



JOSÉ MARIA DE OLIVEIRA JÚNIOR

**PERFORMANCE AND LIPID METABOLISM IN NELLORE ×
ANGUS YOUNG BULLS FED IONOPHORES AND
NON-IONOPHORES ADDITIVES**

LAVRAS - MG

2020

JOSÉ MARIA DE OLIVEIRA JÚNIOR

**PERFORMANCE AND LIPID METABOLISM IN NELLORE × ANGUS
YOUNG BULLS FED IONOPHORES AND NON-IONOPHORES ADDITIVES**

Master's thesis presented to the Universidade Federal de Lavras, as part of the requirements of the Graduate Program in Animal Science, area of concentration in Ruminant Production and Nutrition, to obtain the title of Master.

Prof. Dr. Marcio Machado Ladeira

Advisor

Prof. Dr. Daniel Rume Casagrande

Co-Advisor

LAVRAS – MG

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira Júnior, José Maria.

Performance and lipid metabolism in Nellore x Angus young
bulls fed ionophores and non-ionophores / José Maria Oliveira
Júnior. - 2020.

62 p.

Orientador(a): Marcio Machado Ladeira.

Coorientador(a): Daniel Rume Casagrande.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Aditivos. 2. Confinamento. 3. Metabolismo lipídico. I.
Ladeira, Marcio Machado. II. Casagrande, Daniel Rume. III. Título.

JOSÉ MARIA DE OLIVEIRA JÚNIOR

**PERFORMANCE AND LIPID METABOLISM IN NELLORE × ANGUS
YOUNG BULLS FED IONOPHORES AND NON-IONOPHORES ADDITIVES**

**DESEMPENHO E METABOLISMO LIPÍDICO EM TOURINHOS NELORE ×
ANGUS ALIMENTADOS COM ADITIVOS IONÓFOROS E NÃO-IONÓFOROS**

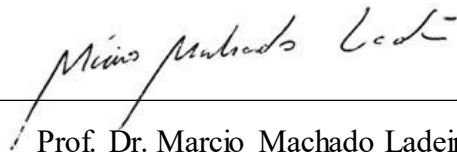
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de atuação em Nutrição e Produção de Ruminantes, para obtenção do título de mestre.

APROVADA em 09 de março de 2020.

Dr. Marcio Machado Ladeira UFLA

Dr. Erick Darlisson Batista UFLA

Dr. Márcio de Souza Duarte UFV



Prof. Dr. Marcio Machado Ladeira
Orientador

Prof. Dr. Daniel Rume Casagrande
Coorientador

LAVRAS – MG

2020

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da associação entre aditivos ionóforos e não-ionóforos sobre o desempenho, características de carcaça e turnover lipídico ao longo do tempo no confinamento de tourinhos F1 Nelore × Angus. Foram utilizados 72 animais, com peso corporal inicial de $417,4 \pm 41,0$ kg, que foram aleatoriamente alocados em 18 baias, totalizando 4 animais por baia, em um delineamento inteiramente casualizado. Os três tratamentos consistiam no fornecimento de monensina (MON), monensina e bacitracina de zinco (MONBZ) ou monensina e virginiamicina (MONVM). As doses de monensina, bacitracina de zinco e virginiamicina foram 25,0; 8,75 e 25,0 mg/kg matéria seca, respectivamente. O período de adaptação dos animais à dieta e às instalações foi de 27 dias e o período experimental durou 82 dias. A dieta era composta por 15% de silagem de milho e 85% de concentrado. Foi realizada biópsia do músculo *longissimus thoracis* no dia 7 do período experimental para análise de RT-qPCR. Também foram coletadas amostras de sangue nos dias 7 e 43 do período experimental para mensuração da concentração sérica de D-lactato. No abate também foram coletadas amostras de músculo. Não houve efeito significativo no desempenho total, eficiência alimentar, composição química da carne e na maioria das características de carcaça ($P > 0,16$). Os animais do tratamento MONVM apresentaram menor ganho médio diário (GMD) no início do confinamento ($P = 0,02$), já final do confinamento, os mesmos animais tenderam a apresentar maior GMD ($P = 0,08$). A concentração de D-lactato foi semelhante entre os três tratamentos e não foi afetada pelo tempo ($P > 0,40$). Os animais alimentados com MONVM tiveram maior número de refeições comparados com os animais alimentados com MON ($P = 0,03$). Por outro lado, os animais do tratamento MON tiveram maior seleção a favor das partículas médias (8 a 19 mm) do que o tratamento MONVM ($P = 0,05$). Enquanto que o tratamento MON também recusou mais as partículas pequenas (< 8 mm) do que os demais tratamentos ($P < 0,01$). A expressão dos genes *SREBF1*, *PPARG*, *ACACA* e *SCD1* não foi influenciada pelos aditivos nem pelo tempo ($P > 0,20$). Todavia, a expressão dos genes *LPL* e *CD36* aumentaram com o tempo ($P = 0,02$), enquanto que do gene *FASN* diminuiu ($P = 0,07$). O tratamento MONBZ apresentou maior expressão do *PPARA* no dia 7 e menor expressão no momento do abate ($P = 0,07$), já a expressão do *CPT2* foi menor no tempo 7 para o tratamento MONBZ e maior no momento do abate para MONVM ($P = 0,07$). Diante disso, concluiu-se que o uso isolado ou combinado dos aditivos não melhorou o desempenho dos animais nem as características de carcaça sugerindo que o uso pode ser realizado na forma isolada ou associada. Além disso, as alterações na expressão dos genes não foram suficientes para modificar a composição química da carne.

Palavras-chave: bacitracina de zinco, confinamento, lipogênese, monensina, turnover lipídico, virginiamicina.

ABSTRACT

The objective of the currently study was to evaluate the effects of combination between ionophores and non-ionophores additives on performance, carcass traits and lipid turnover over time in feedlot of Nellore × Angus young bulls. Seventy-two animals were utilized, with initial body weight 417.4 ± 41.0 kg, and randomly allotted in 18 pens, totalizing 4 animals per pen, in a completely randomized design. The three treatments consisted of supplementation of monensin (MON), monensin plus zinc bacitracin (MONZB) or monensin plus virginiamycin (MONVM). Monensin, zinc bacitracin and virginiamycin doses were 25.0, 8.75 and 25.0 mg/kg dry matter, respectively. The facilities and diet adaptation period lasted 27 d and the experimental period 82 d. The diet consisted in 15% of corn silage and 85% of concentrate. It was performed muscle biopsy from *longissimus thoracis* on d 7 of the experimental period to RT-qPCR analysis. In addition, blood samples were collected on d 7 and 43 of the experimental period to measured serum D-lactate concentration. At slaughter were collected muscle samples. There was no significant effect on overall performance, feed efficiency and most of carcass traits ($P > 0.16$). Animals fed MONVM presented lower average daily gain (ADG) in the beginning of the feedlot ($P = 0.02$). On the other hand, in the end of the feedlot the same treatment presented greater ADG ($P = 0.08$). Serum D-lactate concentration was similar among the three treatments and was not affected by time ($P > 0.40$). Animals fed MONVM had higher number of meals compared to animals fed MON ($P = 0.03$). On the other hand, animals fed MON had greater preferential intake of middle particle size (8 to 19 mm) than animals fed MONVM ($P = 0.05$). While animals fed MON, also refuse more the small particles (< 8 mm) than other treatments ($P < 0.01$). The expression of *SREBF1*, *PPARG*, *ACACA* and *SCD1* was not influenced by the additives either by time ($P > 0.20$). However, the expression of *LPL* and *CD36* increased over time ($P = 0.02$), while *FASN* expression decreased ($P = 0.07$). MONZB presented greater expression of *PPARA* on d 7 and lower expression at slaughter ($P = 0.07$). *CPT2* expression was lower on d 7 for MONZB and higher for MONVM at slaughter ($P = 0.07$). Thus, the alone or combined use of the additives did not improved animal overall performance either carcass traits, suggesting that additives can be used alone or combined. In addition, the changes in gene expression was not enough to modify chemical composition of the meat.

Keywords: feedlot, lipid turnover, lipogenesis, monensin, virginiamycin, zinc bacitracin.

