel regulador. Genes envolvidos no metabolismo de lipídios e no acúmulo de gordura podem sofrer influências de funcionamento por meio da metilação (ZHANG et al., 2020). A metilação de genes que promovem a deposição de gordura subcutânea ou intramuscular pode afetar a quantidade e a distribuição de gordura na carne bovina (ZHAO et al., 2011). Neste sentido, tal fator pode ser explorado visando atender às preferências do consumidor em relação ao tipo de carne. Um estudo com o gene *FASN* bovino (responsável pela síntese de ácido graxo) revelou que seus diferentes genótipos desempenham um papel significativo na determinação da qualidade da carne (ROY et al., 2005). Além disso, foi evidenciado que a metilação de genes da família *FASN* (*FASNs*), pode influenciar as classificações de marmoreio e levar à diferentes composições de ácidos graxos saturados e insaturados na carne (OH et al., 2012). Os genes da família *FADS*, como por exemplo o *FADS6* que, por sua vez, codificam proteínas pertencentes ao grupo das dessaturases, cuja função é regular a concentração de ácidos graxos poliinsaturados, também sofrem ações da metilação (CHEN et al., 2019). Portanto, esses e demais genes sujeitos à regulação por metilação desempenham um papel essencial na modulação da composição de ácidos graxos na carne, influenciando diretamente suas características de sabor e textura.

A relação entre a metilação do DNA e o sistema imunológico é complexa e multifacetada. A metilação pode afetar a resposta imune de várias maneiras, incluindo a regulação de genes envolvidos na diferenciação e função de células

imunológicas, na produção de citocinas e na ativação de vias de sinalização (SMITH et al., 2011). Além disso, a metilação também pode influenciar a plasticidade das células imunológicas, afetando sua capacidade de responder a estímulos ambientais (GUAN et al., 2011). Por exemplo, a metilação anormal de genes regulatórios em células imunológicas tem sido associada a distúrbios autoimunes, onde o sistema imunológico ataca erroneamente células saudáveis do próprio organismo (LI et al., 2009). Além disso, a metilação de genes envolvidos na resposta à patógenos pode afetar a capacidade do sistema imunológico em processos infecciosos (MARINUS & CASADESUS, 2009), afetando assim a função celular e a resposta dos organismos ao ambiente. Assim, a variação no padrão de metilação do DNA contido nos adipócitos das células musculares pode levar a diversas mudanças na fisiologia animal, fazendo-se necessárias pesquisas com o objetivo de entender a sua construção, ou seja, o metiloma.

4.11 Sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS) na análise de metilação do DNA

Com o advento das tecnologias de sequenciamento de próxima geração, o sequenciamento de DNA convertido em bissulfito (BS-seq) tornou-se um método popular para estudar a metilação do DNA em larga escala. Uma abordagem enriquecida, chamada sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (RRBS), está se tornando cada vez mais comum para a análise de perfis de metilação em nível de nucleotídeo único (LIU et al., 2020; WAN & BELL, 2020; MEISSNER, 2005). O RRBS foi desenvolvido para fornecer informações detalhadas sobre os padrões de metilação em regiões específicas do genoma, sem a necessidade de sequenciar o genoma completo, tornando o processo de menor custo quando comparado a outras técnicas (STOCKWELL et al., 2014). Portanto, trata-se de um método para estudar a metilação do DNA em escala genômica com resolução de nucleotídeo único, caracterizando-se como uma variação do sequenciamento de conversão de bissulfito do genoma completo (WGBS). Em comparação ao WGBS e tomando-se o genoma humano, o RRBS reduz as sequências geradas em mais de 95% para capturar CpGs de cerca de 80% de ilhas CpG, de mais de 50% dos promotores, bem como uma

porcentagem relativamente menor de outras regiões reguladoras genômicas, como *enhancers* e *silencers* (WAN & BELL, 2020).

O RRBS utiliza a digestão com enzima de restrição, geralmente a *MspI*, que possui sequência de reconhecimento 5'-CCGG-3', produzindo fragmentos que conterão pelo menos um dinucleotídeo CpG. Desta forma, a técnica permite a seleção e sequenciamento preferencial de regiões ricas em CpG (DOHERTY & COULDREY, 2014). Além do tratamento prévio do DNA com *MspI*, as bibliotecas genômicas são tratadas com bissulfito de sódio, o que leva a modificação da estrutura química da citosina não metilada (C) para uma uracila (U) e posteriormente para uma timina (T). Isso não ocorre com a 5-mC, que permanece como citosina (C), o que possibilita a posterior distinção *in silico* de citosinas metiladas e não metiladas, permitindo acessar a porcentagem de citosinas metiladas nas regiões representadas do genoma.

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

5. REFERÊNCIAS

ACNB. Notícia – A origem. Associação dos Criadores de Nelore do Brasil. Disponível em: <http://www.nelore.org.br/Noticia> 2021. Acesso em: 22 de maio. 2023

AHIMA R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 327-332, 2000.

ALTMANN, S.; MURANI, E.; SCHWERIN, M.; METGES, C. C.; WIMMERS, K.; PONSUKSILI, S. Somatic cytochrome c (CYCS) gene expression and promoter-specific DNA methylation in a porcine model of prenatal exposure to maternal dietary protein excess and restriction. **British journal of nutrition**, v. 107, n. 6, p. 791-799, 2012.

ARTHINGTON, J. D.; MORIEL, P. Impressão Metabólica De Bezerros Desmamados Precocemente: Efeitos no Desempenho Pós Desmama em Machos e Fêmeas. **Anais... XVIII Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos. Uberlândia**, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. Beef Report 2022. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>. Acesso em: 20 de maio. 2023

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. Beef Report 2023. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beefreport-2023-capitulo-02/>. Acesso em: 20 de maio. 2023.

AUS-MEAT, M. Handbook of australian beef processing. **The Aus-Meat language**, 2018.

BALDASSINI, W. A.; CHARDULO, L. A. L.; SILVA, J. A. V.; MALHEIROS, J. M.; DIAS, V. A. D.; ESPIGOLAN R.; PADILHA, P. M. Meat quality traits of Nellore bulls according to different degrees of backfat thickness: a multivariate approach. **Animal Production Science**, v. 57, n. 2, p. 363-370, 2017.

BALDASSINI, W. A.; FERREIRA, M. S.; SANTIAGO, B. M.; CHARDULO, L. A. L.; CURI, R. A.; LANNA, D. P.; NETO, O. R. M. Intake, performance, meat quality and fatty acid profile of Nellore bulls finished in feedlot with diets containing dry corn gluten feed. **Livestock Science**, v. 253, p. 104715, 2021.

BENATTI, P.; PELUSO, G.; NICOLAI, R.; CALVANI, M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 281-302, 2004.

BLAU, H. M.; PAVLATH, G. K.; HARDEMAN, E. C.; CHIU, C. P.; SILBERSTEIN, L.; WEBSTER, S. G.; WEBSTER, C. Plasticity of the differentiated state. **Science**, v. 230, n. 4727, p. 758-766, 1985.

BLECHA, F; BOYLES, S. L.; RILEY, J. G. Shipping suppresses lymphocyte blastogenic responses in Angus and Brahman× Angus feeder calves. **Journal of animal science**, v. 59, n. 3, p. 576-583, 1984.

BLIGH, E. G.; W. J. DYER. Ask not what your postdoc can do for you.. **Communications of the ACM**, v. 61, n. 1, p. 42-44, 2017.

BOGDARINA, I.; HAASE, A.; LANGLEY-EVANS, S.; CLARK, A. J. Glucocorticoid effects on the programming of AT1b angiotensin receptor gene methylation and expression in the rat. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9237, 2010.

BOHNERT, D. W.; STALKER, L. A.; MILLS, R. R.; NYMAN, A.; FALCK, S. J.; COOKE, R. F. Late gestation supplementation of beef cows differing in body condition score: effects on cow and calf performance. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 11, p. 5485-5491, 2013.

BOITO, B.; LISBINSKI, E.; CAMPO, M. D. M.; GUERRERO, A.; RESCONI, V.; DE OLIVEIRA, T. E.; BARCELLOS, J. O. J. Perception of beef quality for Spanish and Brazilian consumers. **Meat Science**, v. 172, p. 108312, 2021.

BURRIS, H. H.; BACCARELLI, A. A. Environmental epigenetics: from novelty to scientific discipline. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 113-116, 2014.

CALKINS, CHRIS R.; HODGEN, JENNIE M. A fresh look at meat flavor. **Meat science**, v. 77, n. 1, p. 63-80, 2007.

CARROLL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 105-149, 2007.

CARVALHO, V.V.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; LOPES, S.A.; RENNÓ, L.N.; SAMPAIO, C.B.; SILVA, A.G. A meta-analysis of the effects of creep-feeding supplementation on performance and nutritional characteristics by beef calves grazing on tropical pastures. **Livestock Science**, v. 227, p. 175-182, 2019.

CHARDULO, L. A. L.; SILVEIRA, A. C.; VIANELLO, F. Analytical aspects for tropical meat quality assessment. In: **Food quality, safety and technology**. Springer Vienna, 2013. p. 53-62.

CHEN, Z.; CHU, S.; XU, X.; JIANG, J.; WANG, W.; SHEN, H.; YANG, Z. Analysis of longissimus muscle quality characteristics and associations with DNA methylation status in cattle. **Genes & genomics**, v. 41, p. 1147-1163, 2019.

Costa, P.M. J. R.; SILVA, L. C. M. **Boas práticas de manejo – bezerros leiteiros**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2014.

CUNNINGHAM, J. **Tratado de fisiologia veterinária** – 3ª edição. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan, 2004.

DANTAS, C. C. O.; DE MATTOS NEGRÃO, F.; GERON, L. J. V.; MEXIA, A. A. O uso da técnica do Creep-feeding na suplementação de bezerros. **PUBVET**, v. 4, p. 899-904, 2010.

DAY, JEREMY J.; KENNEDY, ANDREW J.; SWEATT, J. DAVID. DNA methylation and its implications and accessibility for neuropsychiatric therapeutics. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 55, p. 591-611, 2015.

DOHERTY, R.; COULDREY, C. Exploring genome wide bisulfite sequencing for DNA methylation analysis in livestock: a technical assessment. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 126, 2014.

DOI, A.; PARK, I. H.; WEN, B.; MURAKAMI, P.; ARYEE, M. J.; IRIZARRY, R.; FEINBERG, A. P. Differential methylation of tissue-and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1350-1353, 2009.

DOLINOY, D. C.; JIRTLE, R. L. Environmental epigenomics in human health and disease. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 49, n. 1, p. 4-8, 2008.

DU, M.; FORD, S. P.; ZHU, M. J. Optimizing livestock production efficiency through maternal nutritional management and fetal developmental programming. **Animal Frontiers**, v. 7, n. 3, p. 5-11, 2017.

DU, M.; WANG, B.; FU, X.; YANG, Q.; ZHU, M. J. Fetal programming in meat production. **Meat science**, v. 109, p. 40-47, 2015.

DUARTE, F. O.S. **Terminação de bovinos com farelo de mesocarpo de babaçu: influência na maciez da carne e fatores relacionados**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

DUDLEY, K. J.; SLOBODA, D. M.; CONNOR, K. L.; BELTRAND, J.; VICKERS, M. H. Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e21662, 2011.

EGAN, A. F.; FERGUSON, D. M.; THOMPSON, J. M. Consumer sensory requirements for beef and their implications for the Australian beef industry. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, n. 7, p. 855-859, 2001.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C. The genome sequence of taurine Cattle: A window to ruminant biology and evolution. The bovine genome sequencing and analysis consortium. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 522-528, 2009.

ENRÍQUEZ, D. H. Relação do método de desmame e da disponibilidade de leite materno com o comportamento de bezerros de corte. Dissertação, 2009.

ENSMINGER, L. G. The association of official analytical chemists. **Clinical Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 471-471, 1976.

EVANGELISTA, A. F.; CAVALCANTE, D. H.; FONSECA, W. J. L.; JUNIOR, J. B.; CAMPELO, J. E. G.; JÚNIOR, S. S. Herdabilidade de características de crescimento em bovinos da raça Nelore utilizando métodos da Máxima Verossimilhança Restrita e Inferência Bayesiana. **Archivos de zootecnia**, v. 68, n. 263, p. 440-446, 2019.

FANTAPPIÉ, M. Epigenética e memória celular. **Carbono**, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://revistacarbono.com/artigos/03-epigenetica-e-memoria-celular-marcelofantappie/>>. 2013. Acesso em: 15 ago. 2023.

FARIAS, N.; HO, N.; BUTLER, S.; DELANEY, L.; MORRISON, J.; SHAHRZAD,

S.; COOMBER, B. L. The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 8, p. 818-826, 2015.

FARKAS, S. A.; BEFEKADU, R.; HAHN-STRÖMBERG, V.; NILSSON, T. K. DNA methylation and expression of the folate transporter genes in colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 36, p. 5581-5590, 2015.

FAULKNER, D. B.; HUMMEL, D. F.; BUSKIRK, D. D.; BERGER, L. L.; PARRETT, D. F.; CMARIK, G. F. Performance and nutrient metabolism by nursing calves supplemented with limited or unlimited corn or soyhulls. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 2, p. 470-477, 1 fev. 1994.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature reviews genetics**, v. 13, n. 2, p. 97-109, 2012.

FERRAZ, J. B. S.; P. E. FELIICIO. Pedro Eduardo. Production systems—An example from Brazil. **Meat science**, v. 84, n. 2, p. 238-243, 2010.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FRAGOU, D.; ZANOS, P.; KOUIDOU, S.; NJAU, S.; KITCHEN, I.; BAILEY, A.; KOVATSI, L. Effect of chronic heroin and cocaine administration on global DNA methylation in brain and liver. **Toxicology letters**, v. 218, n. 3, p. 260-265, 2013.

FRANCO, M. M. Epigenética no melhoramento genético e reprodução animal. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 25, p. 1-2, 2017.

GHIGLIOTTI, G.; BARISIONE, C.; GARIBALDI, S.; FABBI, P.; BRUNELLI, C.; SPALLAROSSA, P.; ARSENESCU, V. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. **Inflammation**, v. 37, p. 1337-1353, 2014.

GUAN, H.; NAGARKATTI, P. S.; NAGARKATTI, M. CD44 Reciprocally regulates the differentiation of encephalitogenic Th1/Th17 and Th2/regulatory T cells through epigenetic modulation involving DNA methylation of cytokine gene promoters, thereby controlling the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 12, p. 6955-6964, 2011.

HALEY, D.B.; BAILEY, D.W.; STOOKEY, J.M. The effects of weaning beef calves in two stages on their behavior and growth rate. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2205-2214, 2005.

HOCQUETTE, J. F.; BOTREAU, R.; PICARD, B.; JACQUET, A.; PETHICK, D. W.; SCOLLAN, N. D. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat science**, v. 92, n. 3, p. 197-209, 2012.

HOCQUETTE, J. F.; F. GONDRET, E.; BAZA, F.; MDALE, C.; JURIE D. W.; PETHICK. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. **Animal**, v. 4, n. 2, p. 303-319, 2010.

HOCQUETTE, J. F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, v. 1, n. 1, p. 159-173, 2007.

HUPKES, M.; JONSSON, M. K.; SCHEENEN, W. J.; VAN ROTTERDAM, W.; SOTOCA, A. M.; VAN SOMEREN, E. P.; DECHERING, K. J. Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 11, p. 3861-3872, 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2021. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=34981&t=destaques>>. Acesso em: 4 ago. 2023.

IKEDA, M.; MATSUYAMA, S.; AKAGI, S.; OHKOSHI, K.; NAKAMURA, S.; MINABE, S.; HOSOE, M. Correction of a disease mutation using CRISPR/Cas9-assisted genome editing in Japanese black cattle. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 17827, 2017.

IRIZARRY, R. A.; LADD-ACOSTA, C.; WEN, B.; WU, Z.; MONTANO, C.; ONYANGO, P.; FEINBERG, A. P. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nat Genet**. v.41, ed.2, p.178-186, 2009.

JONES, P. A.; LIANG, G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 11, p. 805-811, 2009.

JOUSSE, C.; PARRY, L.; LAMBERT-LANGLAIS, S.; MAURIN, A. C.; AVEROUS, J.; BRUHAT, A.; FAFOURNOUX, P. Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 9, p. 3271-3278, 2011.

JUGE-AUBRY, C. E.; AGNIESZKA GORLA-BAJSZCZAK; AGNÉS PERNIN; LEMBERGER, T.; WAHLI, W.; BURGER, A. G.; MEIER, C. A. Peroxisome Proliferator-activated Receptor Mediates Cross-talk with Thyroid Hormone Receptor by Competition for Retinoid X Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 18117–18122, 1 jul. 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. **Histologia básica (Conjunctive tissue. Basic histology)**, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto, atlas**. Guanabara-Koogan, 2019.

KAJIMURA, D.; LEE, H. W.; RILEY, K. J.; ARTEAGA-SOLIS, E.; FERRON, M.; ZHOU, B.; KARSENTY, G. Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1. **Cell metabolism**, v. 17, n. 6, p. 901-915, 2013.

KAMADA, H.; NONAKA, I.; UEDA, Y.; MURAI, M. Selenium addition to colostrum increases immunoglobulin G absorption by newborn calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5665-5670, 2007.

KOLOVOS, P.; KNOCH, T. A.; GROSVELD, F. G.; COOK, P. R.; PAPANTONIS, A. Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. **Epigenetics & chromatin**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2012.

KUBOTA, N.; YANO, W.; KUBOTA, T.; YAMAUCHI, T.; ITOH, S.; KUMAGAI, H.; KADOWAKI, T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. **Cell metabolism**, v. 6, n. 1, p. 55-68, 2007.

KUCHARSKI, R.; MALESZKA, J.; FORET, S.; MALESZKA, R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1827-1830, 2008.

LADEIRA, M. M.; SCHOONMAKER, J. P.; GIONBELLI, M. P.; DIAS, J. C.; GIONBELLI, T. R.; CARVALHO, J. R. R.; TEIXEIRA, P. D. T. Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 6, p. 918, 2016.

LAWRENCE, T. L. J.; FOWLER, V. R. Compensatory growth. In: **Growth of farm animals**. Wallingford UK: CABI Publishing, p. 229-254. 2002.

LEFCOURT, A. M.; ELSASSER, T. H. Adrenal responses of Angus× Hereford cattle to the stress of weaning. **Journal of animal science**, v. 73, n. 9, p. 2669-2676, 1995.

LI, Y.; SAWALHA, A. H.; LU, Qi. Aberrant DNA methylation in skin diseases. **Journal of dermatological science**, v. 54, n. 3, p. 143-149, 2009.

LIU, Y.; HAN, Y.; ZHOU, L.; PAN, X.; SUN, X.; LIU, Y.; LIU, P. A comprehensive evaluation of computational tools to identify differential methylation regions using RRBS data. **Genomics**, v. 112, n. 6, p. 4567-4576, 2020.

LOPES, S.A.; PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALENTE, É.E.L.; RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; CARDENAS, J.E.G.; DE ALMEIDA, D.M.; DE MOURA, F.H.; OLIVEIRA, C.A.S. Evaluation of supplementation plans for suckling beef calves managed on tropical pasture. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 1027-1039, 2017.

LOPEZ, R.; KREHBIEL, C. R.; THOMAS, M. G.; HALLFORD, D. M.; KEISLER, D. H.; OBEIDAT, B. S.; FLORES, R. Effect of increasing level of dietary protein on serum concentrations of metabolic hormones and mammary development in Holstein heifers consuming a moderate-energy diet. **J. Dairy Sci**, v. 84, n. Suppl 1, p. 161, 2001.

LUO, Y.; LIU, M. Adiponectin: a versatile player of innate immunity. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 120–128, 2016.

LYNCH, E. M.; EARLEY, B.; MCGEE, M.; DOYLE, S. Effect of abrupt weaning at housing on leukocyte distribution, functional activity of neutrophils, and acute phase protein response of beef calves. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2010.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 4, p. 285-296, 2010.

MARINUS, M. G.; CASADESUS, J. Roles of DNA adenine methylation in host–

pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. 488-503, 2009.

MARTINS, T. S.; DE LEMOS, M. V. A.; MUELLER, L. F.; BALDI, F.; DE AMORIM, T. Y., FERINHO, A. M.; ARSHAD, M. S. Fat deposition, fatty acid composition, and its relationship with meat quality and human health. **Meat science and nutrition**, p. 17-37, 2018.

MCKAY, J. A.; MATHERS, J. C. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. **Acta physiologica**, v. 202, n. 2, p. 103-118, 2011.

MCNEEL, R. L.; MERSMANN, H. J. A privação nutricional reduz as transcrições de fatores de transcrição e proteínas características dos adipócitos em adipócitos suínos. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 3, pág. 139-146, 2000.

MEISSNER, A. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative highresolution DNA methylation analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 18, p. 5868–5877, 12 out. 2005.

MENCK, C. F. M.; SLUYS, M. A. V. **Genética molecular básica: dos genes ao genoma**. 2017.

MENEZES, G. D. O.; REGITANO, L. D. A.; SILVA, M.; CARDOSO, F. F.; DA SILVA, L. O. C., SIQUEIRA, F.; EGITO, A. A. Genômica aplicada ao melhoramento de gado de corte, 2013.

MIGUEL, G. Z.; FARIA, M. H.; ROCA, R. O.; SANTOS, C. T.; SUMAN, S. P.; FAITARONE, A. B.; SAVIAN, T. V. Immunocastration improves carcass traits and beef color attributes in Nellore and Nellore× Aberdeen Angus crossbred animals finished in feedlot. **Meat Science**, v. 96, n. 2, p. 884-891, 2014.

MOISÁ, S. J, SHIKE, D. W; METEER, W.T; FAULKNER, D.B; LOOR, J. J. Yin yang 1 and adipogenic gene network expression in longissimus muscle of beef cattle in response to nutritional management. **Gene Regulation and Systems Biology**, v. 7, p. GRSB. S11783, 2013.

MOORE, S. R.; MERRILL, S. M.; SEKHON, B.; MACISAAC, J. L.; KOBOR, M. S.; GIESBRECHT, G. F.; LETOURNEAU, N. Infant DNA methylation: an early indicator of intergenerational trauma? **Early Human Development**, v. 164, p. 105519, 2022.

MUKHERJEE, N.; KUMAR, A. P.; GHOSH, R. DNA methylation and flavonoids in genitourinary cancers. **Current pharmacology reports**, v. 1, p. 112-120, 2015.

NAITO, M.; MORI, M.; INAGAWA, M.; MIYATA, K.; HASHIMOTO, N.; TANAKA, S.; ASAHARA, H. Dnmt3a regulates proliferation of muscle satellite cells via p57Kip2. **PLoS genetics**, v. 12, n. 7, p. e1006167, 2016.

NEJATI-JAVAREMI, A.; SMITH, C.; GIBSON, J. P. Effect of total allelic relationship on accuracy of evaluation and response to selection. **Journal of animal science**, v. 75, n. 7, p. 1738-1745, 1997.

OH, D.; LEE, Y.; LA, B.; YEO, J.; CHUNG, E.; KIM, Y.; LEE, C. Fatty acid composition of beef is associated with exonic nucleotide variants of the gene

encoding FASN. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 4083-4090, 2012.

OLIVEIRA, E. A.; SAMPAIO, A. A. M.; HENRIQUE, W.; PIVARO, T. M.; ROSA, B. L.; FERNANDES, A. R. M.; ANDRADE, A. T. Quality traits and lipid composition of meat from Nellore young bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. **Meat Science**, v. 90, n. 1, p. 28-35, 2012.

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C. P.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. P. S. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

O'LOUGHLIN, A.; MCGEE, M.; WATERS, S.M.; DOYLE, S.; EARLEY, B. Examination of the bovine leukocyte environment using immunogenetic biomarkers to assess immunocompetence following exposure to weaning stress. **BMC veterinary research**, v. 7, p. 1-13, 2011.

OWENS, F. N.; GILL, D. R.; SECRIST, D. S.; COLEMAN, S. W. Review of some aspects of growth and development of feedlot cattle. **Journal of animal science**, v. 73, n. 10, p. 3152-3172, 1995.

PARK, S. J.; BEAK, S. H.; KIM, S. Y.; JEONG, I. H.; PIAO, M. Y.; KANG, H. J.; BAIK, M. Genetic, management, and nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle—A review. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 31, n. 7, p. 1043, 2018.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of nutrition and metabolism**, v. 58, n. Suppl. 2, p. 18-28, 2011.

PATON, N. Cattle vaccination: decision making in herd health planning. **In Practice**, v. 35, n. 2, p. 77-84, 2013.

PECORARO, A.; NIGRO, E.; POLITO, R.; MONACO, M. L.; SCUDIERO, O.; MORMILE, I.; SPADARO, G. Total and high molecular weight adiponectin expression is decreased in patients with common variable immunodeficiency: correlation with Ig replacement therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 895, 2017.

PETHICK, D. W.; HARPER, G. S.; ODDY, V. H. Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, n. 7, p. 705-715, 2004.

PFLANZER, S. B.; DE FELÍCIO, P. E. Moisture and fat content, marbling level and color of boneless rib cut from Nellore steers varying in maturity and fatness. **Meat Science**, v. 87, n. 1, p. 7-11, 2011.

PICARD, B.; GAGAOUA, M. Muscle fiber properties in cattle and their relationships with meat qualities: an overview. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2020.

POPKO, K.; GORSKA, E.; STELMASZCZYK-EMMEL, A.; PLYWACZEWSKI, R.; STOKLOSA, A.; GORECKA, D.; DEMKOW, U. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. **European journal of medical research**, v. 15, p. 1-3, 2010.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057-1068, 2010.

POWER, G. W.; NEWSHOLME, E. A. Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 11, p. 2142-2150, 1997.

RAMÍREZ-ZAMUDIO, G. D.; GANGA, M. J. G.; PEREIRA, G. L.; NOCITI, R. P.; CHIARATTI, M. R.; COOKE, R. F.; CURI, R. A. Effect of Cow-Calf Supplementation on Gene Expression, Processes, and Pathways Related to Adipogenesis and Lipogenesis in Longissimus thoracis Muscle of F1 Angus × Nellore Cattle at Weaning. **Metabolites**, v. 13, n. 2, p. 160–160, 21 jan. 2023.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, 2001.

RICHESON, J. T.; SAMUELSON, K. L.; TOMCZAK, D. J. Beef species–ruminant nutrition cactus beef symposium: energy and roughage levels in cattle receiving diets and impacts on health, performance, and immune responses. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 8, p. 3596-3604, 2019.

ROBISON, A. J.; NESTLER, E. J. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. **Nature reviews neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 623-637, 2011.

ROY, R.; TAOURIT, S.; ZARAGOZA, P.; EGGEN, A.; RODELLAR, C. Genomic structure and alternative transcript of bovine fatty acid synthase gene (FASN): comparative analysis of the FASN gene between monogastric and ruminant species. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 111, n. 1, p. 65-73, 2005.

RUBIANO, G. A. G.; ARRIGONI, M. D. B.; MARTINS, C. L.; RODRIGUES, É.; GONÇALVES, H. C.; ANGERAMI, C. N. Performance, carcass traits and meat quality of young Canchim, Nellore and crossbreed bulls. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2490-2498, 2009.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. D. Características da carne bovina. Próreitoria de extensão - Universidade Federal do Espírito Santo, **Boletim Técnico**. Espírito Santo, 2007.

SCHEFFLER, J. M.; MCCANN, M. A.; GREINER, S. P.; JIANG, H.; HANIGAN, M. D.; BRIDGES, G. A.; GERRARD, D. E. Early metabolic imprinting events increase marbling scores in fed cattle. **Journal of animal science**, v. 92, n. 1, p. 320-324, 2014.

SHOUP, L. M.; WILSON, T. B.; D. GONZÁLEZ-PEÑA; IRELAND, F. A.; S. RODRIGUEZ-ZAS; FELIX, T.; SHIKE, D. W. Beef cow prepartum supplement level and age at weaning: II. Effects of developmental programming on performance and carcass composition of steer progeny¹. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 10, p. 4936–4947, 1 out. 2015.

SIMOPOULOS, A. P. Nutrigenetics/nutrigenomics. **Annual review of public health**, v. 31, p. 53-68, 2010.

SMALLWOOD, S. A.; KELSEY, G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 1, p. 33-42, 2012.

SMITH, A. K.; CONNEELY, K. N.; KILARU, V.; MERCER, K. B.; WEISS, T. E.;

BRADLEY, B.; RESSLER, K. J. Differential immune system DNA methylation and cytokine regulation in post-traumatic stress disorder. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 156, n. 6, p. 700-708, 2011.

SMITH, S. B.; BLACKMON, T. L.; SAWYER, J. E.; MILLER, R. K.; BABER, J. R.; MORRILL, J. C.; WICKERSHAM, T. A. Glucose and acetate metabolism in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues from steers infused with glucose, propionate, or acetate. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 921-929, 2018.

SMITH, S.B.; CROUSE, D.J. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. **The Journal of nutrition**, v. 114, n. 4, p. 792-800, 1984.

SONG, C. X.; SZULWACH, K. E.; DAI, Q.; FU, Y.; MAO, S. Q.; LIN, L.; HE, C. Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 678-691, 2013.

STEWART, L. Creep Feeding Beef Calves. **UGA Cooperative Extension Bulletin** 1315. 2017.

STOCKWELL, P. A.; CHATTERJEE, A.; RODGER, E. J.; MORISON, I. M. DMAP: differential methylation analysis package for RRBS and WGBS data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 13, p. 1814-1822, 2014.

STOUDER, C.; PAOLONI-GIACOBINO, A. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 373, 2010.

TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930-935, 2009.

TAIT JR, R. G.; WILSON, D. E.; ROUSE, G. H. Prediction of retail product and trimmable fat yields from the four primal cuts in beef cattle using ultrasound or carcass data. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 6, p. 1353-1360, 2005.

TRIPATHI, D.; KANT, S.; PANDEY, S.; EHTESHAM, N. Z Resistin in metabolism, inflammation, and disease. **The FEBS journal**, v. 287, n. 15, p. 3141-3149, 2020.

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NESTLER, E. J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355-367, 2007.

USDA. 1997. United States standards for grades of carcass beef. US Dep. Agric. Available from: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3002979>. Acesso em 27 de maio de 2023.

USDA. Livestock and poultry: world markets and trade. United States Department of Agriculture and Foreign Agricultural Service, p. 31, 2021. Disponível em: <https://fas.usda.gov/>. Acesso em 27 de maio de 2023.

VARLEY, K. E.; GERTZ, J.; BOWLING, K. M.; PARKER, S. L.; REDDY, T. E.;

PAULI-BEHN, F.; MYERS, R. M. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. **Genome Res.** 2013;23:555–85.

VUCETIC, Z., KIMMEL, J., TOTOKI, K., HOLLENBECK, E., REYES, T. M. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. **Endocrinology**, v. 151, n. 10, p. 4756-4764, 2010.

WAN, M.; BELL, D. A. Analysis of genome-wide methylation using reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) technology. **Epigenetics Methods**, 2020. p. 141–156.

WIGLER, M.; LEVY, D.; PERUCHO, M. The somatic replication of DNA methylation. **Cell**, v. 24, n. 1, p. 33-40, 1981.

WONG, C. C.; MILL, J.; FERNANDES, C. Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. **Addiction**, v. 106, n. 3, p. 480-489, 2011.

WOOD, J. D. The influence of carcass composition on meat quality. In: **Quality and grading of carcasses of meat animals**. CRC Press, 2020. p. 131-155.

WU, Z. J.; CHENG, Y. J.; GU, W. J.; AUNG, L. H. H. Adiponectin is associated with increased mortality in patients with already established cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. **Metabolism**, v. 63, n. 9, p. 1157-1166, 2014.

YUFEROV, V.; LEVRAN, O.; PROUDNIKOV, D.; NIELSEN, D. A.; KREEK, M. J. Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, n. 1, p. 184-207, 2010.

ZHANG, M.; LI, D.; ZHAI, Y.; WANG, Z.; MA, X.; ZHANG, D.; SUN, G. The landscape of DNA methylation associated with the transcriptomic network of intramuscular adipocytes generates insight into intramuscular fat deposition in chicken. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 206, 2020.

ZHANG, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. **Animal nutrition**, v. 1, n. 3, p. 144-151, 2015.

ZHAO, C.; TIAN, F.; YU, Y.; LUO, J.; HU, Q.; BEQUETTE, B. J.; SONG, J. Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent tenderness. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 4185–4193, 2011.

ZHAO, Y.; XIA, X.; WANG, Q.; HU, D.; ZHANG, L.; LI, X.; GUO, Y. Myostatin Mutation Enhances Bovine Myogenic Differentiation through PI3K/AKT/mTOR Signalling via Removing DNA Methylation of RACK1. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 59–59, 2022.