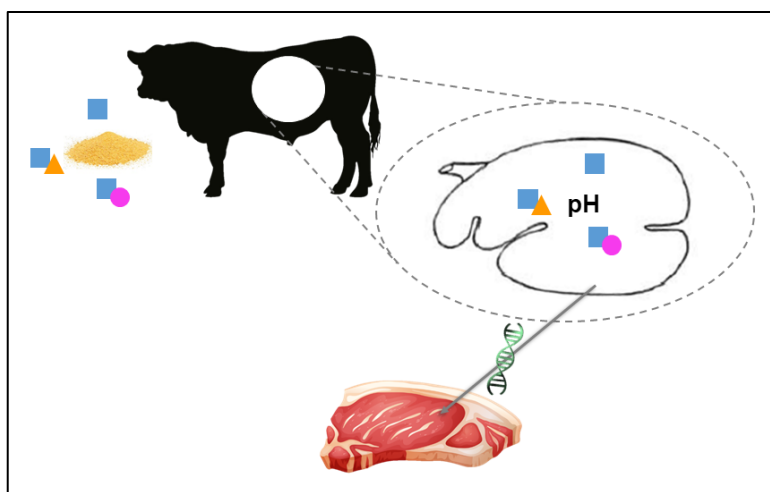
PERFORMANCE AND LIPID METABOLISM IN NELLORE × ANGUS YOUNG BULLS FED IONOPHORES AND NON-IONOPHORES ADDITIVES

Elaborado por **José Maria de Oliveira Júnior** e orientado por **Marcio Machado Ladeira**

A utilização de dietas com alta energia durante a engorda de bovinos de corte é uma estratégia adotada em confinamentos, pois permite maior aporte nutricional para o animal e contribui para a deposição de gordura na carcaça e marmoreio. Entretanto, os ingredientes que compõem essas dietas, em sua grande maioria, são rapidamente fermentáveis no rúmen. Consequentemente, ocorre alta formação de ácidos orgânicos e redução do pH ruminal, podendo levar o animal a desenvolver casos de acidose. Para contornar esses possíveis efeitos, são utilizados aditivos moduladores da fermentação ruminal nas dietas. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do uso isolado ou de forma associada da monensina com bacitracina de zinco ou com virginiamicina sobre o desempenho, características de carcaça e expressão de genes do metabolismo lipídico ao longo do tempo de tourinhos Nelore × Angus.

Os aditivos não influenciaram o ganho de peso total no confinamento nem as características de carcaça. No entanto, a associação da monensina e virginiamicina causou menor ganho de peso no início do confinamento. Por outro lado, possibilitou que os animais tivessem maior ganho de peso no final do confinamento. Para contornar possíveis efeitos negativos da dieta, os animais apresentaram algumas diferenças no comportamento e padrão de consumo, contudo, a concentração sérica de D-lactato foi semelhante entre todos os tratamentos. No geral, a expressão dos genes envolvidos na captação de ácidos graxos pelo músculo aumentou ao longo do tempo. A expressão da maioria dos genes responsáveis pela síntese de ácidos graxos no músculo não foi afetada pelos tratamentos nem pelo tempo, com exceção do gene da enzima ácido graxo sintase que reduziu com o tempo. Também foram encontradas pequenas mudanças sobre a lipólise, onde o tratamento que recebeu monensina e virginiamicina apresentou maior expressão de um gene lipolítico no momento do abate. Todavia, essas mudanças na expressão gênica não foram suficientes para alterar a composição química da carne.

Portanto, o uso da monensina pode ser feito de forma isolada ou associada com a bacitracina de zinco ou virginiamicina, e essa decisão vai depender da viabilidade econômica do aditivo.



Efeitos do uso isolado ou associado de aditivos ionóforos e não-ionóforos sobre o desempenho, características de carcaça e expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico ao longo do tempo em tourinhos Nelore × Angus. Monensina (■); monensina + bacitracina de zinco (▲); monensina + virginiamicina (◼).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. Aditivos.....	10
2.1.1. Monensina.....	10
2.1.2. Virginiamicina.....	12
2.1.3. Bacitracina de Zinco.....	15
2.2. Síntese e degradação lipídica.....	17
2.3. Fatores de transcrição.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CHAPTER 2.....	32
4. ARTICLE - Performance and lipid metabolism in Nellore × Angus young bulls fed ionophores and non-ionophores additive.....	32
4.1. Highlights.....	32
4.2. Abstract.....	32
4.3. Introduction.....	33
4.4. Materials and methods.....	35
4.4.1. Experimental design, animals, diet and feeding behavior.....	35
4.4.2. Serum D-lactate.....	36
4.4.3. Muscle biopsy.....	36
4.4.4. Slaughter and sampling.....	37
4.4.5. Gene expression.....	38
4.4.6. Statistical analyses.....	38
4.5. Results.....	39
4.6. Discussion.....	40
4.7. Conclusion.....	43
4.8. Funding.....	43
4.9. References.....	44
4.10. Tables and Figures.....	48

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A manutenção das condições normais do ambiente ruminal é um dos objetivos na terminação de bovinos de corte, pois alterações, principalmente no pH, podem afetar a produção, saúde, composição e qualidade de produtos dos ruminantes. Vários fatores influenciam a variação do pH ruminal, sendo a composição da dieta um deles. Nos confinamentos, é comum encontrar dietas com alta inclusão de energia e que tenham o milho como principal ingrediente. O amido, principal constituinte do milho, é um carboidrato com maior taxa de fermentação no rúmen, comparado aos carboidratos fibrosos, o que resulta em maior formação de ácidos orgânicos e conseqüentemente queda no pH ruminal. Diante disso, uma alternativa para contornar quedas bruscas no pH ruminal é a utilização de aditivos moduladores da fermentação ruminal, como os antibióticos ionóforos ou não-ionóforos que são utilizados por 98,2% dos principais confinamentos brasileiros (PINTO; MILLEN, 2018).

Outros efeitos dos aditivos moduladores da fermentação ruminal, como a redução do metano, que diminui as perdas energéticas pelo animal, o aumento da concentração molar de propionato e a redução da desaminação proteica podem resultar em aumento no ganho médio diário dos animais (NAGARAJA et al., 1987) e na síntese de glicose endógena, que poderá servir como substrato para a deposição de gordura intramuscular (SMITH et al., 2018), influenciando diretamente a qualidade da carne.

Frente a isso, a utilização associada dos antibióticos moduladores da fermentação ruminal, ionóforos + não-ionóforos, como a virginiamicina ou a bacitracina de zinco, pode ser uma opção para minimizar possíveis efeitos das dietas ricas em grãos. Em uma análise estatística com 26 trabalhos e mais de 7156 animais, com a finalidade de analisar a efetividade da virginiamicina, Tedeschi e Gorocica-Buenfil (2018) relataram que o uso de virginiamicina aumenta o ganho médio diário (GMD) comparativamente à monensina na mesma dosagem e período de duração da utilização. Rigueiro et al. (2016) recomendam o uso associado de monensina e virginiamicina durante o período de adaptação e apenas a virginiamicina no período de terminação, pois essa estratégia foi capaz de aumentar o GMD dos animais, o peso de carcaça quente (PCQ) assim como o

rendimento de carcaça (RC). Entretanto, os mesmos autores não constataram diferença na eficiência alimentar (EA).

Os primeiros relatos de uso da bacitracina foram com aves, onde, o uso da bacitracina elevou o peso corporal das aves comparadas ao tratamento controle (HEUSER; NORRIS, 1952; LEWIS; SANFORD, 1953; PAGE, 2003; PATRICK, 1953). Posteriormente, surgiram outros trabalhos com o uso da bacitracina em ruminantes, nos quais foram relatados aumento no GMD e melhoria na EA (PIVNYAK et al., 1981; ERANOV et al., 1996; JAMROZ et al., 1987ab; LOHNERT et al., 1993; LOHNERT; OCHRIMENKO, 1995; MÄNNER et al., 1993 citados por PAGE, 2003). Além disso, Russel e Strobel (1988) encontraram efeitos da bacitracina semelhantes aos da monensina em um mix de bactérias: redução na produção de metano e amônia, como também aumento na produção de propionato. Apesar destes resultados nas décadas de 80 e 90, o uso da bacitracina ainda não é amplamente utilizado em confinamentos.