ZHONG, H.; XIAO, J.; CHEN, W.; ZHOU, Y.; TANG, Z.; GUO, Z.; ZHANG, M. DNA methylation of pituitary growth hormone is involved in male growth superiority of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 171, p. 42-48, 2014.

CAPÍTULO 2

RESUMO

Efeito da dieta suplementar na fase de cria sobre a metilação do DNA do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos F1 Angus-Nelore à desmama

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação via *creep-feeding* sobre a metilação do genoma do músculo *Longissimus thoracis* (LT) à desmama em bovinos cruzados. Foram utilizados 48 novilhos F1 Angus-Nelore, não castrados, meio-irmãos, mantidos dos 30 dias de idade até a desmama, sob dois tratamentos: grupo 1 (G1: n = 24) – sem *creep-feeding*; grupo 2 (G2: n = 24) – *creep-feeding*. Após a desmama (aos 210 dias), todos os animais foram terminados em confinamento por 180 dias sob as mesmas condições de dieta e manejo. Os grupos apresentaram diferenças ($p < 0,05$) para peso ao desmame, cobertura de gordura e teor de gordura entremeada no LT (G2 > G1), sem diferir nos pesos no início do experimento e no abate. No desmame, foram coletadas biópsias de LT e prospectadas diferenças nos padrões de metilação do DNA genômico de cinco indivíduos por grupo pela técnica *reduced representation bisulfite sequencing* – RRBS. Observou-se para os animais suplementados na fase de cria (G2) um nível médio de metilação superior (0,18% a mais de CpG, 0,04% de CHG e 0,03% de CHH). Foram identificadas 974 regiões que apresentaram diferenciação nos níveis de metilação (DMRs: > 25% e $q < 0,05$), as quais se sobrepuseram a 241 genes diferencialmente metilados (DMGs) no G2. Destes DMGs, 39 já haviam sido anteriormente identificados como genes diferencialmente expressos (DEGs: $\log_2$ Fold Change [0,5]) entre os mesmos grupos de animais. A análise de *overrepresentation* realizada com o conjunto DMGs/DEGs identificou regulações epigenéticas relacionadas ao crescimento muscular, à sinalização da via PPAR, à adipogênese, à resposta à insulina, ao metabolismo lipídico e ao sistema imune, com destaque para os genes *ACAA1*, *ENO3*, *IL6R*, *NRG3*, *RUNX1*, *SMAD3*, *SORBS1*, *TRIM63* e *SLC2A8*. Essas alterações biológicas potencialmente resultaram nos fenótipos observados nos animais suplementados, como o melhor desempenho até a desmama e o maior teor de gordura intramuscular.

Palavras-chave: *Bos indicus*, *creep-feeding*, metiloma, nutrigenômica, RRBS.

ABSTRACT

Effect of supplementary diet at cow-calf phase on DNA methylation of the *Longissimus thoracis* muscle of F1 Angus-Nellore cattle at weaning

The objective of this study was to evaluate the effect of creep-feeding supplementation on the genome methylation of *Longissimus thoracis* (LT) muscle at weaning in crossbred cattle. Forty-eight F1 Angus-Nellore bulls, non-castrated, half-siblings, were used and raised from 30 days of age until weaning under two treatments: group 1 (G1: n = 24) – without creep-feeding; group 2 (G2: n = 24) – with creep-feeding. After weaning (at 210 days), all animals were finished in feedlot for 180 days under the same diet and management conditions. The groups showed differences ($p < 0.05$) in weaning weight, backfat thickness, and intramuscular fat content in LT (G2 > G1), without differing in initial and slaughter weights. At weaning, LT biopsies were collected, and differences in genomic DNA methylation patterns were explored for five individuals per group using reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) technique. Supplemented animals (G2) exhibited a higher average methylation level (0.18% more CpG, 0.04% CHG, and 0.03% CHH). A total of 974 regions were identified with methylation level differentiation (DMRs: $> 25\%$ and $q < 0.05$), overlapping with 241 differentially methylated genes (DMGs) in G2. Among these DMGs, 39 had previously been identified as differentially expressed genes (DEGs: $\log_2$ Fold Change $[0.5]$) between the same animal groups. Overrepresentation analysis of the DMGs/DEGs set identified epigenetic regulations related to muscle growth, PPAR pathway signaling, adipogenesis, insulin response, lipid metabolism, and immune system, highlighting genes like *ACAA1*, *ENO3*, *IL6R*, *NRG3*, *RUNX1*, *SMAD3*, *SORBS1*, *TRIM63*, and *SLC2A8*. These biological changes potentially led to observed phenotypes in supplemented animals, such as better performance until weaning and higher intramuscular fat content.

Keywords: *Bos indicus*, creep-feeding, methyloma, nutrigenomics, RRBS.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes estratégias têm sido utilizadas pela pecuária de corte do Brasil, o maior exportador mundial de carne bovina não processada há quase 20 anos (ABIEC, 2023), para aumentar a deposição de gordura intramuscular (IMF). Animais cruzados *Bos taurus* × *Bos indicus*, especialmente Angus × Nelore, são utilizados para produção de carnes mais macias e com maior teor de IMF na tentativa de agregar valor ao produto final e atender às demandas de consumidores dispostos a pagar mais por qualidade de carne. O uso de suplementos energéticos durante a fase de cria é exemplo de estratégia nutricional que têm essa mesma finalidade. A abordagem conhecida como *creep-feeding* consiste na suplementação bezerros ao longo da fase de aleitamento com dieta rica em energia e proteína, a base de grãos, para obter indivíduos mais pesados ao desmame, reduzir o tempo de acabamento da carcaça para o abate e permitir o descanso da matriz para retorno mais rápido ao cio (DANTAS et. al., 2010; SCHEFFLER et al., 2014).

Embora o acetato seja um dos principais doadores de grupos acetil para a deposição de gordura intramuscular, a glicose oriunda de suplementos ricos em concentrado também são contribuidores importantes para a deposição de gordura de marmoreio em bovinos (SMITH et al., 2018). Assim, a ingestão adequada de concentrado durante o período de lactação, principalmente aquele rico em amido, favorece a proliferação e crescimento de células adiposas. Isso se deve ao aumento do metabolismo da glicose, que pode levar ao aumento do marmoreio sem, no entanto, aumentar a gordura nas vísceras, o que contribui para a qualidade geral da carne e para o maior rendimento de carcaça (BALDASSINI et al., 2021). Além disso, Lopez et al. (2001) propuseram que níveis mais elevados de proteína bruta na dieta aumentam a digestão e a absorção intestinal do amido, e promovem a elevação da insulina plasmática e da glicose, o que, conseqüentemente, aumenta a deposição de IMF, por favorecer precursores de ácidos graxos.

Estudos em animais de produção mostraram que eventos durante a gestação e nos primeiros estágios pós-natais podem ter consequências de longo prazo para a saúde. O desmame pode ter um efeito negativo sobre o estresse e o sistema imunológico (CARROLL & FORSBURG, 2007; O'LOUGHLIN et al., 2011). Os impactos imunológicos do estresse da desmama convencional em

bezerros foram documentados (LEFCOURT & ELSASSER, 1995; LYNCH et al., 2010) como um dos principais contribuintes para o surgimento de doenças (BLECHA et al., 1984). A ocorrência de doenças e a necessidade de intervenções ao longo da vida do animal pode prejudicar o desempenho e qualidade da carne produzida.

O tecido adiposo é, tradicionalmente, reconhecido pelo seu papel no armazenamento energético estocando triglicerídeos, todavia estudos mais recentes o elucidaram como capaz de interagir com diversos componentes fisiológicos, impactando diversos aspectos do metabolismo animal, incluindo a imunidade (MIRIAM et al., 2006). O tecido adiposo é composto principalmente por adipócitos, porém carrega células imunes, células do estroma vascular, células em diferenciação e células nervosas (AHIMA & FLIER, 2000). Os adipócitos secretam uma ampla gama de marcadores bioativos, conhecidos como adipocinas com ação local e sistêmica. Entre essas adipocinas, destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), a resistina e a adiponectina, que desempenham papéis cruciais na modulação das respostas inflamatórias e imunológicas.

Atualmente é conhecido que organismos podem responder a diferentes fatores ambientais/nutricionais, exibindo plasticidade fenotípica em decorrência de alterações nos padrões de expressão gênica (ZHANG, 2015). Assim, características dos animais podem ser modificadas por modulações nutricionais, o que significa que as exposições dietéticas podem ter consequências para o crescimento e para a saúde (MCKAY & MATHERS, 2011). A todo momento surgem novas evidências de que estímulos nutricionais podem modificar a metilação do DNA e, portanto, afetar a expressão de genes e o fenótipo dos indivíduos (FARIAS et al., 2015; FARKAS et al., 2015; DAY et al., 2015). A metilação do DNA é um processo biológico que resulta na adição de grupos metil (CH₃) a nucleotídeos citosina dos cromossomos e contribui para a rede epigenética que controla a expressão genica e, conseqüentemente, os fenótipos (ZHANG, 2015). Marcas epigenéticas no genoma, as quais podem modificar a expressão gênica, mas não a sequência de DNA primário, podem ser adquiridas e perdurar ao longo de toda a vida dos indivíduos (STENZ et al., 2023), e podem também ser copiadas de células de uma geração para outra (REIK et al., 2001). A metilação ocorre mais comumente nas regiões promotoras de genes (regiões

regulatórias) e está associada ao silenciamento gênico. Assim, de maneira simplificada, quando as citosinas de sequências CpG estão metiladas não ocorre a expressão gênica (YUFEROV et al., 2010) e vice-versa.

Considerando que um perfil dietético adequado para os bezerros na fase de aleitamento pode desempenhar papel crucial na hipertrofia muscular, adipogênese e lipogênese e, conseqüentemente, na promoção de uma melhor imunidade, e que não existem estudos avaliando o efeito da suplementação energética na fase de cria sobre o estado epigenético e a expressão gênica no músculo de bovinos de corte, o objetivo deste trabalho foi avaliar, de forma inédita, o efeito da suplementação via creep-feeding sobre a metilação do genoma e, conseqüentemente, sobre a expressão gênica, no músculo *Longissimus thoracis* (LT) de bovinos cruzados F1 Angus x Nelore à desmama.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e tratamentos experimentais

Foram utilizados 48 bovinos cruzados F1 Angus-Nelore, todos machos não castrados (inteiros) e filhos de um mesmo touro (meio irmãos) da raça Angus (*Bos taurus*). Todos os procedimentos envolvendo estes animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinária (FCAV), UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, sob nº de protocolo 013689/19.

Os animais foram submetidos a dois diferentes tratamentos durante a maior parte da fase de cria (dos 30 dias de idade até a desmama), com 24 animais por tratamento: grupo 1 (G1) – sem suplementação em *creep-feeding* (desmama convencional); G2 – com suplementação em *creep-feeding*. No sistema de cria em *creep-feeding* os animais foram mantidos com suas respectivas mães no mesmo piquete, porém com acesso exclusivo e livre a suplemento correspondente à aproximadamente 1% do peso corporal. O suplemento oferecido aos animais do grupo 2 (dos 30 aos 210 dias de vida) apresentou 22% de proteína bruta e 65% de nutrientes digestíveis totais na matéria seca, e foi constituído de milho moído (44,8%), farelo de soja (40,4%) e núcleo mineral (14,8%). Após o desmame (média de 210 dias), os animais dos dois tratamentos foram levados à confinamento onde permaneceram por aproximadamente 180 dias, alojados em baias coletivas cobertas (três

animais/baia com 10m²/animal). Os dois grupos de animais receberam a mesma dieta, *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 08h00 e 16h00, contendo 12,6% de volumoso e 87,4% de concentrado a base de milho.

2.2. Coletas de tecido muscular e análises de qualidade da carcaça e da carne

No momento da desmama foi realizada coleta de alíquotas do músculo *Longissimus thoracis* (LT), por meio de biópsia, de 12 animais sorteados de cada um dos dois tratamentos (n = 24). Para a realização da biópsia foi feita a tricotomização na região lombar e administrado um anestésico local via subcutânea. As biópsias foram realizadas na altura da 13^a costela. Após a higienização do local da biópsia, uma incisão de 1cm foi feita com bisturi, e uma agulha esterilizada de biópsia Bergstrom foi utilizada para obter 1g de tecido do músculo, que foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido e posteriormente em ultrafreezer a -80°C.

Ao longo do período experimental, os animais foram pesados, após jejum de 16 horas, no início da fase de cria (peso inicial – PI), ao final da desmama (peso à desmama – PD) e ao término do período de confinamento (peso final – PF). A partir de PI e PD foi calculado o ganho de peso médio diário 1 (GPMD1: do início da fase de cria à desmama) e a partir de PF e PD foi calculado o GPMD2 (da desmama até o final do confinamento).

Após o período de confinamento, os 48 animais foram abatidos utilizando a técnica de concussão cerebral e secção da veia jugular. As carcaças foram identificadas, lavadas, divididas em duas metades, sendo estas pesadas individualmente para a obtenção do peso da carcaça quente (PCQ), e levadas à câmara fria, por aproximadamente 24 horas, à temperatura de 1°C. Decorrido o resfriamento, as carcaças foram retiradas da câmara e pesadas. Após a pesagem, o músculo LT da meia carcaça-esquerda foi separado do restante da carcaça e antes de ser desossado foram avaliados, entre a 12^a e 13^a vertebra torácica, a espessura de gordura subcutânea (EGS) e a área de olho de lombo (AOL). Amostras (bifes de contra-filé) do LT entre as 12^a e 13^a costelas da meia-carcaça esquerda foram coletadas e utilizadas para a condução em laboratório de análises físico-químicas de qualidade.

As análises físico-químicas relacionadas à qualidade da carne dos 48 animais abatidos (24/tratamento) foram: índice de marmorização (MI), teor de gordura intramuscular (IMF) e força de cisalhamento aos sete e 14 dias de maturação (FC7 e FC14). Os dados relacionados às características de carcaça e da carne para as 48 amostras ($n = 24/\text{grupo}$) – PI (Kg), PD (Kg), GPMD1(Kg), PF (Kg), GPMD2 (Kg), PCQ (Kg), AOL (cm^2), EGS (mm), MI (escore), IMF (%), FC7 e FC14 (Kg) – foram analisados quanto à presença de informações discrepantes, homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos. Na sequência, os dados foram expressos por médias e seus respectivos erros padrão. Não foram necessárias transformações nas variáveis para providenciar uma aproximação da distribuição normal. As médias dos dois tratamentos foram comparadas por Teste t. Os grupos (G1 e G2) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para PD ($228,92 \pm 5,07$ vs. $243,57 \pm 5,70$), EGS ($10,61 \pm 0,42$ vs. $12,96 \pm 0,83$), IMF ($4,95 \pm 0,20$ vs. $5,80 \pm 0,23$) e IM ($321,50 \pm 13,65$ vs. $366,11 \pm 12,39$). Entretanto, os pesos no início do experimento (PI) e ao abate (PF) não diferiram ($p < 0,05$).

Mais informações a respeito das análises de qualidade da carcaça e da carne empregadas e dos resultados obtidos foram disponibilizadas por Ramírez-Zamudio et al. (2023).

2.3. Análise da expressão gênica diferencial

A análise da expressão gênica diferencial, realizada por meio da técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq), ocorreu entre os tratamentos (G1 vs. G2 – 12 indivíduos/grupo) no momento da desmama. Os processos de extração do RNA, preparação das bibliotecas de cDNA, sequenciamento e mapeamento das *reads* no genoma bovino de referência (*Bos taurus* – ARS-UCD1.3) foram realizados seguindo protocolos e parâmetros recomendados e consagrados pela comunidade científica internacional para que fossem obtidos dados de qualidade e em quantidade suficiente para a realização das análises subsequentes. A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada pelo método implementado no pacote *edgeR* v.3.40.0 (ROBINSON et al., 2010), do *software* R, que considera o parâmetro de comparação *pairwise* e assume que os dados de contagem seguem distribuição binomial negativa.

Novescentos e quarenta e sete DEGs foram identificados ($\log_2$ (FC) < -0,5 ou > 0,5; FDR 5%) entre G1 e G2 à desmama, dos quais 443 foram regulados negativamente (*down-regulated*) e 504 foram regulados positivamente (*up-regulated*) no G2 (fase de cria com *creep-feeding*).

Informações detalhadas a respeito da análise da expressão gênica diferencial empregada e dos resultados obtidos foram disponibilizadas por Ramírez-Zamudio et al. (2023).

2.4. Análise da diferenciação da metilação do DNA

2.4.1. Extração do DNA genômico

O processo de extração do DNA a partir de alíquotas (50 mg) do músculo LT de amostras dos mesmos indivíduos que foram investigados por RNA-Seq foi realizado utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por meio do *Qubit® 3.0 Fluorometer* (Invitrogen, EUA) e analisado quanto à pureza (relação 260/280) e integridade no espectrofotômetro de pequenos volumes *NanoDrop Lite* (Thermo Scientific, EUA) e em gel de agarose a 0,8%, respectivamente. Após a diluição para a concentração de trabalho necessária à análise da diferenciação da metilação do DNA (50 ng/uL), as amostras de DNA foram estocadas em minitubos de 1,7mL e armazenadas a -20°C.

2.4.2. Construção das bibliotecas e sequenciamento RRBS

Para a análise da diferenciação da metilação do DNA, foram escolhidas aleatoriamente cinco amostras de DNA dentre os 12 animais de cada tratamento (G1 e G2), que preliminarmente foram analisados por RNA-Seq, constituindo ao todo 10 amostras. Visando o sequenciamento de regiões com maior ocorrência de 5-metilcitosinas (5-Mc) no genoma, a técnica de sequenciamento de bissulfito de representação reduzida (*reduced representation bisulfite sequencing* – RRBS) foi aplicada utilizando-se o *Zymo-Seq RRBS Library Kit* (Zymo Research, EUA).

Inicialmente, a digestão dos DNA genômicos, as conversões de bissulfeto e o enriquecimento das bibliotecas por PCR, foram realizados pela empresa Zymo (Zymo Research, EUA), na forma de serviço de terceiros, conforme protocolo do fabricante. O protocolo consistiu na digestão a 37°C de 400 ng DNA

genômico com 30 unidades da enzima de restrição *MspI* (New England Biolab, EUA), a qual tem sítio de reconhecimento CCGG, seguida do reparo da extremidade do fragmento e adição de adaptadores. Deste modo, foi possível ter o acesso a grande parte do DNA metilado, principalmente em regiões promotoras de genes. Em seguida, as amostras foram quantificadas por qPCR e os valores de Ct foram usados para agrupar as amostras por similaridade de concentração. A conversão com bissulfito de sódio levou à modificação da estrutura química da citosina não metilada (C) para uma uracila (U) e, posteriormente, para uma timina (T). Isto não ocorreu com as 5-mC, as quais permaneceram como citosinas (C), o que possibilitou a posterior distinção *in silico* de citosinas não metiladas e metiladas, permitindo acessar, posteriormente a porcentagem de citosinas metiladas em cada região submetida a análise. A eficiência de conversão de bissulfeto foi avaliada pela adição de controles de picos metilados e não metilados (0,1% de concentração).

Na digestão com a endonuclease *MspI*, o DNA é fragmentado e simultaneamente enriquecido para regiões densas de CpG, resultando em bibliotecas de fragmentos mais curtos em comparação com outras bibliotecas comuns (como as de RNA-Seq). Como as bibliotecas para RRBS são compostas por uma variedade de tamanhos de fragmentos, alguns dos quais podem ser relativamente pequenos, o cálculo de ajuste de tamanho foi necessário após a quantificação. Distribuições de fragmentos de tamanhos adequados (> 50 pb), os quais foram recuperados usando o DNA Clean & Concentrator™- 5 (Zymo Research, EUA), foram confirmados por chips de DNA de alta sensibilidade Bioanalyzer (Agilent, EUA). A clusterização e o sequenciamento das bibliotecas dos fragmentos de DNA foram realizados por meio de serviços de terceiros comercializados pela empresa norte-americana Zymo utilizando o HiSeq2500 kit v4 2x100pb (Illumina, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, na plataforma NovaSeq 6000 (Illumina, EUA).

2.4.3. Análise da qualidade das sequências RRBS e alinhamento ao genoma de referência

Para a visualização dos dados obtidos pelo sequenciamento RRBS foi utilizado o programa FastQC versão FastQC 0.11.9 (ANDREWS, 2019), em que parâmetros de qualidade foram avaliados para o conjunto total de sequências

brutas (*raw reads*). O controle de qualidade inicial foi realizado por meio do programa TrimGalore v.0.6.4_dev (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/), em que os adaptadores, bases desconhecidas ou de baixa qualidade foram removidos das extremidades das sequências.

O programa Bismark v.0.22.3 (KRUGER & ANDREWS, 2011) foi utilizado para alinhar as sequências geradas previamente tratadas com bissulfito ao genoma de referência bovino (*Bos taurus* – ARS-UCD1.2) com a opção -N1, permitindo um único erro de alinhamento. O genoma de referência foi inicialmente transformado em versão convertida em bissulfito (C-para-T) na cadeia original superior e (G-para-A) na cadeia inferior, e finalmente indexado usando o software Bowtie2 (LANGMEAD & SALZBERG, 2012). As sequências que produziram os melhores alinhamentos exclusivos a partir dos dois processos de alinhamento (cadeia original superior e inferior) foram comparadas à sequência genômica normal para confirmar a presença de um C na sequência de referência. O estado de metilação de todas as posições de citosinas nas sequências foi inferido utilizando a função *methylation_extractor* do programa Bismark. Em cada sítio (nucleotídeo), a taxa ou nível de metilação variou de 0% a 100%, pois os tecidos frequentemente compreendem diferentes populações de células que podem transportar diferentes sinais de metilação.

2.4.4. Identificação e caracterização de citosinas, regiões cromossômicas e genes diferencialmente metilados

As métricas de metilação das citosinas no genoma dos indivíduos de G1 e G2 foram analisadas por meio da utilização da ferramenta MethylDackel 0.5.0 (<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>). Ela agrupa todas as citosinas em um dos três contextos de sequência: CpG, CHG e CHH. Onde, H é o código de ambiguidade IUPAC para qualquer nucleotídeo diferente de G.

A identificação das regiões do genoma diferencialmente metiladas (*differentially methylated regions* – DMR), ou seja, aquelas que contém mais de uma citosina metilada, foi realizada utilizando a abordagem de janelas deslizantes da biblioteca *methyKit* versão 1.24.0 do ambiente estatístico R no repositório Biocondutor (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methyKit.html>). A janela foi definida com 1000 pb e o tamanho do passo de 500 pb e as DMRs foram consideradas desta forma quando: 1) apresentaram pelo

menos 25% de diferença de metilação; 2) o valor de p corrigido (q -value) foi menor que 0,05; e 3) a cobertura de sequências foi maior do que 10 vezes em todas as amostras. O teste exato de Fisher foi implementado para calcular os valores de p , que foram ajustados subsequentemente aos valores de q pelo método SLIM (WANG et al., 2011).

Genes com ensemble id sobrepostos às DMRs comuns entre os bovinos tratados sem *creep-feeding* (G1) e com *creep-feeding* (G2) à desmama foram identificados e denominados como genes diferencialmente metilados (DMGs). A anotação dos DMGs, com o intuito de identificar as regiões gênicas que abrigavam DMRs (promotor, sítio de início de transcrição – TSS, corpo gênico – exon e intron), foi realizada usando o pacote GenomationData (versão 3.8) por meio da biblioteca methylKit versão 1.24.0 (AKALIN et al., 2012) do ambiente estatístico R. O arquivo de banco de anotação NCBI RefSeq usado foi obtido do UCSC Genome Browser. Os promotores foram considerados como 1000 pb a montante e a jusante do TSS do gene, seguindo o padrão do methylkit. As informações das ilhas CpG e das regiões adjacentes (*shores*) foram obtidas a partir do UCSC Genome Browser.

2.4.5. Relação entre DMGs e DEGs

A fim de identificar os genes que tiveram a expressão modificada à desmama em função do processo de metilação, a lista de genes identificados como diferencialmente metilados (DMGs) foi contrastada com a lista de genes diferencialmente expressos (DEGs), considerando os filtros de 25% de diferença de metilação e FC expressão [0,5]. Em eucariotos, as ilhas CpG estão localizadas, em sua maioria, nas regiões promotoras de genes (regiões regulatórias), próximas ao sítio de início da transcrição (TSS). A metilação nessas regiões está associada ao silenciamento gênico e, assim, quando essas ilhas não estão metiladas ocorre a expressão gênica (OLIVEIRA et al, 2010; PORTELA & ESTELLER, 2010; YUFEROV et al., 2010). Dinucleotídeos CpG encontrados fora de ilhas, em regiões conhecidas como "margens (*shores*) da ilha CpG" são menos metilados quando comparadas com as ilhas em si (TSANKOVA et al., 2007; ROBISON & NESTLER, 2011), mas também podem estar associadas com a inativação transcricional. Entretanto, quando a metilação ocorre no corpo dos genes (exons e introns), também pode estar correlacionada

com a sua expressão (DOI et al., 2009; IRIZARRY et al., 2009; PORTELA & ESTELLER, 2010). CpGs no corpo gênico (exons/introns) e mais distantes do TSS podem inibir ou aumentar (desde que o promotor não esteja metilado) a expressão gênica dependendo do contexto genômico. Se a metilação (CpG) do corpo gênico ocorrer numa ilha CpG pode haver correlação negativa ou positiva com a expressão. Por outro lado, se a metilação não ocorrer numa CpGi, vai haver correlação positiva com a expressão, ou seja, com o aumento/diminuição da metilação vai haver aumento/diminuição de expressão gênica (VARLEY et al., 2013). Essas relações foram estabelecidas e descritas em Enrich et al. (2003), Tost (2010) e Varley et al. (2013). Neste sentido, as relações encontradas foram classificadas como consistentes (esperadas) ou inconsistentes (não esperadas) conforme mostrado na Figura 1.

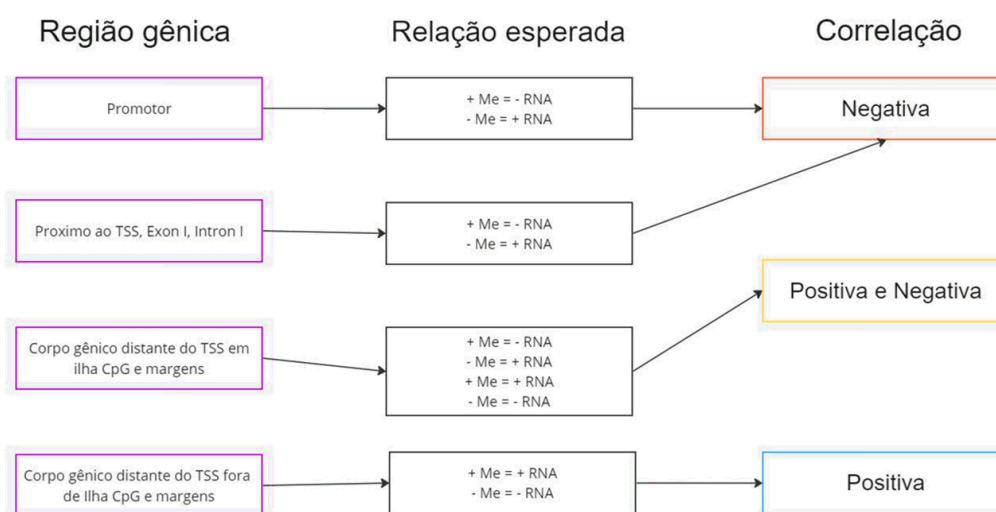


Figura 1. Relações esperadas entre o nível de metilação das regiões gênicas e a expressão em organismos eucariotos.

2.4.6. Análise de enriquecimento funcional

A fim de entender melhor o papel funcional, por meio dos processos biológicos e das via metabólicas dos quais participam, o conjunto dos genes identificados como diferencialmente metilados (DMGs) e diferencialmente expressos (DEGs) entre grupos 1 e 2 à desmama, foram utilizados em análises de over representation (ORA) considerando termos de ontologia de genes (GO

terms: Processos Biológicos - BP) e vias metabólicas (database: KEGG Pathway; Reactome Pathway e WikiPathways) utilizando a ferramenta WebGestalt, uma plataforma online projetada para análise funcional e interpretação de dados biológico (WANG et al., 2017). Para que os GO_BPs e pathways fossem considerados enriquecidos considerou-se o $p\text{-value} < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Qualidade do DNA genômico extraído, sequenciamento e alinhamento das *reads*

O DNA genômico extraído de alíquotas de 50 mg do músculo LT de 24 amostras (biópsias) à desmama apresentaram qualidade adequada para a realização do sequenciamento RRBS. Foram observadas relação 260nm/280nm variando entre 1,87 e 2,01 e relação 260nm/230nm entre 1,48 e 1,97. A concentração variou entre 83,4 e 752ng/uL e a eletroforese em gel de agarose mostrou amostras de DNA de alto peso molecular, sem indícios de degradação.

A partir do sequenciamento das amostras/bibliotecas de DNA convertidos, foram geradas em média aproximadamente 32 milhões de leituras brutas (*raw reads*) para as amostras de ambos os grupos experimentais. Em relação ao alinhamento, aproximadamente 33% das *reads* geradas por amostra apresentaram pareamento exclusivo, isto é, parearam com apenas uma região do genoma de referência. Em torno de 45% foram mapeadas em duas ou regiões e, em média, 22% não foram alinhadas ao genoma de referência (Figura 2).

A taxa de conversão de citocinas não metiladas por bissulfito superou 99% para as citocinas CpG e não CpG indicando a bissulfitação adequada das amostras.

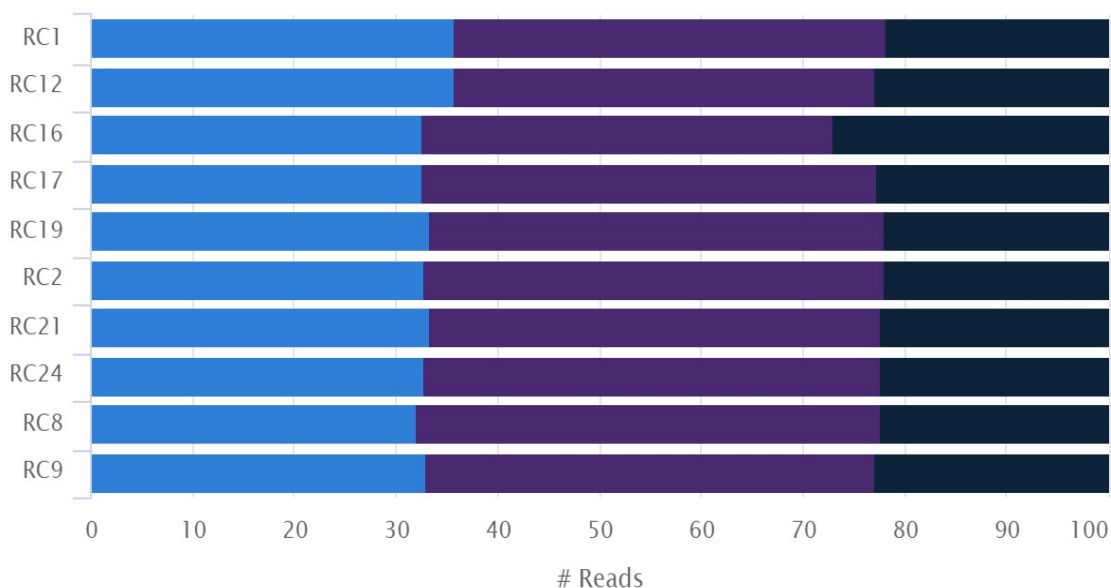


Figura 2. Porcentagem de reads geradas por RRBS alinhadas e não alinhadas ao genoma de referência bovino. RC1, RC2, RC8, RC9 e RC12 – amostras do G1; RC16, RC17, RC19, RC21 e RC24 – amostras do G2. Barra na cor azul: porcentagem de reads alinhadas unicamente a uma região do genoma de referência; barra na cor roxo: porcentagem de reads alinhadas a duas ou mais regiões do genoma de referência; barra na cor preto: porcentagem de reads não alinhadas a regiões do genoma de referência.

A partir das *reads* mapeadas em local único do genoma, identificou-se, em média, sete milhões de citocinas de CpG por amostra, a partir de uma cobertura média alcançada de aproximadamente 7X para CpG, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Dados gerados pelo sequenciamento de bissulfito de representação reduzida.