Além dos efeitos destes aditivos sobre o desempenho dos animais, a crescente adoção de técnicas de biologia molecular em nutrição e fisiologia de ruminantes também permite obter conhecimentos sobre os mecanismos regulatórios envolvidos nos principais processos biológicos relacionados à lipogênese e qualidade da carne em um nível celular (OSORIO; MOISA, 2019), e avaliar se estas moléculas influenciam estes mecanismos. Diante disso, pode-se buscar a modulação da composição química e melhoria da qualidade da carne por meio de alterações na expressão de genes chaves.

A nutrigenômica é a ciência que estuda as interações entre os nutrientes e os genes (NEEHA; KINTH, 2013) e como os nutrientes presentes na dieta afetam a expressão destes. Neste sentido, dietas ricas em grãos podem provocar quedas no pH ruminal a ponto de alterar a microbiota e a via da biohidrogenação no rúmen, fazendo com que aumente a produção de C18:2 *trans*10-*cis*12 (LADEIRA et al., 2018). Esse isômero do CLA (C18:2 *trans*10-*cis*12) inibe fatores de transcrição lipogênicos, como o SREBP1c, reduzindo a síntese *de novo* (OBSEN et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017) e consequentemente o marmoreio.

A hipótese do trabalho foi que a utilização associada de aditivos moduladores da fermentação ruminal (monensina + bacitracina de zinco ou monensina + virginiamicina) na dieta de terminação dos animais seria mais eficiente do que o uso isolado da monensina, pois, reduziria a incidência de casos de acidose e melhoraria o desempenho no confinamento. Além disso, há a hipótese que a melhoria do pH ruminal, com o uso associado dos aditivos influenciaria positivamente a lipogênese e o grau de marmoreio na

carne. Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a associação entre aditivos ionóforos e não-ionóforos e seus possíveis efeitos sobre o desempenho, características de carcaça e expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico ao longo do tempo no confinamento de tourinhos F1 Nelore × Angus.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aditivos

Monensina

Os ionóforos foram descobertos em 1951 com o isolamento da lasalocida e nigericina como produtos da fermentação de bactérias do gênero *Streptomyces sp.* Entretanto, a nomenclatura ionóforo foi utilizada pela primeira vez no ano de 1967 devido à capacidade de ligação dessas moléculas com cátions e formação de complexos lipossolúveis, característica que facilita o transporte dos íons através da membrana celular (PRESSMAN, 1976).

Os antibióticos ionóforos são altamente eficazes contra bactérias gram-positivas. Por outro lado, apresentam pouco ou nenhum efeito sobre as gram-negativas (BERGEN; BATES, 1984). As bactérias gram-negativas têm uma membrana externa de lipopolissacarídeos com canais de proteínas (chamados de porinas) com tamanho aproximado de 600 daltons (Da), enquanto os ionóforos, em sua maioria, são maiores que 600 Da, não sendo possível, portanto, a passagem para o interior da célula (NAGARAJA et al., 1997).

Outros microrganismos, fungos e protozoários, também são afetados pelos ionóforos (BERGEN; BATES, 1984). Todavia, em um estudo utilizando monensina com lasalocida (GUAN et al., 2006), a população de protozoários ciliados foi capaz de se reestabelecer após um mês de administração, sugerindo que esses microrganismos são capazes de se adaptar à presença desse tipo de aditivo.

Nesse contexto, os ionóforos são amplamente pesquisados e utilizados na nutrição de ruminantes. Segundo Pinto e Millen (2018), através de um levantamento realizado com nutricionistas de confinamentos brasileiros, foi constatado que 98,2% dos nutricionistas utilizam algum aditivo na dieta, sendo que 86,7% deles utilizam ionóforo como aditivo principal na dieta e 13,3% usam combinação de ionóforo com outro antibiótico.

O mecanismo de ação dos ionóforos é semelhante, exceto na especificidade pelos cátions. A ordem de seletividade para a monensina é $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+$, sendo que sua afinidade pelo íon Na^+ é dez vezes maior do que ao K^+ (PRESSMAN, 1976).

De acordo com Russel e Strobel (1989), em condições normais, as bactérias mantêm a concentração intracelular de K^+ maior que no meio extracelular, para que o pH seja tamponado através da troca de K^+/H^+ . Porém ao se fornecer ionóforo em sua forma aniônica, o mesmo se liga a um cátion, formando um complexo lipofílico cátion-ionóforo que permite sua ligação e estabilização à membrana, sendo esse complexo cátion ionóforo capaz de adentrar a célula e de atuar no transporte de íons. Ainda, segundo estes autores, como a monensina tem maior afinidade pelo Na^+ , ela é capaz de provocar rápida saída de K^+ e entrada de H^+ na célula após se ligar à membrana, em função da mudança do gradiente iônico extracelular, o que causa redução do pH interno. Para tentar controlar o pH intracelular, a bactéria exporta H^+ e permite a entrada de Na^+ , entretanto esse mecanismo vai se tornando menos eficiente. Portanto, a fim do tamponar o pH e manter o balanço iônico celular, as bactérias ativam os mecanismos homeostáticos que demandam energia (bomba de próton ATPase) para expulsar o excesso de prótons. Diante disso, conforme o tempo passa, a capacidade de metabolização da glicose diminui, o que provoca redução do ATP intracelular e da capacidade de crescimento e reprodução, com isso, a bactéria diminui a taxa metabólica e pode acabar morrendo. A Figura 1 ilustra a atuação da monensina sobre a bactéria *Streptococcus bovis*, conforme proposto por Russel e Strobel (1989).

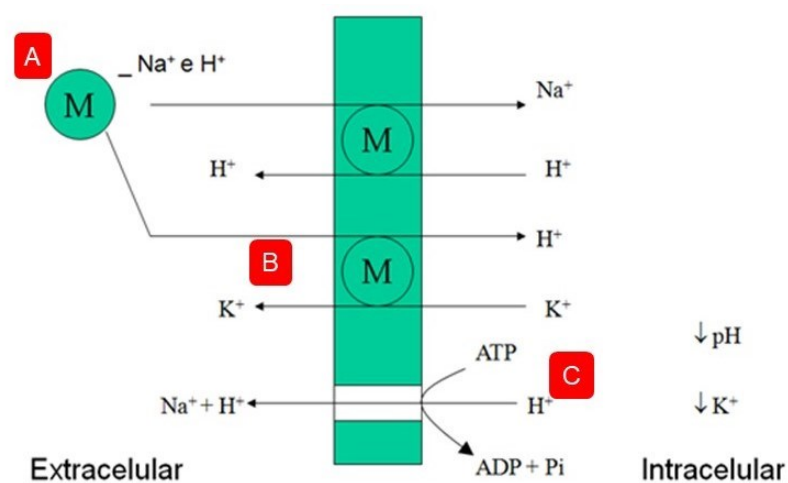


Figura 1 – Representação esquemática da atuação da monensina sobre a bactéria *Streptococcus bovis*. A = formação do complexo lipofílico cátion-ionóforo. B = estabilização do complexo à membrana celular. C = bomba de próton ATPase. M = monensina. Adaptado de Russel e Strobel (1989).

Page (2003), em uma revisão de literatura sobre o uso de antibióticos na alimentação de animais de produção, descreveu inúmeros efeitos da utilização de monensina sobre parâmetros fermentativos em ruminantes. Na produção ruminal de ácidos orgânicos foi verificado aumento da concentração ruminal de propionato, manutenção estável da concentração total de AGV, redução da concentração ruminal de butirato, inibição de microrganismos produtores de ácido lático, redução do lactato ruminal e aumento do pH, além da inibição de bactérias produtoras de hidrogênio e formato. Nos efeitos da monensina sobre a ingestão, observou-se que o consumo foi dependente das características da forragem, havendo redução do consumo (de 5 a 16%) em dietas a base de grãos e aumento do consumo (15%) em dietas a base de forragens, além de redução na variação de consumo entre animais. O autor relata ainda que a utilização de monensina foi capaz de reduzir (4 a 31%) a produção ruminal de metano, inibir as bactérias produtoras de hidrogênio e reduzir a produção de metano no intestino. Além disso, as constatações sobre mudanças na utilização de proteína mostraram que a monensina reduziu a desaminação ruminal, a quantidade de amônia e a proteólise ruminal, como também aumentou a proteína dietética e aminoácidos totais que chegavam no intestino delgado, reduziu a utilização de aminoácidos para a gliconeogênese e aumentou a quantidade de N retido na carcaça (9 a 19%).