Amostra	Nº Reads	% BS Conversion (Non-CpG)	% BS Conversion (CpG)	Uniq. CpG	Avg. CpG Coverage
G1	38.689.684	99,4%	99,6%	7.440.987	10X
G1	28.329.540	99,3%	99,5%	6.939.864	7X
G1	30.538.031	99,4%	99,6%	6.946.079	7X
G1	26.731.168	99,4%	99,7%	6.698.465	7X
G1	37.295.594	99,3%	99,5%	7.724.811	9X
G2	25.249.436	99,3%	99,5%	6.778.697	6X
G2	37.041.812	99,3%	99,5%	7.373.151	8X
G2	33.405.004	99,3%	99,6%	7.129.808	8X
G2	32.170.424	99,3%	99,5%	7.198.074	8X
G2	27.669.506	99,3%	99,6%	6.915.952	7X

% BS Conversion (Non-CpG): porcentagem de sucesso de citocinas convertidas não metiladas por bissulfito (não CpG), % BS Conversion (CpG): porcentagem de sucesso de citocinas metiladas convertidas por bissulfito (CpG), Uniq. CpG: citocinas metiladas exclusivas de CpG, Avg. CpG Coverage: Cobertura média de leitura para CpGs.

3.2. Identificação e caracterização de regiões diferencialmente metiladas

Observou-se para os animais do grupo G2 um nível médio de metilação em todo o genoma de 4,25% de CpG, 0,54% de CHG (onde H = A, T ou C) e 0,46% de CHH para os animais do grupo G2. Os valores para os animais do grupo G1 foram de 4,07% de CpG, 0,50% de CHG e 0,43% em CHH, resultando em um nível médio de metilação maior (0,18% de CpG, 0,04% de CHG e 0,03% de CHH) nos animais do grupo suplementado na fase de cria.

A partir contraste estabelecido entre os grupos de animais (G1 e G2), foram identificadas ao desmame um total de 974 regiões que apresentavam diferenciação nos níveis de metilação (DMRs: >25% e valor $q < 0,05$). Dessas regiões, 431 evidenciaram hipermetilação, correspondendo a 44,25% do conjunto total, enquanto 543 evidenciaram hipometilação, representando 55,75%. Constatou-se que 54% das regiões diferencialmente metiladas incidiram sobre regiões intergênicas do genoma, ao passo que o restante distribuiu-se entre regiões promotoras e de corpo gênico, conforme mostrado na Figura 3A. Cerca de 22% das DMRs estavam localizadas em ilhas CpG,

enquanto 25% estiveram presentes nas margens dessas ilhas, conforme mostrado na Figura 3B.

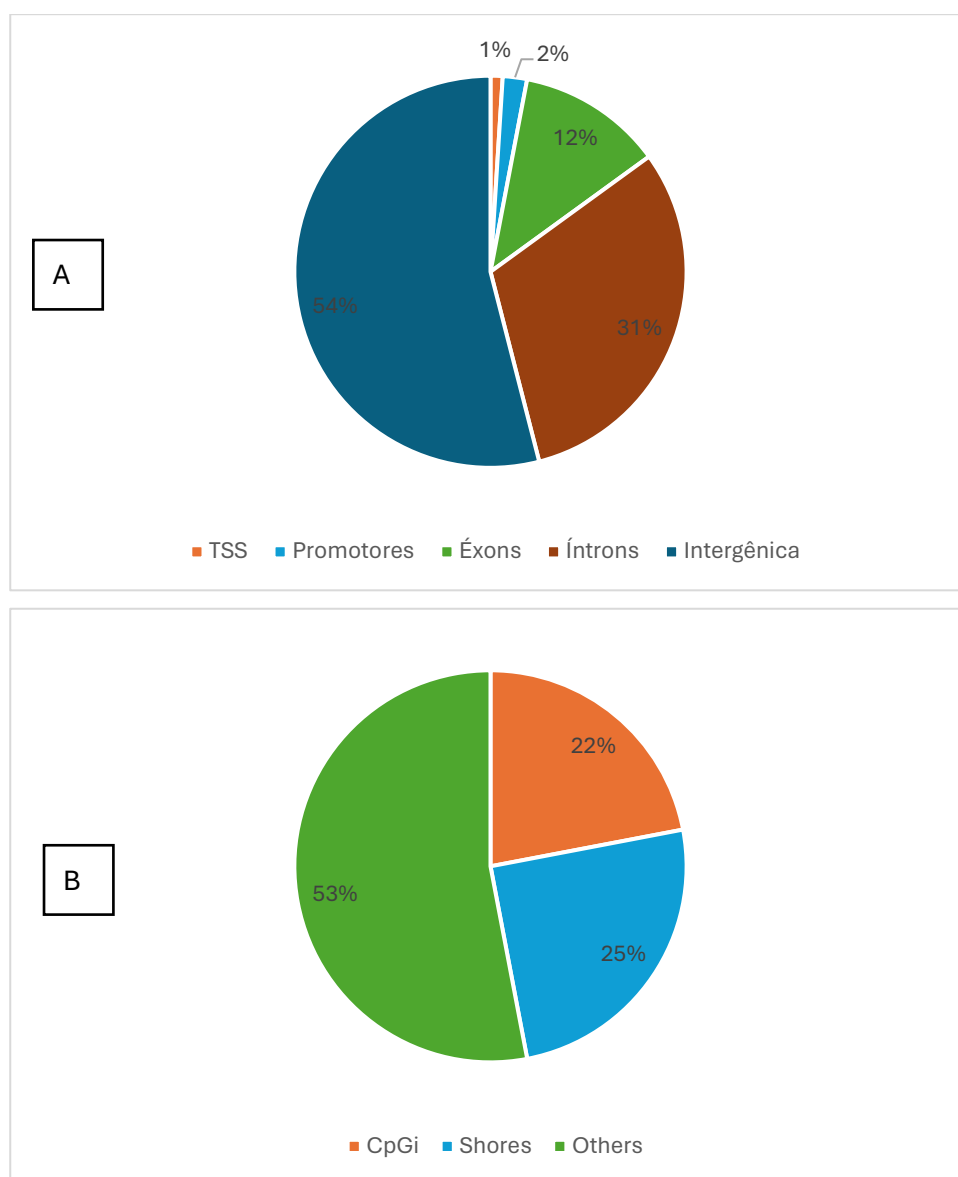


Figura 3. Proporção de DMRs entre G1 e G2 detectadas nas diferentes porções do genoma. Sobreposição a regiões intergênicas, de corpo gênico (éxon e íntron) e regiões promotoras (A). Sobreposição a ilhas CpG (CpGi), margens e outras (B).

As 974 DMRs prospectadas se sobrepuseram a 241 genes, os quais, como já mencionado, foram denominados de genes diferencialmente metilados (DMGs), sendo que destes 108 apresentaram-se hipermetilados e 133 hipometilados no G2 (G2 x G1). Destes 241 DMGs, 39 foram correlacionados a

DEGs com $\log_2$ (FC) maior ou igual a 0,5 entre as duas condições experimentais identificados por Ramírez-Zamudio et al. (2023).

Parte dos DMGs diferencialmente expressos apresentaram mais de uma DMR (Tabela 2), perfazendo 79 DMRs para 39 DMGs/DEGs. Dos 39 genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos, 33 (85%) apresentaram um padrão de metilação que pode explicar o padrão de expressão (consistente/esperado) e apenas seis genes (15%), *ANXA9*, *ENO3*, *FHL2*, *GADL1*, *IL6R* e *TP63*, apresentaram um padrão considerado inconsistente em relação ao esperado.

Tabela 2. Conjunto de genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.

DMG/DEG	Gene Part	CpG/shores	MeDiff	logFC.Rna	Correlação
ACAA1	exons_3	Sim	-25,670	-0,511	Positiva
ACAA1	promoters_0	Sim	-25,670	-0,511	Positiva
ACAA1	introns_2	Sim	-25,670	-0,511	Positiva
ACAA1	introns_3	Sim	-25,670	-0,511	Positiva
ANXA9	introns_7	Não	25,287	-0,918	Negativa
ANXA9	exons_9	Não	25,287	-0,918	Negativa
ANXA9	introns_8	Não	25,287	-0,918	Negativa
ANXA9	exons_8	Não	25,287	-0,918	Negativa
ANXA9	introns_9	Não	25,287	-0,918	Negativa
AQP1	introns_1	Não	-30,879	0,728	Negativa
AQP1	exons_1	Não	26,541	0,728	Positiva
AQP1	TSSes_0	Não	26,541	0,728	Positiva
AQP1	introns_1	Não	26,541	0,728	Positiva
AQP1	promoters_0	Não	26,541	0,728	Positiva
ATP2B2	introns_20	Sim	30,690	2,221	Positiva
CCDC146	exons_3	Não	-27,081	-0,685	Positiva
CCDC146	introns_3	Não	-27,081	-0,685	Positiva
CDK18	introns_2	Não	36,149	0,576	Positiva
CDK18	promoters_0	Não	36,149	0,576	Positiva
CDK18	introns_3	Não	36,149	0,576	Positiva
CDK18	exons_2	Não	36,149	0,576	Positiva
CDK18	exons_3	Não	36,149	0,576	Positiva
CLSTN2	introns_8	Não	25,210	1,093	Positiva
COL27A1	introns_37	Não	-34,545	0,550	Negativa
CSDC2	exons_3	Sim	-25,559	1,036	Negativa
CSDC2	introns_3	Sim	-25,559	1,036	Negativa
CSDC2	introns_2	Sim	-25,559	1,036	Negativa
CSF1R	exons_8	Não	-25,725	-1,810	Positiva

DMG/DEG	Gene Part	CpGi/shores	MeDiff	logFC.Rna	Correlação
<i>CSF1R</i>	exons_9	Não	-25,725	-1,810	Positiva
<i>CSF1R</i>	introns_8	Não	-25,725	-1,810	Positiva
<i>CSF1R</i>	introns_9	Não	-25,725	-1,810	Positiva
<i>CUX2</i>	introns_3	Não	25,526	1,249	Positiva
<i>DAPP1</i>	introns_4	Não	26,740	-0,531	Negativa
<i>DNMT3A</i>	introns_1	Não	-26,425	0,792	Negativa
<i>ENO3</i>	introns_9	Não	-39,722	0,839	Negativa
<i>ENO3</i>	exons_8	Não	-39,722	0,839	Negativa
<i>ENO3</i>	introns_10	Não	-39,722	0,839	Negativa
<i>ENO3</i>	exons_10	Não	-39,722	0,839	Negativa
<i>ENO3</i>	introns_8	Não	-39,722	0,839	Negativa
<i>ENO3</i>	exons_9	Não	-39,722	0,839	Negativa
<i>FERMT3</i>	promoters_0	Sim	37,626	-0,744	Negativa
<i>FERMT3</i>	introns_2	Sim	37,626	-0,744	Negativa
<i>FHL2</i>	promoters_0	Não	-37,952	-0,526	Positiva
<i>GADL1</i>	introns_14	Não	-33,765	3,082	Negativa
<i>GNA12</i>	introns_1	Não	25,339	0,840	Positiva
<i>HECTD2</i>	introns_1	Sim	29,870	0,514	Positiva
<i>HERC1</i>	introns_1	Não	25,726	0,634	Positiva
<i>IL6R</i>	introns_9	Não	32,843	-2,065	Negativa
<i>IL6R</i>	exons_10	Não	32,843	-2,065	Negativa
<i>LAPTM5</i>	introns_1	Não	27,587	-0,583	Negativa
<i>NRG3</i>	introns_1	Não	25,066	-0,820	Negativa
<i>PRKCA</i>	introns_2	Não	-25,462	0,558	Negativa
<i>RALGPS1</i>	introns_8	Não	-25,842	-0,719	Positiva
<i>RBM47</i>	introns_3	Sim	29,249	-0,504	Negativa
<i>RBM47</i>	exons_3	Sim	29,249	-0,504	Negativa
<i>RBM47</i>	introns_2	Sim	29,249	-0,504	Negativa

DMG/DEG	Gene Part	CpGi/shores	MeDiff	logFC.Rna	Correlação
<i>RET</i>	introns_1	Não	-25,355	-1,746	Positiva
<i>RFC2</i>	exons_2	Não	-48,252	-0,520	Positiva
<i>RFC2</i>	introns_2	Não	-48,252	-0,520	Positiva
<i>RFC2</i>	introns_1	Não	-48,252	-0,520	Positiva
<i>RUNX1</i>	introns_2	Não	-28,744	-0,885	Positiva
<i>SART1</i>	introns_12	Sim	-26,154	-0,585	Positiva
<i>SLC2A8</i>	introns_9	Não	-32,060	-1,383	Positiva
<i>SLC2A8</i>	exons_10	Não	-32,060	-1,383	Positiva
<i>SMAD3</i>	introns_1	Não	-27,604	1,013	Negativa
<i>SORBS1</i>	introns_7	Sim	-31,747	-1,008	Positiva
<i>SPI1</i>	TSSes_0	Não	28,741	-0,533	Negativa
<i>SPI1</i>	promoters_0	Não	28,741	-0,533	Negativa
<i>SPI1</i>	introns_1	Não	28,741	-0,533	Negativa
<i>SPI1</i>	exons_1	Não	28,741	-0,533	Negativa
<i>SPI1</i>	introns_1	Não	25,330	-0,533	Negativa
<i>SPI1</i>	promoters_0	Não	25,330	-0,533	Negativa
<i>TNFRSF1B</i>	introns_1	Não	-29,221	-0,633	Positiva
<i>TP63</i>	introns_3	Não	28,317	-0,592	Negativa
<i>TRIM63</i>	exons_2	Não	27,249	-1,028	Negativa
<i>TRIM63</i>	introns_2	Não	27,249	-1,028	Negativa
<i>TRIM63</i>	introns_1	Não	27,249	-1,028	Negativa
<i>UNC5B</i>	introns_1	Não	-36,815	0,524	Negativa
<i>VWF</i>	introns_2	Não	-25,429	-0,536	Positiva

DMG/DMG: genes diferencialmente metilados e expressos; Gene Part: parte gênica em que ocorreu a metilação; MeDiff: magnitude da metilação diferencial; logFC.Rna: magnitude da expressão diferencial.

Foram identificados 21 genes com correlação positiva; dentre esses, nove (*AQP1*, *ATP2B2*, *CDK18*, *CLSTN2*, *CSF1R*, *CUX2*, *GNA12*, *HECTD2* e *HERC1*) apresentaram simultaneamente metilação e regulação positiva. Doze genes (*ACAA1*, *CCDC146*, *FHL2*, *RALGPS1*, *RET*, *RFC2*, *RUNX1*, *SART1*, *SLC2A8*, *SORBS1*, *TNFRSF1B* e *VWF*) exibiram hipometilação associada à regulação negativa. Por outro lado, identificou-se 18 genes com correlação negativa. Dentre esses, 10 (*ANXA9*, *DAPP1*, *FERMT3*, *IL6R*, *LAPTM5*, *NRG3*, *RBM47*, *SPI1*, *TP63* e *TRIM63*) foram identificados como genes hipermetilados com regulação negativa, enquanto oito (*COL27A1*, *CSDC2*, *DNMT3A*, *ENO3*, *GADL1*, *PRKCA*, *SMAD3* e *UNC5B*) foram caracterizados como genes hipometilados com regulação positiva.

3.3. Análise de enriquecimento funcional dos DMGs diferencialmente expressos

Na Tabela 3 são apresentados os termos de Gene Ontology (GO) relacionados aos Processos Biológicos (BP) enriquecidos ($p < 0,05$) na análise que envolveu os 39 DMGs diferencialmente expressos identificados entre os animais dos grupos 1 e 2. Nas Tabelas 4, 5 e 6 encontram-se apresentadas as vias metabólicas (pathways) enriquecidas ($p < 0,05$) utilizando como referência informações dos bancos de dados KEGG, Reactome e WikiPathways, respectivamente

Tabela 3. Processos biológicos enriquecidos (GO_BP) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.