Poucos trabalhos relataram a influência de ionóforos sobre a qualidade de carne e parâmetros de carcaça. Alguns trabalhos relatam que utilização de monensina não influenciou nenhum aspecto de carcaça ou qualidade de carne (BOUCQUÉ et al., 1982; GILKA et al., 1989; MEYER et al., 2009; SILVA et al., 2018ab).

Virginiamicina

Dentre os aditivos antimicrobianos classificados e aprovados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como promotores de crescimento, a virginiamicina é o antibiótico não-ionóforo mais conhecido no Brasil para dietas de bovinos de corte.

A virginiamicina é um antibiótico pertencente à classe das estreptograminas, que é produzida por cepas de *Streptomyces virginiae*, originalmente encontradas em solos da Bélgica (DESOMER; VAN DIJCK, 1955 citados por PAGE, 2003). Ela é formada por dois componentes químicos: fator M (pertence ao grupo das estreptograminas A) e fator S (pertence grupo das estreptograminas B). O fator M ($C_{28}H_{35}N_3O_7$) tem peso molecular

de 526 e o fator S ($C_{43}H_{49}N_7O_{10}$) de 824 (CROOY; DE NEYS, 1972). Os fatores M e S individualmente possuem menor eficiência (COCITO et al., 1997), entretanto, quando combinados na proporção de 4:1, respectivamente, desempenham efeito sinérgico 10 vezes mais potente contra as bactérias gram-positivas (CHAMPNEY; TOBER, 2000). Já as bactérias gram-negativas, apresentam membrana externa que é impermeável à virginiamicina, o que faz com que ela atue principalmente sobre bactérias gram-positivas, por mais que ainda existam poucas espécies de gram-negativas susceptíveis a esse aditivo (COCITO et al., 1997).

De modo geral, a virginiamicina atua no processo intracelular de síntese proteica. Após passar pela parede celular a virginiamicina se liga à subunidade 50s do ribossomo, inibindo a formação de ligações peptídicas durante a síntese de proteínas (COCITO, 1979).

Segundo Page (2003), o fator M atua na inibição de fases primárias enquanto o S em fases posteriores da síntese proteica, sendo que o fator M provoca mudanças na conformação da subunidade 50s do ribossomo. Essas mudanças no ribossomo são responsáveis pela ação sinérgica dos dois fatores. De acordo com Cocito et al. (1974), a inibição da fase de alongamento da síntese proteica ocorre porque na presença do fator M os complexos de iniciação ribossomal são colocados de maneira normal mas funcionalmente inativos porque ele bloqueia a ligação do substrato ao receptor e ao sítio doador da peptidil transferase (CHINALI; MOUREAU; COCITO, 1981; CHINALI; MOUREAU; COCITO, 1984). E como a afinidade do ribossomo pelo fator S aumenta de forma simultânea (NYSSSEN; DI GIAMBATTISTA; COCITO, 1989), o fator S previne a elongação da cadeia polipeptídica e faz com que as cadeias proteicas incompletas se soltem (CHINALI et al., 1988ab).

Entre os efeitos mais conhecidos da virginiamicina estão: a redução da incidência de abscessos hepáticos (NAGARAJA; CHENGAPPA, 1998; NARAYANAN et al., 1998), a diminuição da desaminação proteica ruminal (IVES et al., 2002) e a redução de lactato juntamente com aumento de propionato que pode aumentar o crescimento animal (NAGARAJA et al., 1987).

Utilizando 7 trabalhos e mais de 3100 animais, Rogers et al. (1995) avaliaram diferentes doses de virginiamicina e seus efeitos sobre os animais. De modo geral, a inclusão de virginiamicina aumentou o ganho médio diário e/ou a eficiência alimentar, porém sem efeito substancial no consumo de matéria seca. Diante disso, os autores concluíram que as melhores doses foram de 19,3 a 27,3 mg/kg MS para aumentar o ganho

médio diário, de 13,2 a 19,3 mg/kg MS para aumentar a eficiência alimentar e de 16,5 a 19,3 mg/kg MS para reduzir a incidência de abscessos hepáticos.

Tedeschi e Gorocica-Buenfil (2018) realizaram uma análise estatística que envolveu 26 trabalhos e mais de 7000 animais, para avaliar a efetividade da molécula e sugerir a dosagem ótima da virginiamicina. Os autores concluíram que quando os animais receberam entre 12 e 24 mg/kg MS a virginiamicina foi efetiva na redução de abscessos hepáticos e que ainda o uso de virginiamicina aumentou o GMD comparativamente à monensina na mesma dosagem e período de duração da utilização. De acordo com Page (2003), a virginiamicina também é capaz de melhorar a eficiência alimentar e reduzir a produção de metano, efeitos semelhantemente encontrados com o uso de monensina.

Chaves et al. (2018) avaliaram os efeitos da inclusão de flavomicina, virginiamicina ou monensina em tourinhos alimentados com dietas de alto grão (85% milho + 15% pellet comercial) e não foi constatada nenhuma diferença estatística nas características de desempenho animal. O mesmo resultado foi encontrado por Lemos et al. (2016), que forneceram os aditivos de forma isolada (monensina, virginiamicina ou flavomicina) ou a associação entre eles (monensina + virginiamicina e monensina + flavomicina).

Contudo, tem sido bastante discutido qual é o efeito do uso associado entre ionóforos e não-ionóforos ou até óleos essenciais. Nesse contexto, Nuñez et al. (2013) avaliaram os efeitos da associação entre virginiamicina e salinomicina, utilizando dois níveis de concentrado (73 e 91%) e encontraram efeito aditivo na associação da virginiamicina com o ionóforo, no qual houve redução do consumo de matéria seca, mantendo o ganho médio diário e sem efeito sobre as características de carcaça.

Santos et al. (2018) também verificaram que a associação entre monensina + óleos essenciais e monensina + virginiamicina possibilitou maior ganho de peso para os animais, quando comparados aos que receberam apenas a inclusão de monensina na dieta. Do mesmo modo, Heker Junior et al. (2018) avaliando os efeitos associativos de monensina, virginiamicina e óleos essenciais concluíram que a associação dos aditivos foi melhor que a utilização apenas da monensina, pois aumentou o ganho de peso, o ganho de carcaça e a espessura de gordura.

O fornecimento isolado de monensina ou virginiamicina ou a associação entre os dois aditivos na dieta de cordeiros não influenciou o pH, marmoreio, perda por cocção nem a força de cisalhamento da carne desses animais (SILVA et al., 2018ab). No entanto, Silva et al. (2019) encontraram maior presença do CLA *trans10-cis12* no músculo

longissimus de animais que receberam monensina ou monensina + virginiamicina comparado aos animais que receberam apenas óleos essenciais. Ainda sobre a associação de monensina com virginiamicina, Luiz (2016) também relata que essa estratégia não apresentou influência sobre o pH, composição centesimal, perda por cocção, força de cisalhamento, aroma e sabor da carne.

Rigueiro et al. (2016) recomendam que a associação de monensina com virginiamicina seja feita durante o período de adaptação e que a monensina seja retirada na fase de terminação, pois essa estratégia aumentou a ingestão de matéria seca, o peso de carcaça quente e o rendimento de carcaça dos animais sem afetar negativamente parâmetros ruminais e sanguíneos. Oliveira (2018), induzindo acidose láctica ruminal com sacarose obteve os melhores resultados com a associação de monensina e virginiamicina que foi capaz de postergar a produção de ácido láctico, sendo que ao fim do experimento também apresentou maiores valores de pH.

Bacitracina de Zinco

A bacitracina é composta por uma mistura de polipeptídeos cíclicos, que é produzida por algumas cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Ela tem efeito bactericida sobre bactérias gram-positivas, mas exerce pouca atividade contra gram-negativas (PRESCOTT; GIGUÈRE; DOWLING, 2000). A bacitracina por si só é uma molécula instável em altas temperaturas e/ou na presença de luz, por isso é mais comumente usada na forma complexada com zinco, que confere maior estabilidade ao complexo do antibiótico (QUINLAN; GUTTERIDGE, 1989).

De acordo com Siewert e Strominger (1967), a bacitracina atua inibindo o transporte de precursores de peptidoglicano, N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), através da membrana citoplasmática. Geralmente, esses precursores (NAM-NAG) são agregados no citoplasma e levados através da membrana celular por um transportador lipídico pirofosfato (undecaprenol ou bacteroprenol pirofosfato). Quando o precursor é liberado no local da síntese da parede celular, o transportador lipídico permanece na membrana celular como um pirofosfato (P-P). Com isso, a bacitracina se liga ao lipídeo P-P e inibe a sua desfosforilação, impedindo o transporte de precursores de peptidoglicano e inibindo a síntese da parede celular.

Os primeiros relatos de uso da bacitracina na alimentação animal foram com aves, na qual a inclusão do preparo desse antibiótico elevou o peso corporal das aves quando comparadas ao tratamento controle (HEUSER; NORRIS, 1952; LEWIS; SANFORD,

1953; PATRICK, 1953; PAGE, 2003). Na avicultura de corte, a utilização de bacitracina de zinco tem o objetivo de controlar a enterite necrótica por meio da diminuição de *Clostridium perfringens* (ENGBERG et al., 2000), o que pode melhorar o desempenho animal através do melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta em função da redução dos danos à parede intestinal.

Como os antibióticos classificados como promotores de crescimento são os mais utilizados para aves nos últimos anos (SURESH et al., 2018), muito tem se discutido sobre a proibição desses aditivos com base na possibilidade de resistência e com isso novas recomendações substitutivas tem aparecido na nutrição de aves (SNIFFEN et al., 1992; LEONARDI; ARMENTANO, 2003; AMACHAWADI; NAGARAJA, 2016) e suínos (DINUSSON et al., 1969; HALL, 2008). Entretanto, são poucos os relatos atuais da utilização desse antibiótico na alimentação de ruminantes. Além disso, sabe-se que a bacitracina de zinco também tem foco de uso na saúde humana em tratamentos dermatológicos (SCHWARTZ; AL MUTAIRI, 2010; DRUCKER, 2012).

Ao avaliar os efeitos da adição de monensina ou bacitracina em um mix de bactérias, incubado por 24h em ambiente anaeróbico, Russel e Strobel (1988) constataram que a bacitracina apresentou efeitos semelhantes à monensina, como redução da produção de metano, aumento de propionato e redução da produção de amônia. Por outro lado, Streeter et al. (2016) reportaram que a infusão ruminal de glicose foi capaz de desenvolver quadro de acidose láctica nas ovelhas que recebiam 220 mg/kg desse aditivo.

Alguns estudos reportam aumento de ganho de peso, melhoria da eficiência alimentar e maior retenção de N em bezerros e ovelhas com a utilização da bacitracina (PIVNTAK et al., 1981; MÄNNER et al., 1993; JAMROZ et al., 1987ab; LOHNERT et al., 1993; LOHNERT and OCHRIMENKO, 1995; ERANOV et al., 1996; citados por PAGE, 2003). Além disso, a incidência de abscessos hepáticos continua sendo grande preocupação para a indústria de confinamentos, sendo que o aparecimento é maior em novilhos Holandeses criados para produção de carne do que nas raças de corte propriamente ditas, por razões ainda não conhecidas (AMACHAWADI; NAGARAJA, 2016). Abscessos hepáticos são geralmente sequelas de acidose ruminal e rumenite em bovinos alimentados com dietas ricas em carboidratos altamente fermentáveis e com baixo teor de fibras, denominando o termo “complexo acidose-rumenite abscesso hepático”, sendo que a *Fusobacterium necrophorum*, uma bactéria ruminal, é o principal agente causador e a *Trueperella* (anteriormente *Arcanobacterium*) *pyogenes* é o patógeno secundário (AMACHAWADI; NAGARAJA, 2016). Antimicrobianos como a tilosina, a

clortetraciclina, a oxitetraciclina, a bacitracina e a virginiamicina, são aprovados para prevenção de abscessos hepáticos em muitos países (CAMERON; MCALLISTER, 2016). Entretanto desde o início de 2017 o uso de tilosina nos Estados Unidos em bovinos confinados para a prevenção de abscessos hepáticos está sob supervisão veterinária do FDA (Food and Drug Administration), o que gera uma atenção especial para avaliação de alternativas à tilosina no controle de abscessos hepáticos, como por exemplo o uso da bacitracina de zinco.

2.2. Síntese e degradação lipídica

A lipogênese é o processo da síntese de tecido adiposo, que ocorre de maneira pronunciada após a puberdade e maturidade sexual. Entretanto, não ocorre de forma homogênea no corpo do animal, pois, de acordo com Pethick et al. (2004), a deposição de gordura se inicia no abdômen, região inguinal e pélvica, seguidas da gordura intermuscular, subcutânea e por último a gordura intramuscular, conhecida como marmoreio. A deposição de gordura é o resultado do somatório da captação e síntese menos a oxidação dos triglicerídeos (LADEIRA et al., 2018). Para a síntese dos triglicerídeos são necessários ácidos graxos não esterificados (AGNE) e glicerol. O glicerol é obtido a partir de glicose, já os AGNE podem ser obtidos a partir da síntese *de novo*, tendo glicose ou acetato como substrato, ou por meio de ácidos graxos pré-formados da dieta (PETHICK et al., 2004).

Os ácidos graxos que escapam do rúmen e são absorvidos no intestino, são reesterificados e transportados pelos quilomicrons, chegando nos adipócitos, nos quais sofrerão ação da lipoproteína lipase (LPL). A LPL é produzida pelos adipócitos e secretada nos capilares do tecido. Ela é a principal enzima que quebra os triglicerídeos nos quilomicrons, liberando ácidos graxos livres (GOLDBERG; MERKEL, 2001). Para que os ácidos graxos livres entrem no adipócito, é necessário que a proteína de ligação ao ácido graxo (FABP) facilite a entrada dessa molécula (JURIE et al., 2007). A FABP é importante no transporte dos ácidos graxos livres pois atua na entrada, em condições de anabolismo, e saída, em condições de catabolismo, de ácidos graxos no adipócito (VURAL et al., 2008). Além da FABP, os ácidos graxos livres podem entrar no adipócito pela enzima ácido graxo translocase (CD36) ou da proteína de transporte de ácido graxo (FATP). Outra forma de transporte de ácidos graxos seria através dos receptores de ácidos graxos localizados na membrana celular, conhecidos como receptores acoplados à proteína G (GPR) ou como receptores de ácidos graxos livres (FFARs) (SMITH et al.,

2012), que possuem especificidades diferentes por cada tipo e tamanho de ácido graxo. Segundo Miyamoto et al. (2016) a FFAR1 tem maior afinidade por ácidos graxos de cadeia média e longa, a FFAR2 e 3 por ácidos graxos saturados de cadeia curta (como por exemplo o acetato e o propionato) e a FFAR4 por ácidos graxos de cadeia longa, sendo esta última ativada por ácidos graxos polinsaturados.

O principal fator que controla a taxa de deposição de gordura é o estado nutricional do animal, sendo o acetato o principal precursor para a síntese de ácidos graxos nos ruminantes (SHINGFIELD et al., 2010). A síntese *de novo* começa a partir da molécula de acetil-CoA, que pode ser oriunda do acetato, gerado na fermentação ruminal, ou da glicose após passar pela via da glicólise. A atividade da enzima acetil-CoA carboxilase, codificada pelo gene *ACACA*, é o primeiro passo da síntese *de novo* no qual ocorre a carboxilação da molécula de acetil-CoA que é transformada em malonil-CoA. Logo após, outra molécula de acetil-CoA é ligada às moléculas de malonil-CoA (em um processo de várias reações em série) pela atividade do complexo multienzimático chamado de ácido graxo sintetase, que é codificado pelo gene *FASN* (LADEIRA et al., 2016).