Identificação	Descrição	Nº de genes	p-value	Genes
GO:0097191	extrinsic apoptotic signaling pathway	5	<0,001	<i>IL6R, RET, SMAD3, TNFRSF1B, UNC5B</i>
GO:0051094	positive regulation of developmental process	11	<0,001	<i>AQP1, CLSTN2, CUX2, IL6R, PRKCA, RET, RUNX1, SART1, SMAD3, TNFRSF1B, TP63</i>
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	10	<0,001	<i>AQP1, FHL2, HERC1, NRG3, PRKCA, RET, RUNX1, SMAD3, TP63, UNC5B</i>
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	6	<0,001	<i>IL6R, PRKCA, RET, RUNX1, SART1, SMAD3</i>
GO:0044057	regulation of system process	7	<0,001	<i>AQP1, ATP2B2, CUX2, PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0043502	regulation of muscle adaptation	4	<0,001	<i>PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0043500	muscle adaptation	4	<0,001	<i>PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0035239	tube morphogenesis	9	<0,001	<i>AQP1, CSF1R, PRKCA, RET, RUNX1, SMAD3, SPI1, TP63, UNC5B</i>
GO:0033993	response to lipid	9	<0,001	<i>AQP1, DNMT3A, FHL2, PRKCA, RET, RUNX1, TNFRSF1B, TP63, TRIM63</i>
GO:0030225	macrophage differentiation	3	<0,001	<i>CSF1R, PRKCA, SPI1</i>
GO:0022610	biological adhesion	11	<0,001	<i>ANXA9, CLSTN2, FERMT3, IL6R, PRKCA, RET, RUNX1, SART1, SMAD3, SORBS1, VWF</i>
GO:0014897	striated muscle hypertrophy	4	<0,001	<i>PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0014896	muscle hypertrophy	4	<0,001	<i>PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0014743	regulation of muscle hypertrophy	4	<0,001	<i>PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0014741	negative regulation of muscle hypertrophy	3	<0,001	<i>SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0010614	negative regulation of cardiac muscle hypertrophy	3	<0,001	<i>SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0010611	regulation of cardiac muscle hypertrophy	4	<0,001	<i>PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0007155	cell adhesion	11	<0,001	<i>ANXA9, CLSTN2, FERMT3, IL6R, PRKCA, RET, RUNX1, SART1, SMAD3, SORBS1, VWF</i>
GO:0003300	cardiac muscle hypertrophy	4	<0,001	<i>PRKCA, SMAD3, TNFRSF1B, TRIM63</i>
GO:0001775	cell activation	11	<0,001	<i>ACAA1, FERMT3, GNA12, IL6R, PRKCA, RUNX1, SART1, SMAD3, SPI1, TNFRSF1B, VWF</i>

Tabela 4. Vias metabólicas enriquecidas (KEGG Pathway) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.

Identificação	Descrição	Nº de genes	p-value	Genes
hsa05200	Pathways in cancer	8	0,001	<i>CSF1R, GNA12, IL6R, PRKCA, RET, RUNX1, SMAD3, SPI1</i>
hsa05221	Acute myeloid leukemia	3	0,002	<i>CSF1R, RUNX1, SPI1</i>
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	3	0,006	<i>ENO3, IL6R, PRKCA</i>
hsa04659	Th17 cell differentiation	3	0,007	<i>IL6R, RUNX1, SMAD3</i>
hsa04380	Osteoclast differentiation	3	0,012	<i>CSF1R, FHL2, SPI1</i>
hsa04730	Long-term depression	2	0,021	<i>GNA12, PRKCA</i>
hsa04520	Adherens junction	2	0,029	<i>SMAD3, SORBS1</i>
hsa03320	PPAR signaling pathway	2	0,031	<i>ACAA1, SORBS1</i>
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	3	0,032	<i>CSF1R, RUNX1, SPI1</i>
hsa05220	Chronic myeloid leukemia	2	0,033	<i>RUNX1, SMAD3</i>

Tabela 5. Vias metabólicas enriquecidas (Reactome Pathway) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.

Identificação	Descrição	Nº de genes	p-value	Genes
R-HSA-1250196	SHC1 events in ERBB2 signaling	2	0,002	<i>NRG3, PRKCA</i>
R-HSA-5684996	MAPK1/MAPK3 signaling	4	0,005	<i>IL6R, NRG3, RET, VWF</i>
R-HSA-8853659	RET signaling	2	0,006	<i>PRKCA, RET</i>
R-HSA-76002	Platelet activation, signaling and aggregation	4	0,006	<i>FERMT3, GNA12, PRKCA, VWF</i>
R-HSA-76005	Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	3	0,006	<i>FERMT3, PRKCA, VWF</i>
R-HSA-1227986	Signaling by ERBB2	2	0,009	<i>NRG3, PRKCA</i>
R-HSA-5683057	MAPK family signaling cascades	4	0,009	<i>IL6R, NRG3, RET, VWF</i>
R-HSA-8952158	RUNX3 regulates BCL2L11 (BIM) transcription	1	0,014	<i>SMAD3</i>
R-HSA-8935964	RUNX1 regulates expression of components of tight junctions	1	0,014	<i>RUNX1</i>
R-HSA-8939247	RUNX1 regulates transcription of genes involved in interleukin signaling	1	0,014	<i>RUNX1</i>

Tabela 6. Vias metabólicas enriquecidas (WikiPathways) considerando os genes diferencialmente metilados e diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2.

Identificação	Descrição	Nº de genes	p-value	Genes
WP4540	Pathways Regulating Hippo Signaling	3	0,005	<i>CSF1R, PRKCA, SMAD3</i>
WP3850	Factors and pathways affecting insulin-like growth factor (IGF1)-Akt signaling	2	0,006	<i>SMAD3, TRIM63</i>
WP2848	Differentiation Pathway	2	0,013	<i>CSF1R, IL6R</i>
WP3646	Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma	2	0,014	<i>IL6R, SMAD3</i>
WP4747	Netrin-UNC5B signaling Pathway	2	0,015	<i>PRKCA, UNC5B</i>
WP2018	RANKL/RANK (Receptor activator of NFkB (ligand)) Signaling Pathway	2	0,017	<i>FHL2, SPI1</i>
WP2849	Hematopoietic Stem Cell Differentiation	2	0,022	<i>RUNX1, SPI1</i>
WP3945	TYROBP Causal Network	2	0,022	<i>RBM47, TNFRSF1B</i>
WP2324	AGE/RAGE pathway	2	0,024	<i>PRKCA, SMAD3</i>
WP3942	PPAR signaling pathway	2	0,025	<i>ACAA1, SORBS1</i>

4. DISCUSSÃO

Embora aparentemente sutil, a diferença observada no padrão global de metilação entre os bezerros dos grupos G1 e G2 indica que a suplementação ao longo da fase de cria teve o efeito de metilar de forma mais acentuada o genoma. Não existem na literatura pesquisas semelhantes ou resultados disponíveis que permitam corroborar ou contradizer os achados aqui encontrados. Entretanto, são, até o momento, conhecidas três maneiras pelas quais a nutrição pode influenciar os padrões de metilação do DNA, entre as quais, pelo fornecimento de substratos necessário para a metilação adequada do DNA; e pela provisão de cofatores que modulam a atividade enzimática das DNA metil transferases (DNMT). Como metil-doador universal para proteínas metiltransferase, a S-denosilmetionina (SAM) é sintetizada no ciclo da metionina a partir de vários precursores presentes na dieta (MCKAY & MATHERS, 2011; FEIL & FRAGA, 2012). Todos estes precursores entram em pontos diferentes na via da metionina e contribuem para a síntese líquida do SAM. Assim, a disponibilidade reduzida de SAM resulta na hipometilação global do DNA, e vice-versa (ZHANG, 2015). É bem conhecido que as DNMTs exigem o SAM como um co-fator para sua ativação total. Doadores de metila da dieta podem contribuir para modular a atividade das DNMTs alterando a concentração intracelular de SAM. Além de uma regulação indireta dos padrões de metilação do DNA por meio da modulação de SAM, vários outros compostos da dieta podem também influenciar diretamente a expressão ou atividade das DNMTs (MUKHERJEE et al., 2015).

Pesquisa conduzida por Del Corvo et al. (2021), demonstrou um aumento de metilação de aproximadamente 0,54% em CpG, 0,06% em CHG e 0,02% em CHH em bovinos da raça Nelore recuperados (momento 2) após serem submetidos a um período de estresse térmico (momento 1). Embora esses aumentos não tenham atingido significância em escala genômica podem ocasionar padrões distintos de expressão gênica e, consequentemente, fenótipos divergentes (RIBEIRO, 1997; MILLER & GRANT, 2012). Assim, torna-se imperativo investigar genes que apresentam metilação diferencial em grupos de animais contrastantes para um determinado fenótipo de interesse ou que foram submetidos a diferentes tratamentos experimentais e as vias metabólicas por eles influenciadas. De Souza et al. (2022) analisaram o metiloma bovino no intuito, bem-sucedido, de identificar mecanismos epigenéticos subjacentes à

textura da carne em *Bos indicus* da raça Nelore, bem como genes com metilação diferencial em grupos contrastantes para a maciez da carne.

Os resultados obtidos a partir do experimento de campo: maiores peso à desmama (PD), cobertura de gordura na carcaça (EGS) e marmoreio (IMF e IM) nos animais do grupo 2; sugerem que a suplementação na fase de cria modificou o padrão de metilação, a expressão de genes, processos biológicos e vias metabólicas relacionados ao crescimento e desenvolvimento muscular e ao metabolismo de lipídeos (adipogênese, lipogênese e lipólise). Considerando que a dieta suplementar foi capaz de modificar o padrão de metilação do DNA, a expressão dos genes e, conseqüentemente, os fenótipos dos indivíduos relacionados ao crescimento muscular e à disposição de gordura, e considerando ainda, a estreita relação que existe entre o tecido adiposo (adipócitos) e o sistema imune, destacou-se na presente pesquisa determinados processos biológicos nos quais estes genes participam.

Dentre os processos biológicos de destaque, encontram-se: *negative regulation of muscle hypertrophy* (GO:0014741), *regulation of muscle hypertrophy* (GO:0014743), *muscle hypertrophy* (GO:0014896), *striated muscle hypertrophy* (GO:0014897), *macrophage differentiation* (GO:0030225), *response to lipid* (GO:0033993), *muscle adaptation* (GO:0043500) e *regulation of muscle adaptation* (GO:0043502). Os processos vinculados ao desenvolvimento muscular englobam: *Negative regulation of muscle hypertrophy*, *regulation of muscle hypertrophy*, *muscle hypertrophy*, *striated muscle hypertrophy*, *muscle adaptation* e *regulation of muscle adaptation*. Estes processos desempenham papéis relacionados a resposta do músculo a estímulos diversos, contribuindo de maneira significativa para o crescimento e adaptações funcionais do tecido muscular. Em adição, o processo: *response to lipid* abrange os mecanismos ligados ao metabolismo de lipídios. Quanto aos processos relacionados à imunidade, destaca-se: *macrophage differentiation*. Os macrófagos são integrantes fundamentais do sistema imunológico, desempenham papéis essenciais na regulação da resposta imunológica.

Ainda neste contexto, foram destacadas para discussão vias metabólicas (pathways) que desempenham papéis cruciais na determinação desses fenótipos, tais como: *PPAR signaling pathway* (bta03320), *Th17 cell differentiation* (hsa04659), *MAPK1/MAPK3 signaling* (R-HSA-5684996), *MAPK*

family signaling cascades (R-HSA-5683057), *RUNX1 regulates transcription of genes involved in interleukin signaling* (R-HSA-8939247) e *Factors and pathways affecting insulin-like growth factor (IGF1)-Akt signaling* (WP3850).

4.1. Vias metabólicas chaves relacionadas ao desenvolvimento muscular, desenvolvimento do tecido adiposo e sistema imune

A via de sinalização do PPAR (*PPAR signaling pathway*) constitui-se em uma sequência de eventos que engloba os receptores nucleares PPAR (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomas), os quais atuam como fatores de transcrição essenciais na regulação do metabolismo lipídico e de glicídios (GROSS et al., 2017). Estes receptores desempenham um papel crucial na modulação da expressão gênica relacionada ao metabolismo lipídico e à homeostase energética, respondendo a estímulos ambientais (LAMICHANE et al., 2018; ATTIANESE & DESVERGNE, 2015). No contexto da adipogênese, o processo de formação de adipócitos a partir de células precursoras, as células-tronco mesenquimais se diferenciam em precursores de adipócitos, conhecidos como pré-adipócitos. A ativação subsequente pelos receptores PPAR é fundamental para a progressão desses preadipócitos para adipócitos maduros. É relevante notar que variantes específicas da família do PPAR, como o PPAR- γ , são expressas em níveis elevados nas células adiposas maduras e desempenham o papel de reguladores críticos na diferenciação adipocitária (QUEIROZ et al., 2009; WU et al., 1999). Em estudos com bovinos, bem como em humanos, a adição de ácidos graxos de cadeia longa na dieta já foi associada a uma maior expressão de genes relacionados ao PPAR (BIONAZ et al., 2012; SAMPATH & NTAMBI, 2004). Essas evidências realçam a importância da via de sinalização do PPAR na regulação da diferenciação adipocitária e a influência potencial dos ácidos graxos na expressão genética associada a essa via em diferentes contextos de dietas.

A via de diferenciação das células T auxiliares 17 (*Th17 cell differentiation*) exerce um papel regulador nos eventos que culminam no desenvolvimento de uma subpopulação específica de células imunológicas conhecidas como CD4+ (Cluster of Differentiation 4+). Esse processo tem início com a ativação das células T CD4+, desencadeada pelo receptor de células T (TCR), sob a influência de citocinas como a Interleucina-6 (IL-6) e o fator de Crescimento

Transformador-beta (TGF- β) (HARRINGTON et al., 2005; PARK et al., 2005). Além disso, a ativação dessa via é mediada por proteínas como a STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), a RUNX1 (Runt-related Transcription Factor 1) e diferentes tipos de interleucinas (MCGEACHY & CUA., 2008). Essa sequência de eventos de diferenciação conduz à especialização das células T auxiliares 17. Uma vez diferenciadas, essas células desempenham um papel determinante nas respostas imunológicas, secretando citocinas pró-inflamatórias. Em bovinos, as atividades das células T auxiliares estão intrinsicamente ligadas às respostas imunológicas relacionadas a doenças causadas por patógenos (GOMEZ et al., 2017; HERNANDEZ et al., 2007).

A via de *sinalização MAPK1/MAPK3 signaling* e a *MAPK family signaling cascades* permeiam uma via comum, estando ambas relacionadas à atividade das proteínas MAPKs. Estas últimas desempenham um papel crucial na regulação do crescimento celular e em diversos processos biológicos. Essa cascata de sinalização é ativada em resposta a estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, hormônios e estresse celular (CARVALHEIRA et al., 2002; KATZ et al., 2007). Nos mamíferos, incluindo os seres humanos, a via de sinalização MAPK1/MAPK3 é fundamental para o controle do ciclo, proliferação e diferenciação celular (JOHNSON & VAILLANCOURT, 1994). A ação das MAPK já foi associada à proliferação de células musculares em bovinos (KELLEHER et al., 1995).

A interação entre a via *RUNX1 regulates transcription of genes involved in interleukin signaling* representa um ponto fundamental na regulação molecular das respostas imunológicas (SEO & TANIUCHI, 2020). Quando um estímulo ambiental ou patogênico desencadeia uma resposta imunológica, pode ocasionar a ativação da via associada ao gene *RUNX1*, que inicia uma cascata de eventos moleculares (MILNER et al., 2017). Esse gene, especificamente, desempenha papel na regulação da expressão de genes que codificam interleucinas, as quais são proteínas sinalizadoras secretadas por células do sistema imunológico (ZHANG et al., 2008). As interleucinas, por sua vez, atuam como mensageiros químicos, transmitindo informações entre as células do sistema imunológico (CECCON, 2003). Vale ressaltar que as interleucinas podem exercer sua ação de forma autócrina, influenciando a célula que as secretou, ou de maneira parácrina, afetando células vizinhas. Em carpas

(*Ctenopharyngodon idella*), foi observado que essa via está associada a respostas por estímulos imunológicos (YAO et al., 2004). Assim, a interligação entre a via regulatória do gene *RUNX1* e a sinalização de interleucinas pode representar respostas imunológicas mais eficazes.

A via de sinalização associada ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1)-Akt (*Factors and pathways affecting insulin-like growth factor (IGF1)-Akt signaling*) desempenha papel na regulação do crescimento do músculo esquelético, influenciando a síntese e degradação muscular (YOSHIDA & DELAFONTAINE, 2020). Na fase de síntese muscular, a quinase Akt desempenha função estimulante ao ativar a mTOR (mammalian Target of Rapamycin), uma proteína central na regulação do crescimento e proliferação celular (SCHIAFFINO & MAMMUCARI, 2011). A ativação da mTOR pela Akt estimula a síntese proteica, contribuindo para o aumento do tamanho e da massa muscular (JIA et al., 2014). Além disso, a Akt inibe GSK3B (glicogênio sintase quinase 3 beta), favorecendo a promoção muscular, uma vez que esta proteína, quando ativa, pode inibir a síntese proteica (CROSS et al, 1994; CROSS et al, 1995). No que se refere à degradação muscular, a Akt exerce uma função inibitória sobre os fatores FoxO (fatores de transcrição da família Forkhead box O). Esses fatores desempenham um papel na regulação de genes relacionados à atrofia do músculo, e a inibição pela Akt impede a quebra excessiva do tecido muscular (SARTORI et al., 2021). Em estudos com bovinos, a via demonstrou interferência na proliferação de mioblastos, células precursoras das fibras musculares (SONG et al., 2019).

4.2. DMGs diferencialmente expressos relacionados às vias destacadas

Por meio da análise de enriquecimento funcional dos DMGs diferencialmente expressos considerando o contraste G1 x G2 na fase de desmama, um conjunto de genes de particular relevância foi evidenciado. Esses genes incluem *ACAA1*, *ENO3*, *IL6R*, *NRG3*, *RUNX1*, *SMAD3*, *SORBS1*, *TRIM63* e *SLC2A8* e participam, com exceção do último, dos processos biológicos e vias metabólicas destacadas anteriormente. Supõe-se que, pelo menos em parte, as alterações nos fenótipos observados neste estudo possam resultar de modificações nos padrões de metilação do DNA, as quais foram, possivelmente,

influenciadas pela dieta. Considerando essa perspectiva, serão discutidos os resultados de metilação e expressão encontradas para estes genes, bem como será explorada a função destes na regulação do metabolismo dos animais.

O gene *ACAA1* (Acetil-CoA Aciltransferase 1) desempenha papel crucial na síntese e regulação de enzimas envolvidas na beta-oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (WANSDEERS et al., 2001). Observou-se que esse gene, que atua na via *PPAR signaling pathway*, estava hipometilado e regulado negativamente em animais submetidos à suplementação dietética. A atividade dos genes relacionados à família *ACAA1* regula a quebra de ácidos graxos, gerando Acetil-CoA para o ciclo de Krebs, impulsionando, assim, a subsequente produção de ATP (ZHA et al., 2005). Em um estudo envolvendo ovelhas, a ausência de expressão do gene *ACAA1* resultou no aumento do teor de lipídeos e estimulou a adipogênese (WANG et al., 2021). Em galinhas, a inibição da expressão de *ACAA1* em pré-adipócitos intramusculares promoveu a deposição de gordura intramuscular (LI et al., 2019). Em porcos, a expressão positiva desse gene foi associada à redução de gordura intramuscular no músculo *Longissimus dorsi* (YAO, 2020). Esses dados são consistentes com os resultados observados para a regulação do gene nos animais G2, visto a maior deposição de gordura subcutânea e índice de marmoreio nestes indivíduos.

A enzima enolase 3, codificada pelo gene *ENO3*, desempenha papel vital na via glicolítica, catalisando a conversão do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato (PESHAVARIA & DAY, 1991). Neste sentido, atua nos processos metabólicos relacionados ao glicogênio e ao colesterol, exercendo influência significativa nas suas regulações (CUI et al., 2021). Sua expressão é notavelmente destacada no músculo esquelético e no fígado (FEO et al., 1995). Observou-se na presente pesquisa que o gene da via metabólica *HIF-1 signaling pathway* está hipometilado, apresentando regulação positiva nos animais do G2. A deficiência de *ENO3*, conforme evidenciado por Tarnopolsky (2018), está associada a miopatias metabólicas. Além disso, a enolase 3 desempenha papel na aceleração do acúmulo de ésteres de colesterol hepático, atuando como mediador na síntese desses ésteres (JIA & ZHAI, 2019). Em bovinos jovens, Guillemín et al. (2011) identificaram o gene *ENO3* como um possível marcador genético glicolítico. Acredita-se que a suplementação dietética com elevadas quantidades de carboidratos (amido) durante o período de cria dos bezerros

estimulou o metabolismo glicolítico no músculo esquelético, o que alinha-se com a regulação genética encontrada para o gene *ENO3*.

O receptor alfa da interleucina-6 (*IL6R*) desempenha papel fundamental na regulação de respostas celulares. Observou-se que o *IL6R* está hipermetilado e regulado negativamente nos animais G2, participando das vias metabólicas, incluindo *HIF-1 signaling pathway*, *MAPK1/MAPK3 signaling* e *MAPK family signaling cascades*. A atuação do *IL6R* resulta na formação de um complexo enzimático (FA'AK et al., 2002) que desencadeia uma série de eventos intracelulares que abrangem desde a estimulação da proliferação celular até a promoção da diferenciação celular em células imunológicas, resultando na indução de processos inflamatórios (HIRANO et al., 1986). Em um estudo com células da glândula mamária de bovinos, a maior expressão do gene *IL6R* foi associada ao desenvolvimento de mastite clínica (ZHANG et al., 2018). Os resultados obtidos da expressão do gene *IL6R* são consistentes com a ideia de que uma melhor nutrição pode levar a uma melhor eficiência do sistema imune (GERSHWIN, 2012). Esses achados sugerem uma possível ligação entre a regulação epigenética do *IL6R* e uma melhor imunidade, destacando a importância da nutrição na modulação da imunocompetência em animais.

A Neuregulina-3 (*NRG3*) é um gene que codifica peptídeos ligantes para receptores transmembranares de tirosina. Este gene foi identificado como hipermetilado e regulado negativamente nos animais do G2, participando das vias *MAPK1/MAPK3 signaling* e *MAPK family signaling cascades*. O papel do gene relaciona-se ao controle do crescimento e diferenciação celular, impactando diversos tipos celulares (ZHANG et al., 1997). Estudos recentes conduzidos por Zhou et al. (2020) identificaram uma correlação entre variantes do gene *NRG3* e o índice de massa corporal (IMC) em humanos, sugerindo sua possível influência em processos biológicos relacionados ao peso corporal, ampliando sua relevância para além dos cenários associados ao desenvolvimento celular. A família das NRG (Neuregulinas) é conhecida por interagir na formação de complexos proteicos com a família de proteínas ErbB (receptores tirosina quinases), desempenhando papel fundamental no controle do crescimento (REMOM et al., 2014; YARDEN & SLIWKOWSKI, 2001). Embora a regulação negativa observada para o *NRG3* possa parecer contrária aos resultados de estudos anteriores, especialmente diante do maior ganho de peso

dos animais G2, vale ressaltar que as pesquisas relacionadas ao gene são escassas, e os mecanismos envolvidos em seu papel no crescimento ainda não são totalmente compreendidos. Essa lacuna no entendimento destaca a necessidade de investigações mais aprofundadas para esclarecer os mecanismos associados ao gene *NRG3*.

O gene *RUNX1*, também conhecido como CBF α 2 (Core Binding Factor Alpha 2), codifica para um fator de transcrição crucial no desenvolvimento normal das células sanguíneas. Assim, desempenha um papel central na regulação da expressão de genes envolvidos na maturação e diferenciação das células do sangue (OSORIO et al., 2008). Observou-se para este gene, que integra as vias *Th17 cell differentiation* e *RUNX1 regulates transcription of genes involved in interleukin signaling*, hipometilação e regulação negativa no G2. Sua importância é evidente na sinalização da hematopoiese, processo fundamental para a formação das células sanguíneas a partir de células-tronco hematopoiéticas (JAIN et al., 2018). Estudos indicaram participação do gene *RUNX1* durante a diferenciação de células sanguíneas relacionada a respostas lipídicas e imunológicas (JAIN et al., 2018; BELLISSIMO et al., 2020). Alguns estudos indicaram a influência do *RUNX1* na imunidade inata de células (VOON et al., 2015). Em células do epitélio alveolar humano, o *knockdown* do *RUNX1* resultou significativamente na inibição da infecção pelo vírus influenza (HU et al., 2022). A princípio este achado seria coerente com os resultados encontrados e as hipóteses levantadas no presente estudo, nos quais animais suplementados e com maior número de adipócitos intramuscular (G2), desfrutariam de um sistema imune fortalecido.

O gene *SMAD3* desempenha papel crítico na regulação das respostas celulares ao fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Este gene específico foi identificado como hipometilado e regulado positivamente, participando da via *Factors and pathways affecting insulin-like growth factor (IGF1)-Akt signaling*. Em estudo de Liu e Derynck (2001), evidenciou-se que o *SMAD3* atua a jusante dos fatores de crescimento, influenciando diretamente a diferenciação de mioblastos. Em bovinos, polimorfismos do gene *SMAD3* foram associados a variações no peso corporal (SHI et al., 2016). Considerando os resultados obtidos no presente estudo, é plausível inferir que a hipometilação e

a expressão aumentada do gene *SMAD3* é condizente com os valores de peso à desmama superiores observados nos animais do G2.

O *SORBS1* (Sorbin And SH3 Domain Containing 1) pertence à família dos genes *SORBS* e codifica uma proteína com papéis na sinalização e na estimulação da insulina (CHANG et al., 2016; CHANG et al., 2018; GERMAIN et al., 2015). Neste estudo, observou-se que o gene integrante da via *PPAR signaling pathway* estava, ao desmame, hipometilado e regulado negativamente nos animais do grupo G2. O *SORBS1* atua bloqueando a estimulação da insulina no transporte de glicose em alguns tipos de adipócitos (BAUMANN et al., 2000). Em estudos anteriores, a maior expressão de *SORBS1* foi associado positivamente a maiores teores de gordura intramuscular em bovinos (SASAKI et al., 2005) e a maiores teores de gordura no leite bovino (YANG et al., 2021). No entanto, os resultados deste estudo mostraram uma observação divergente, pois os bezerros que receberam suplementação, nos quais houve regulação negativa do gene *SORBS1*, apresentaram teores mais elevados de gordura intramuscular e subcutânea. Essa diferença indica que a suplementação pode modular a expressão ou a função do gene de maneira distinta, fazendo-se necessárias mais pesquisas para compreender melhor as interações complexas entre o gene *SORBS1* e o metabolismo lipídico, especialmente em resposta à suplementação dietética.

O gene *TRIM63*, conhecido também como *MURF1* (Muscle RING Finger-1), atua no desenvolvimento e na regulação do tecido muscular, sendo particularmente relevante para a homeostase do músculo, influenciando o tamanho e a manutenção da massa muscular (CENTNER et al., 2001). Este gene foi identificado como hipermetilado e regulado negativamente, e integrando a via *Factors and pathways affecting insulin-like growth factor (IGF1)-Akt signaling*. Em termos moleculares, o *TRIM63* codifica uma proteína que faz parte da família de proteínas com função principal ubiquitina-ligase. Sua atividade como ubiquitina-ligase está associada à marcação de proteínas específicas para degradação pelo proteossoma, um complexo celular responsável pela quebra de proteínas indesejadas ou danificadas (DAI & LIEW 2001). No contexto muscular, o *TRIM63* desempenha um papel central na regulação do processo de ubiquitinação de proteínas contráteis, o que pode levar à degradação seletiva de componentes musculares durante condições como atrofia muscular (NCBI,

2012). Em camundongos foi relacionado como participante na atrofia do músculo esquelético (BODINE et al., 2001). Portanto, considerando esses fatores e a regulação negativa identificada para o gene *TRIM63* nos animais do grupo G2, sugere-se que a supressão da expressão deste gene esteja associada a um aumento da massa muscular dos animais refletidas nos fenótipos observados para o G2.

O gene *SLC2A8*, também conhecido como *GLUTX1*, codifica o transportador de glicose tipo 8 e está envolvido no transporte de glicose através das membranas celulares. Observou-se que este gene apresentou-se hipometilado e regulado negativamente nos indivíduos do grupo 2. Embora não tenha sido associado a nenhuma via destacada anteriormente, sua importância será discutida, considerando sua relação com o metabolismo da glicose (IBBERSON et al., 2000). A literatura científica destaca a significativa importância do *SLC2A8* na regulação dos níveis de glicose no sangue e seu papel fundamental nos processos metabólicos relacionados (MUECKLER, 1994), impactando o equilíbrio energético e a resposta ao estresse metabólico. Estudos em embriões bovinos indicaram que o gene desempenha um papel determinante na homeostase glicêmica, facilitando o transporte da glicose materna para o embrião (AUGUSTIN et al., 2001). O *knockdown* do gene foi associado a um aumento na captação de frutose pelos enterócitos in vitro (DEBOSCH et al., 2012). Considerando a regulação negativa do *SLC2A8* encontrada no presente estudo, sugere-se que o gene pode ter uma plasticidade na influência na expressão gênica relacionada ao metabolismo energético ligado à açúcares, visto que no experimento o maior ganho de peso observado nos bovinos foi também pela maior oferta de amido.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa fortaleceram a hipótese de que a implementação da suplementação na fase de cria via *creep-feeding* induz a alterações nos níveis de metilação do DNA e de expressão gênica, tendo por consequência modificações na regulação de processos biológicos e vias metabólicas relacionadas ao crescimento, à deposição de gordura (adipogênese, lipogênese e lipólise), e ao sistema imune em bovinos de corte. Identificou-se regulações epigenéticas em genes que desempenham papéis

cruciais relacionados à imunidade, crescimento e desenvolvimento muscular, sinalização PPAR, adipogênese, resposta à insulina, e metabolismo de lipídios. Essas alterações biológicas resultaram potencialmente nos fenótipos observados nos animais suplementados, tanto para desempenho até a desmama (peso e ganho de peso), quanto para características relacionadas à qualidade da carcaça e da carne (teor de gordura intramuscular).

6. REFERÊNCIAS

- AHIMA R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 327-332, 2000.
- AKALIN, A.; KORMAKSSON, M.; LI, S.; GARRETT-BAKELMAN, F. E.; FIGUEROA, M. E.; MELNICK, A.; MASON, C. E. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome biology*, v. 13, n. 10, p. 1-9, 2012.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control analysis tool for high throughput sequencing data. 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. Beef Report 2023. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beefreport-2023-capitulo-02/>. Acesso em: 20 de maio. 2023.
- ATTIANESE, G. M. G.; DESVERGNE, B. Integrative and Systemic Approaches for Evaluating PPAR β/δ (PPARD) Function. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 13, n. 1, p. nrs.13001, 2015.
- AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 60, n. 3, p. 370-376, 2001.
- BALDASSINI, W. A.; FERREIRA, M. S.; SANTIAGO, B. M.; CHARDULO, L. A. L.; CURI, R. A.; LANNA, D. P.; NETO, O. R. M. Intake, performance, meat quality and fatty acid profile of Nellore bulls finished in feedlot with diets containing dry corn gluten feed. **Livestock Science**, v. 253, p. 104715, 2021.
- BAUMANN, C. A.; RIBON, V.; KANZAKI, M.; THURMOND, D. C.; MORA, S.; SHIGEMATSU, S.; SALTIEL, A. R. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 202-207, 2000.
- BELLISSIMO, D. C.; CHEN, C. H.; ZHU, Q.; BAGGA, S.; LEE, C. T.; HE, B.; SPECK, N. A. Runx1 negatively regulates inflammatory cytokine production by neutrophils in response to Toll-like receptor signaling. **Blood advances**, v. 4, n. 6, p. 1145-1158, 2020.
- BIONAZ, M.; THERING, B. J.; LOOR, J. J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient–gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- α activation. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 2, p. 179-191, 2012.
- BLECHA, F.; BOYLES, S. L.; RILEY, J. G. Shipping suppresses lymphocyte blastogenic responses in Angus and Brahman $\times$ Angus feeder calves. **Journal of animal science**, v. 59, n. 3, p. 576-583, 1984.
- BODINE, S. C.; STITT, T. N.; GONZALEZ, M.; KLINE, W. O.; STOVER, G. L.; BAUERLEIN, R.; YANCOPOULOS, G. D. Akt/mTOR pathway is a crucial

regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.

CARROLL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 105-149, 2007.

CARVALHEIRA, J. B.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. Vias de sinalização da insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, p. 419-425, 2002.

CECCON, M. E. J. R. Interleucinas na encefalopatia hipóxico-isquêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 280-281, 2003.

CENTNER, T.; YANO, J.; KIMURA, E.; MCELHINNY, A. S.; PELIN, K.; WITT, C. C.; LBEIT, S. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. **Journal of molecular biology**, v. 306, n. 4, p. 717-726, 2001.

CHANG, T. J.; WANG, W. C.; HSIUNG, C. A.; HE, C. T.; LIN, M. W.; SHEU, W. H. H. S. Study Group. Genetic variation in the human SORBS1 gene is associated with blood pressure regulation and age at onset of hypertension: a SAPHIRE Cohort Study. **Medicine**, v. 95, n. 10, p. e2970, 2016.

CHANG, T.J.; WANG, W.C.; HSIUNG, C. A.; HE, C.T.; LIN, M.W.; WAYNE H. S.; CHANG, Y.C.; QUERTERMOUS, T.; YII-DER I. C.; ROTTER, J. I.; CHUANG, L.M. Genetic variation of SORBS1 gene is associated with glucose homeostasis and age at onset of diabetes: A SAPHIRE Cohort Study. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 12, 2018.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 785-789, 1995.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; VANDENHEEDE, J. R.; MCDOWELL, H. E.; HUNDAL, H. S.; COHEN, P. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. **Biochemical Journal**, v. 303, n. 1, p. 21-26, 1994.