Após a síntese e/ou captação, os ácidos graxos podem sofrer ação da enzima esteroil-CoA dessaturase (SCD), codificada pelo gene *SCD1*, responsável por transformar o ácido graxo saturado em insaturado através da inserção de duplas ligações na cadeia (LADEIRA et al., 2018). O gene *SCD1*, codificador da enzima SCD, é bastante estudado e os relatos na literatura mostram que sua expressão é altamente influenciada pela dieta (GRAUGNARD et al., 2009; WATERS et al., 2009; LADEIRA et al., 2014; ZHANG et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017).

Já no catabolismo, ou seja, durante a lipólise, o ácido graxo é transportado para o interior da mitocôndria e sofre oxidação. A carnitina palmitoiltransferase (CPT2) é uma enzima ligada à membrana interna mitocondrial. Os ácidos graxos de cadeia longa são transportados para as mitocôndrias como acilcarnitinas através da atuação em sequência da acil-CoA sintetase (CPT I) e da carnitina-acilcarnitina translocase (CACT). Essas acilcarnitinas de cadeia longa, representadas pela palmitoilcarnitina (C16), são então transformadas novamente em acil-CoA pela CPT II para fornecer substratos para o sistema de β -oxidação (FRITZ; YUE, 1963; YATES; GARLAND, 1970).

Contudo, o ácido graxo não necessariamente é oxidado apenas na mitocôndria. O processo da β -oxidação também pode ocorrer nos peroxissomos, que são organelas de aproximadamente 0,1 - 1 μm (SCHRADER; FAHIMI, 2008). De acordo com Fiamoncin (2011), por mais que as reações da β -oxidação mitocondrial sejam bastante parecidas com

a β -oxidação peroxissomal, existem muitas diferenças, começando pela maquinaria enzimática e destino dos produtos gerados. Nos peroxissomos, o primeiro passo da via não é catalisado pela acil-CoA desidrogenase como na mitocôndria, e sim pela acil-CoA oxidase, codificada pelo gene *ACOX*. A acil-CoA oxidase é uma flavoproteína que faz a transferência dos elétrons da desidrogenação do acil-CoA para o oxigênio molecular. Esse passo não gera NADH, não contribui na produção de ATP, mas produz H_2O_2 que é oxidado pela catalase e gera H_2O e $\frac{1}{2} O_2$. Outra diferença entre as vias é referente ao tipo de substrato, sendo que o peroxissomo possui enzimas para oxidar PUFA e ácido graxo de cadeia muito longa, e a mitocôndria não. Com relação à entrada do substrato, na mitocôndria a entrada é exclusivamente mediada pelo sistema da carnitina palmitoil transferase (CPT), já no peroxissomo não existe esse sistema, mas, na saída do acil-CoA a carnitina desempenha papel fundamental (WANDERS et al., 2001).

De maneira geral, o aumento da captação de ácidos graxos e da lipogênese juntamente com a redução da oxidação estão associados com o aumento da deposição da gordura intramuscular, ou seja, mudanças no *turnover* lipídico (balanço entre a síntese e a degradação) podem resultar no aumento ou redução do marmoreio (LADEIRA et al., 2018).

De acordo com Smith et al. (2009), a idade do animal e o tempo que esse animal recebe dieta rica em grãos são os principais fatores que influenciam a deposição de gordura. Graugnard et al. (2010) encontraram maior expressão de *SREBF1*, *PPARG*, *FABP4*, *FASN* e *SCDI* em animais que receberam dieta com alta inclusão de amido. Por outro lado, trabalhando com uma dieta contendo milho moído e outra dieta contendo grão de milho inteiro, Teixeira et al. (2017) constatou que a dieta de grão de milho inteiro não aumentou o marmoreio da carne, porque o baixo pH ruminal afetou a expressão gênica e reduziu *SREBF1*.

No trabalho realizado por Li et al. (2018), foram realizadas 5 biópsias musculares em novilhos recebendo dietas a base de milho para avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico. As biópsias foram realizadas a partir dos 12 meses de idade com intervalo de 4 meses entre elas. Os autores concluíram que a expressão da *FABP4*, *ACACA*, *SCDI* e do *SREBF1* aumentou de acordo com o tempo, enquanto que da *FASN* e do *PPARG* reduziu. O mesmo comportamento do resultado para *FABP4* foi encontrado por Moore et al. (1991) e para o *PPARG* por Smith et al. (2012). Diante disso, Li et al. (2018) e Smith et al. (2012) sugeriram que a redução na expressão do *PPARG*

pode ter sido em função da depressão na diferenciação dos adipócitos durante o período de engorda dos bovinos de corte.

2.3. Fatores de transcrição

Nutrientes e compostos bioativos nas dietas de ruminantes podem interagir com o genoma (OSORIO; MOISA, 2019) e seus fatores de transcrição, que fazem parte do grupo de receptores nucleares. Os receptores nucleares podem controlar o metabolismo porque possuem a capacidade de afetar a expressão de RNAm dos genes alvo (DESVERGNE; MICHALIK; WAHLI, 2006). Desse modo, os receptores nucleares representam um importante sistema regulador do metabolismo nas células, tecidos e órgãos, desempenhando papel fundamental na coordenação do metabolismo (BIONAZ et al., 2013).

A associação de fatores nutricionais com a modulação do metabolismo de gordura é um dos recentes alvos de estudos nutrigenômicos realizados com bovinos de corte e por isso tem se estudado a influência dos receptores nucleares sob o metabolismo de ácidos graxos (LADEIRA et al., 2016).

A sigla PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma) refere-se à família de receptores nucleares que desempenham funções significantes na regulação do metabolismo dos nutrientes e homeostase energética (LEMAY; HWANG, 2006). As isoformas do PPAR trabalham como heterodímeros com o receptor X de retinóide (RXR), e quando ambos estão ligados a uma sequência específica do DNA na região promotora do gene, podem induzir ou reprimir a expressão do gene (POULSEN; SIERSBÆK; MANDRUP, 2012).

As isoformas do PPAR (α , γ e β/δ) desempenham vários papéis em diferentes tecidos, por exemplo, o PPAR γ (PPARG) atua sob a adipogênese, lipogênese e sensibilidade à insulina (OLEFSKY; SALTIEL, 2000), enquanto que o PPAR α (PPARA) participa na oxidação hepática de ácidos graxos (TYAGI et al., 2011). Por sua vez, o PPAR β/δ (PPARD), menos estudado, tem função sob o catabolismo de ácidos graxos no músculo esquelético (OSORIO; MOISA, 2019), regula a captação de glicose (DESVERGNE et al., 2006) como também a proliferação de células satélites musculares e a regeneração muscular pós-natal (ANGIONE et al., 2011). Embora, ainda existam especulações e discussões sobre os verdadeiros locais de atuação e funções dos PPARs, de acordo com Bionaz et al. (2013) o PPARG teria expressão mais abundante em tecidos

lipogênicos e o PPARA em tecidos onde a oxidação de AGCL é maior, enquanto que o PPARD seria mais expresso nos 3 tipos de tecido adiposo.

Outro fator de transcrição importante é o SREBP, que atua sob a homeostase energética, promovendo glicólise e lipogênese (LADEIRA et al., 2016), atuando também na diferenciação celular da adipogênese (TANG; LANE, 2012). A família do SREBP é composta por três membros (1a, 1c e 2). O SREBP-1c é codificado pelo gene do fator de transcrição do elemento regulador do esterol 1 (*SREBF1*) e parece atuar mais especificamente nos genes envolvidos na síntese de ácidos graxos (SHIMANO et al., 1997), enquanto o SREBP-2 tem maior influência na regulação da expressão de genes colesterogênicos (EBERLE et al., 2004).