CUI, H.; GUO, D.; ZHANG, X.; ZHU, Y.; WANG, Z.; JIN, Y.; ZHANG, S. ENO3 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 797102, 2021.

DAI, K.; LIEW, C. A novel human striated muscle RING zinc finger protein, SMRZ, interacts with SMT3b via its RING domain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 23992-23999, 2001.

DANTAS, C. C. O.; DE MATTOS NEGRÃO, F.; GERON, L. J. V.; MEXIA, A. A. O uso da técnica do Creep-feeding na suplementação de bezerros. **PUBVET**, v. 4, p. 899-904, 2010.

DAY, JEREMY J.; KENNEDY, ANDREW J.; SWEATT, J. DAVID. DNA

methylation and its implications and accessibility for neuropsychiatric therapeutics. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 55, p. 591-611, 2015.

DEBOSCH, B. J.; CHI, M.; MOLEY, K. H. Glucose transporter 8 (GLUT8) regulates enterocyte fructose transport and global mammalian fructose utilization. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4181-4191, 2012.

DEL CORVO, M.; LAZZARI, B.; CAPRA, E.; ZAVAREZ, L.; MILANESI, M.; UTSUNOMIYA, Y. T.; AJMONE-MARSAN, P. Methylome patterns of cattle adaptation to heat stress. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 633132, 2021.

DOI, A.; PARK, I. H.; WEN, B.; MURAKAMI, P.; ARYEE, M. J.; IRIZARRY, R.; FEINBERG, A. P. Differential methylation of tissue-and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1350-1353, 2009.

FA'AK, F.; BUNI, M.; FALOHUN, A.; LU, H.; SONG, J.; JOHNSON, D. H.; DIAB, A. Selective immune suppression using interleukin-6 receptor inhibitors for management of immune-related adverse events. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 11, n. 6, 2023.

FARIAS, N.; HO, N.; BUTLER, S.; DELANEY, L.; MORRISON, J.; SHAHRZAD, S.; COOMBER, B. L. The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 8, p. 818-826, 2015.

FARKAS, S. A.; BEFEKADU, R.; HAHN-STRÖMBERG, V.; NILSSON, T. K. DNA methylation and expression of the folate transporter genes in colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 36, p. 5581-5590, 2015.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nature reviews genetics**, v. 13, n. 2, p. 97-109, 2012.

FEO, S.; ANTONA, V.; BARBIERI, G.; PASSANTINO, R.; CALÌ, L.; GIALLONGO, A. Transcription of the human β enolase gene (ENO-3) is regulated by an intronic muscle-specific enhancer that binds myocyte-specific enhancer factor 2 proteins and ubiquitous G-rich-box binding factors. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 11, p. 5991-6002, 1995.

GERMAIN, M.; PEZZOLESI, M. G.; SANDHOLM, N.; MCKNIGHT, A. J.; SUSZTAK, K.; LAJER, M.; HADJADJ, S. SORBS1 gene, a new candidate for diabetic nephropathy: results from a multi-stage genome-wide association study in patients with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 58, p. 543-548, 2015.

GROSS, B.; PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 36-49, 2017.

GUILLEMIN, N.; JURIE, C.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J. F.; RENAND, G.; PICARD, B. Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. **Animal**, v. 5, n. 6, p. 885-894, 2011.

HARRINGTON, L. E.; HATTON, R. D.; MANGAN, P. R.; TURNER, H.; MURPHY,

T. L.; MURPHY, K. M.; WEAVER, C. T. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1123-1132, 2005.

HIRANO, T.; YASUKAWA, K.; HARADA, H.; TAGA, T.; WATANABE, Y.; MATSUDA, T.; KISHIMOTO, T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. **Nature**, v. 324, n. 6092, p. 73-76, 1986.

HU, Y.; PAN, Q.; ZHOU, K.; LING, Y.; WANG, H.; LI, Y. RUNX1 inhibits the antiviral immune response against influenza A virus through attenuating type I interferon signaling. **Virology journal**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2022.

IBBERSON, M.; ULDRY, M.; THORENS, B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4607-4612, 2000.

IRIZARRY, R. A.; LADD-ACOSTA, C.; WEN, B.; WU, Z.; MONTANO, C.; ONYANGO, P.; FEINBERG, A. P. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. **Nat Genet.** v.41, ed.2, p.178-186, 2009.

JAIN, P.; NATTAKOM, M.; HOLOWKA, D.; WANG, D. H.; THOMAS BRENNAN, J.; KU, A. T.; TUMBAR, T. Runx1 role in epithelial and cancer cell proliferation implicates lipid metabolism and Scd1 and Soat1 activity. **Stem cells**, v. 36, n. 10, p. 1603-1616, 2018.

JIA, L., LI, Y. F.; WU, G. F.; SONG, Z. Y.; LU, H. Z.; SONG, C. C.; SHI, X. E. MiRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 1, p. 296-308, 2014.

JIA, X.; ZHAI, T. Integrated analysis of multiple microarray studies to identify novel gene signatures in non-alcoholic fatty liver disease. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 599, 2019.

JOHNSON, G. L.; VAILLANCOURT, R. R. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. **Current opinion in cell biology**, v. 6, n. 2, p. 230-238, 1994.

KATZ, M., AMIT, I.; YARDEN, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1161-1176, 2007.

KELLEHER, M. D.; ABE, M. K.; CHAO, T. S.; JAIN, M. A. N. U.; GREEN, J. M.; SOLWAY, J. U. L. I. A. N.; HERSHENSON, M. B. Role of MAP kinase activation in bovine tracheal smooth muscle mitogenesis. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 268, n. 6, p. L894-L901, 1995.

KRUEGER, F.; ANDREWS, S. R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. **Bioinformatics**, v. 27, n. 11, p. 1571–1572, 2011.

LAMICHANE, S.; DAHAL, L. B.; KWON, S. M. Pivotal roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their signal cascade for cellular and whole-body energy homeostasis. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 949, 2018

LEFCOURT, A. M.; ELSASSER, T. H. Adrenal responses of Angus× Hereford cattle to the stress of weaning. **Journal of animal science**, v. 73, n. 9, p. 2669-2676, 1995.

LI, G.; FU, S.; CHEN, Y.; JIN, W.; ZHAI, B.; LI, Y.; KANG, X. MicroRNA-15a regulates the differentiation of intramuscular preadipocytes by targeting ACAA1, ACOX1 and SCP2 in chickens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4063, 2019.

LIU, D.; BLACK, B. L.; DERYNCK, R. TGF- β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. **Genes & development**, v. 15, n. 22, p. 2950-2966, 2001.

LOPEZ, R.; KREHBIEL, C. R.; THOMAS, M. G.; HALLFORD, D. M.; KEISLER, D. H.; OBEIDAT, B. S.; FLORES, R. Effect of increasing level of dietary protein on serum concentrations of metabolic hormones and mammary development in Holstein heifers consuming a moderate-energy diet. **J. Dairy Sci**, v. 84, n. Suppl 1, p. 161, 2001.

LYNCH, E. M.; EARLEY, B.; MCGEE, M.; DOYLE, S. Effect of abrupt weaning at housing on leukocyte distribution, functional activity of neutrophils, and acute phase protein response of beef calves. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2010.

MARIA, M.; CRISTINA, S.; IBELLI, M.; PAN, Z.; ZHOU, H.; BRUSCADIN, J. J.; DINIZ, S.; AFONSO, J.; SILVA, P.; MOURÃO, G. B.; ZERLOTINI, A.; COUTINHO, L. L.; KOLTES, J. E.; CORREIA, L. DNA methylation may affect beef tenderness through signal transduction in *Bos indicus*. **Epigenetics & Chromatin**, v. 15, n. 1, 2022.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 445-453, 2008.

MCKAY, J. A.; MATHERS, J. C. Diet induced epigenetic changes and their implications for health. **Acta physiologica**, v. 202, n. 2, p. 103-118, 2011.

MILLER, J. L.; GRANT, P. A. The role of DNA methylation and histone modifications in transcriptional regulation in humans. **Epigenetics: Development and Disease**, p. 289-317, 2012.

MILNER, J. J.; TOMA, C.; YU, B.; ZHANG, K.; OMILUSIK, K.; PHAN, A. T.; GOLDRATH, A. W. Runx3 programs CD8+ T cell residency in non-lymphoid tissues and tumours. **Nature**, v. 552, n. 7684, p. 253-257, 2017.

MIRIAM, F.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 216-229, 2006.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **European journal of biochemistry**, v. 219, n. 3, p. 713-725, 1994.

MUKHERJEE, N.; KUMAR, A. P.; GHOSH, R. DNA methylation and flavonoids in genitourinary cancers. **Current pharmacology reports**, v. 1, p. 112-120, 2015.

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C. P.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. P. S. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

O'LOUGHLIN, A.; MCGEE, M.; WATERS, S.M; DOYLE, S.; EARLEY, B. Examination of the bovine leukocyte environment using immunogenetic biomarkers to assess immunocompetence following exposure to weaning stress. **BMC veterinary research**, v. 7, p. 1-13, 2011.

OSORIO, K. M.; LEE, S. E.; MCDERMITT, D. J.; WAGHMARE, S. K.; ZHANG, Y. V.; WOO, H. N.; TUMBAR, T. Runx1 modulates developmental, but not injury-driven, hair follicle stem cell activation. **Development**, v. 135, n. 6, 2008.

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X. O.; CHANG, S. H.; NURIEVA, R.; WANG, Y. H.; DONG, C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133-1141, 2005.

PESHAVARIA, M.; DAY, I. N. Molecular structure of the human muscle-specific enolase gene (ENO3). **Biochemical journal**, v. 275, n. 2, p. 427-433, 1991.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057-1068, 2010.

QUEIROZ, J. C. F. D.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Control of adipogenesis by fatty acids. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, p. 582-594, 2009

RAMÍREZ-ZAMUDIO, G. D.; GANGA, M. J. G.; PEREIRA, G. L.; NOCITI, R. P.; CHIARATTI, M. R.; COOKE, R. F.; CURI, R. A. Effect of Cow-Calf Supplementation on Gene Expression, Processes, and Pathways Related to Adipogenesis and Lipogenesis in Longissimus thoracis Muscle of F1 Angus × Nellore Cattle at Weaning. **Metabolites**, v. 13, n. 2, p. 160–160, 21 jan. 2023.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, 2001.

REMON, J.; MORAN, T.; MAJEM, M.; REGUART, N.; DALMAU, E.; MARQUEZ-MEDINA, D.; LIANES, P. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a new era begins. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 1, p. 93-101, 2014.

RIBEIRO, M. M. A. Expressão gênica e metilação do DNA: causa ou consequência? **Agroforum: Revista da Escola Superior Agrária de Castelo Branco**, p. 9-14, 1997.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

ROBISON, A. J.; NESTLER, E. J. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. **Nature reviews neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 623-637, 2011.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Nutrition reviews**, v. 62, n. 9, p. 333-339, 2004.

SARTORI, R.; ROMANELLO, V.; SANDRI, M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 330, 2021.

SASAKI, Y.; NAGAI, K.; NAGATA, Y.; DORONBEKOV, K.; NISHIMURA, S.; YOSHIOKA, S.; YAMADA, T. Exploration of genes showing intramuscular fat deposition-associated expression changes in musculus longissimus muscle. **Animal Genetics**, v. 37, n. 1, p. 40-46, 2006.

SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skeletal muscle**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2011.

SEO, W.; TANIUCHI, I. The roles of RUNX family proteins in development of immune cells. **Molecules and cells**, v. 43, n. 2, p. 107, 2020.

SHI, T.; PENG, W.; YAN, J.; CAI, H.; LAN, X.; LEI, C.; CHEN, H. A novel 17 bp indel in the SMAD3 gene alters transcription level, contributing to phenotypic traits in Chinese cattle. **Archives Animal Breeding**, v. 59, n. 1, p. 151-157, 2016.

SMITH, S. B.; BLACKMON, T. L.; SAWYER, J. E.; MILLER, R. K.; BABER, J. R.; MORRILL, J. C.; WICKERSHAM, T. A. Glucose and acetate metabolism in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues from steers infused with glucose, propionate, or acetate. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 921-929, 2018.

SMITH, S.B.; CROUSE, D.J. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. **The Journal of nutrition**, v. 114, n. 4, p. 792-800, 1984.

STENZ, L.; SCHECHTER, D. S.; SERPA, S. R.; PAOLONI-GIACOBINO, A. Intergenerational transmission of DNA methylation signatures associated with early life stress. **Current genomics**, v. 19, n. 8, p. 665-675, 2018.

TARNOPOLSKY, M. A. Myopathies related to glycogen metabolism disorders. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 4, p. 915-927, 2018.

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

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NESTLER, E. J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355-367, 2007.

VARLEY, K. E.; GERTZ, J.; BOWLING, K. M.; PARKER, S. L.; REDDY, T. E.; PAULI-BEHN, F.; MYERS, R. M. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. **Genome Res.** 2013;23:555–85.

VOON, D. C. C.; HOR, Y. T.; ITO, Y. The RUNX complex: reaching beyond haematopoiesis into immunity. **Immunology**, v. 146, n. 4, p. 523-536, 2015.

WANG, H.; TUOMINEN, L. K.; TSAI, C. SLIM: a sliding linear model for

estimating the proportion of true null hypotheses in datasets with dependence structures. **Bioinformatics**, v. 27, n. 2, p. 225-231, 2011.

WANG, J.; VASAIKAR, S.; SHI, Z.; GREER, M.; ZHANG, B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W130-W137, 2017.

WANG, Y.; LI, X.; CAO, Y.; XIAO, C.; LIU, Y.; JIN, H.; CAO, Y. Effect of the ACAA1 gene on preadipocyte differentiation in sheep. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 649140, 2021.

WU, Z.; ROSEN, E. D.; BRUN, R.; HAUSER, S.; ADELMANT, G.; TROY, A. E.; SPIEGELMAN, B. M. Cross-regulation of C/EBP α and PPAR γ controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. **Molecular cell**, v. 3, n. 2, p. 151-158, 1999.

YANG, L.; MIN, X.; ZHU, Y.; HU, Y.; YANG, M.; YU, H.; XIONG, X. Polymorphisms of SORBS1 Gene and Their Correlation with Milk Fat Traits of Cattle. **Animals**, v.11, 2021.

YAO, F.; LIU, Y.; DU, L.; WANG, X.; ZHANG, A.; WEI, H.; ZHOU, H. Molecular identification of transcription factor Runx1 variants in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and their responses to immune stimuli. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 160, n. 3-4, p. 201-208, 2014.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 2, n. 2, p. 127-137, 2001.

YOSHIDA, T.; DELAFONTAINE, P. Mechanisms of IGF-1-mediated regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 1970, 2020.

YUFEROV, V.; LEVRAN, O.; PROUDNIKOV, D.; NIELSEN, D. A.; KREEK, M. J. Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, n. 1, p. 184-207, 2010.

ZHA, S.; FERDINANDUSSE, S.; HICKS, J. L.; DENIS, S.; DUNN, T. A.; WANDERS, R. J.; ISAACS, W. B.; ZHA, S.; FERDINANDUSSE, S.; HICKS, J. L.; DENIS, S.; DUNN, T. A.; WANDERS, R. J.; ISAACS, W. B. Peroxisomal branched chain fatty acid β -oxidation pathway is upregulated in prostate cancer. **The Prostate**, v. 63, n. 4, p. 316-323, 2005.

ZHANG, D.; SLIWKOWSKI, M. X.; MARK, M.; FRANTZ, G.; AKITA, R.; SUN, Y.; GODOWSKI, P. J. Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 18, p. 9562-9567, 1997.

ZHANG, F.; MENG, G.; STROBER, W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells. **Nature immunology**, v. 9, n. 11, p. 1297-1306, 2008.

ZHANG, G. M.; SONG, C. C.; LI, L. J.; HE, H.; SHI, S. Y.; LEI, C. Z.; HUANG, Y. Z. DNA methylation status of CRABP2 promoter down-regulates its expression. **Gene**, v. 676, p. 243-248, 2018.

ZHANG, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its

mechanisms in animals. **Animal nutrition**, v. 1, n. 3, p. 144-151, 2015.

ZHOU, Y.; LI, Y.; MENG, Y.; WANG, J.; WU, F.; NING, Y.; ZHANG, X. Y. Neuregulin 3 rs10748842 polymorphism contributes to the effect of body mass index on cognitive impairment in patients with schizophrenia. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 62, 2020.