O *SREBF1* controla a expressão de genes de ativação através da ligação ao elemento de regulação do esterol (SRE) contidos no promotor do gene. A expressão da *ACACA* e da *FASN* é regulada forte e positivamente pelo *SREBF1*, mostrando que ele tem efeito sobre a síntese de ácidos graxos. A insulina regula positivamente a expressão do *SREBF1* enquanto que o glucagon negativamente (DESVERGNE et al., 2006). Além dos efeitos hormonais sobre o *SREBF1*, os ácidos graxos também podem apresentar efeitos sobre a expressão desse gene (OBSSEN et al., 2012). Durante a biohidrogenação, quando o rúmen apresenta pH baixo, esse processo sofre uma alteração de rota e aumenta a produção do isômero CLA C18:2 *trans10-cis12*, mas por outro lado, em condições normais ocorre a formação do isômero CLA C18:2 *cis9-trans11* (LADEIRA et al., 2018). Em humanos, o isômero CLA C18:2 *cis9-trans11* pode apresentar propriedades anticarcinogênicas e de prevenção à diabetes (VAHMANI et al., 2015), o que mostra que esse isômero tem importância não só na produção animal, como também na saúde humana. Para bovinos de leite, Peterson, Matitashvili e Bauman (2004) relataram que o CLA C18:2 *trans10-cis12* reduziu a abundância de mRNA de *ACACA*, *FASN* e *SCD1* na glândula mamária, afetando negativamente a gordura no leite, uma vez que o uso desse isômero diminui a síntese proteica de SREBP. No trabalho de Harvatine e Bauman (2006), tanto o fornecimento de CLA C18:2 *trans10-cis12* quanto a dieta em baixa forragem e rica em óleo promoveram queda na gordura do leite. Os autores ainda relatam queda nos genes de captação e da síntese *de novo*, além do SREBP, o que vai reduzir a lipogênese. De acordo com Obsen et al. (2012), altos níveis de PUFAs estão envolvidos com a redução da *SREBF1*. Dietas ricas em grãos provocam queda no pH ruminal, que pode alterar a via da biohidrogenação ruminal e aumentar a produção do C18:2 *trans10, cis12* (TEIXEIRA et al., 2017), que vai reduzir a expressão de *SREBF1*, provocando

consequente redução da síntese de ácidos graxos e do marmoreio. As vias de atuação do SREBP sob a lipogênese estão ilustradas na Figura 2.

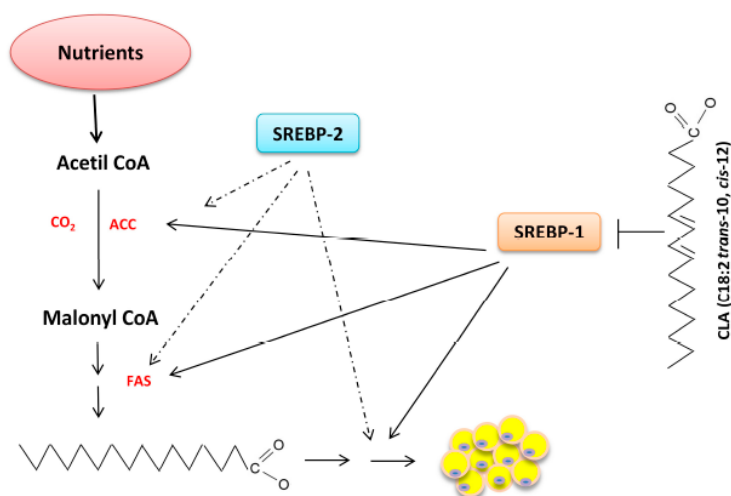


Figura 2 – Mecanismo proposto para o efeito dos ácidos graxos sob a regulação de enzimas envolvidas na lipogênese via SREBPs (linhas sólidas indicam maiores efeitos; linhas pontilhadas indicam menores efeitos). SREBP: proteína de ligação ao elemento regulador de esteroide, ACC: acetil-CoA carboxilase, FAS: ácido graxo sintase, CLA: ácido linoleico conjugado. Fonte: Ladeira et al., 2016.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMACHAWADI, R.; NAGARAJA, T. G. Liver abscesses in cattle: A review of incidence in Holsteins and of bacteriology and vaccine approaches to control in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 4, p. 1620-1632, 2016.

ANGIONE, A. R. et al. PPAR δ regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration. **Skeletal muscle**, v. 1, n. 1, p. 33, 2011.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.

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

BOUCQUÉ, C. V. et al. Monensin-sodium as a performance-promoting additive for fattening bulls and its impact on carcass and meat quality characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 7, n. 4, p. 401-410, 1982.

CAMERON, A.; MCALLISTER, T. A. Antimicrobial usage and resistance in beef production. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 68, 2016.

CHAMPNEY, W. S.; TOBER, C. L. Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics. **Current microbiology**, v. 41, n. 2, p. 126-135, 2000.

CHAVES, F. B. A. et al. **Desempenho Produtivo Novilhos Nelore Terminados Em Confinamento E Alimentados Com Dietas De Alto Grão Contendo Diferentes Aditivos**. Anais... **Zootecnia Brasil**. Goiânia-GO, 2018.

CHINALI, G.; MOUREAU, P.; COCITO, C. The action of virginiamycin M on the acceptor, donor, and catalytic sites of peptidyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 15, p. 9563-9568, 1984.

CHINALI, G.; MOUREAU, P.; COCITO, C. G. The Mechanism of Action of Virginiamycin M on the Binding of Aminoacyl-tRNA to Ribosomes Directed by Elongation Factor Tu. **European Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 3, p. 577-583, 1981.

CHINALI, G. et al. Action of erythromycin and virginiamycin S on polypeptide synthesis in cell-free systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 951, n. 1, p. 42-52, 1988a.

CHINALI, G. et al. Inhibition of polypeptide synthesis in cell-free systems by virginiamycin S and erythromycin. Evidence for a common mode of action of type B synergimycins and 14-membered macrolides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 949, n. 1, p. 71-78, 1988b.

COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin family inhibitors which contain synergistic compounds. **Microbiological Reviews**, v. 43, p. 145-198, 1979.

COCITO, C. et al. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, n. suppl_1, p. 7-13, 1997.

COCITO, C.; VOORMA, H.; BOSCH, L. Interference of virginiamycin M with the initiation and the elongation of peptide chains in cell-free systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 340, n. 3, p. 285-298, 1974.

CROOY, P.; DE NEYS, R. Virginiamycin: Nomenclature. **The Journal of Antibiotics**, v. 25, n. 6, p. 371-372, 1972.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. **Physiological reviews**, v. 86, n. 2, p. 465-514, 2006.

DINUSSON, W. et al. High moisture oats in rations for beef cattle. 1969.

DRUCKER, C. R. Update on topical antibiotics in dermatology. **Dermatologic therapy**, v. 25, n. 1, p. 6-11, 2012.

EBERLE, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839-848, 2004.

ENGBERG, R. M. et al. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry science**, v. 79, n. 9, p. 1311-1319, 2000.

FIAMONCINI, J. **Efeitos da dieta com diferentes conteúdos de ácidos graxos ômega-3 no metabolismo energético - modulação da função dos peroxissomos** 2011. Universidade de São Paulo

FRITZ, I. B.; YUE, K. T. Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. **Journal of Lipid Research**, v. 4, n. 3, p. 279-288, 1963.

GILKA, J. et al. Carcass traits and meat quality of male lambs fed monensin or lasalocid. **Meat Science**, v. 25, n. 4, p. 265-272, 1989.

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

GRAUGNARD, D. E. et al. High-starch diets induce precocious adipogenic gene network up-regulation in longissimus lumborum of early-weaned Angus cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 07, p. 953-963, 2010.

GRAUGNARD, D. E. et al. Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus × Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 142, March 31 2009.

GUAN, H. et al. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 7, p. 1896-906, Jul 2006.

HALL, M. B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: Comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 1, p. 42-49, 2008.

HARVATINE, K.; BAUMAN, D. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 10, p. 2468 - 2474, 2006.

HEKER JUNIOR, J. C. et al. Effect of monensin sodium associative to virginiamycin and/or essential oils on the performance of feedlot finished steers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 261-274, 2018.

HEUSER, G.; NORRIS, L. Some results of feeding antibiotics to chickens. **Poultry Science**, v. 31, n. 5, p. 857-862, 1952.

IVES, S. E. et al. Effects of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed^{1,2}. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 11, p. 3005-3015, 2002.

JURIE, C. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 2660-2669, 2007.

LADEIRA, M. et al. Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 597-605, 2014.

LADEIRA, M. M. et al. Nutrigenomics and Beef Quality: A Review about Lipogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 918, 2016.

LADEIRA, M. M. et al. Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. **Animal**, p. 1-13, 2018.

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

LEMOS, B. J. M. et al. Monensin, virginiamycin, and flavomycin in a no-roughage finishing diet fed to zebu cattle. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 10, p. 4307-4314, 2016.

LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 557-564, 2003.

LEWIS, R.; SANFORD, P. Use of equivalent levels of antibiotic and vitamin B12 supplements with cottonseed and soybean oil meals in chick diets. **Poultry Science**, v. 32, n. 2, p. 268-275, 1953.

LI, X. Z. et al. Adipogenic/lipogenic gene expression and fatty acid composition in chuck, loin, and round muscles in response to grain feeding of Yanbian Yellow cattle. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 7, p. 2698-2709, 2018.

LUIZ, F. P. **Efeito Do Uso Combinado De Monensina Sódica E Virginiamicina Sobre As Características Da Carne De Bovinos Nelore Terminados Em Confinamento**. Dissertação de Mestrado, 2016. Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu

MARCONDES, M. I. et al. Energy requirements for beef cattle. In: VALADARES FILHO, S. C.; COSTA E SILVA, L. F., *et al* (Ed.). **Nutrient Requirements of Zebu and Crossbred Cattle**. 3. Viçosa: Suprema, v.1, 2016. p.163 - 190. ISBN 978-85-8179-110-4.

MEYER, N. et al. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 7, p. 2346-2354, 2009.

MIYAMOTO, J. et al. Nutritional signaling via free fatty acid receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 450, 2016.

MOORE, K. et al. Relationship between fatty acid-binding protein activity and marbling scores in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 4, p. 1515-1521, 1991.

NAGARAJA, T. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**: Springer, 1997. p.523-632.

NAGARAJA, T. et al. In vitro lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 4, p. 1064-1076, 1987.

NAGARAJA, T. G.; CHENGAPPA, M. M. Liver abscesses in feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 287-298, 1998.

NARAYANAN, S. et al. **Biochemical and biological characterizations and ribotyping of Actinomyces pyogenes and Actinomyces pyogenes-like organisms from liver abscesses in cattle** Contribution 97-396-J from the Kansas Agricultural Experiment Station.1. 1998. 289-303

NEEHA, V.; KINTH, P. Nutrigenomics research: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 415-428, 2013.

NUÑEZ, A. J. C. et al. Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nelore steers fed high concentrate diets. **Scientia Agricola**, v. 70, p. 229-236, 2013.

NYSSSEN, E.; DI GIAMBATTISTA, M.; COCITO, C. Analysis of the reversible binding of virginiamycin M to ribosome and particle functions after removal of the antibiotic. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1009, n. 1, p. 39-46, 1989.

OBSSEN, T. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases de novo lipid synthesis in human adipocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 6, p. 580-590, 2012.

OLEFSKY, J. M.; SALTIEL, A. R. PPAR γ and the treatment of insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 9, p. 362-368, 2000.

OLIVEIRA, F. L. C. **Avaliação comparativa de diferentes aditivos na prevenção da acidose láctica ruminal em bovinos de corte**. 2018. Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

OSORIO, J. S.; MOISA, S. J. Gene Regulation in Ruminants: A Nutritional Perspective. In: (Ed.). **Gene Expression and Control**: IntechOpen, 2019.

PAGE, S. The role of enteric antibiotics in livestock production. **Canberra, Australia: Avcare Ltd**, 2003.

PATRICK, H. Supplements for a "meat-scrap" type chick ration. **Poultry Science**, v. 32, n. 4, p. 570-572, 1953.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D. E. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2523-2527, 2004.

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

PINTO, A. C. J.; MILLEN, D. D. Nutritional Recommendations And Management Practices Adopted By Feedlot Cattle Nutritionists: The 2016 Brazilian Survey. **Canadian Journal of Animal Science**, n. ja, 2018.

POULSEN, L. L. C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*, 2012. Elsevier. p.631-639.

PRESCOTT, J. F.; GIGUÈRE, S.; DOWLING, P. M. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. John Wiley & Sons, 2000. ISBN 111867507X.

PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual review of biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 501-530, 1976.

QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. Bacitracin and a bacitracin-zinc complex damage DNA and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. **Free radical research communications**, v. 7, n. 1, p. 37-44, 1989.

RIBEIRO, A. F. et al. Fatty acid profile, meat quality, and carcass traits of Nellore young bulls fed different sources of forage in high-concentrate diets with crude glycerin. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 4, p. 165-173, 2016.

RIGUEIRO, A. et al. 1400 Feedlot performance and carcass traits of Nellore cattle fed different combinations of sodium monensin and virginiamycin. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. suppl_5, p. 678-678, 2016.

ROGERS, J. A. et al. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abscess incidence in feedlot cattle^{1,2}. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 1, p. 9-20, 1995.

RUSSELL, J.; STROBEL, H. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 552-558, 1988.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1-6, 1989.

SANTOS, K. R. et al. ASSOCIAÇÃO DE ADITIVOS EM DIETAS DE BOVINOS DE CORTE EM CONFINAMENTO. Zootecnia Brasil. Goiânia GO 2018.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. The peroxisome: still a mysterious organelle. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 4, p. 421-440, 2008.

SCHWARTZ, R. A.; AL MUTAIRI, N. Topical antibiotics in dermatology: An update. **GJDV**. 2010; 17 (1), 1, v. 19, 2010.

SHIMANO, H. et al. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 5, p. 846-854, 1997.

SHINGFIELD, K. et al. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1140-1166, 2010.

SIEWERT, G.; STROMINGER, J. L. Bacitracin: an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 57, n. 3, p. 767, 1967.

SILVA, A. P. S. et al. Effect of replacing antibiotics with functional oils following an abrupt transition to high-concentrate diets on performance and carcass traits of Nellore cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 247, p. 53-62, 2019/01/01/ 2019.

SILVA, N. N. et al. Perda De Peso Por Cocção E Marmoreio Da Carne De Cordeiros Alimentados Com Dietas Contendo Monensina Sódica E/Ou Virginiamicina. Anais... Zootecnia Brasil. Goiânia-GO, 2018.

SILVA, N. N. et al. FORÇA DE CISALHAMENTO E pH DA CARNE DE CORDEIROS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO MONENSINA SÓDICA E/OU VIRGINIAMICINA. Anais... Zootecnia Brasil. Goiânia-GO, 2018.

SMITH, S. et al. Adipogenic gene expression and fatty acid composition in subcutaneous adipose tissue depots of Angus steers between 9 and 16 months of age. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 8, p. 2505-2514, 2012.

SMITH, S. B. et al. 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. et al. Regulation of fat and fatty acid composition in beef cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 22, n. 9, p. 1225-1233, 2009.

SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992.

SURESH, G. et al. Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 3, p. 318-335, 2018.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 715-736, 2012.

TEDESCHI, L. O.; GOROCICA-BUENFIL, M. A. An assessment of the effectiveness of virginiamycin on liver abscess incidence and growth performance in feedlot cattle: a comprehensive statistical analysis. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 6, p. 2474-2489, 2018.

TEIXEIRA, P. D. et al. Subspecies and diet affect the expression of genes involved in lipid metabolism and chemical composition of muscle in beef cattle. **Meat science**, v. 133, p. 110-118, 2017.

TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 4, p. 236, 2011.

VAHMANI, P. et al. The scope for manipulating the polyunsaturated fatty acid content of beef: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2015.

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

WANDERS, R. et al. **Peroxisomal fatty acid α -and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases:** Portland Press Limited 2001.

WATERS, S. et al. Effect of level and duration of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of $\Delta 9$ -desaturase in muscle of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 244-252, 2009.

YATES, D.; GARLAND, P. Carnitine palmitoyltransferase activities (EC 2.3. 1.-) of rat liver mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 119, n. 3, p. 547-552, 1970.

ZHANG, H. et al. Effects of dietary energy level on lipid metabolism-related gene expression in subcutaneous adipose tissue of Yellow breed \times Simmental cattle. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 4, p. 392-400, 2015.

CHAPTER 2

Thesis was formatted according to the journal Animal Feed Science and Technology guidelines.

4. ARTICLE

Title: Performance and lipid metabolism in Nellore × Angus young bulls fed ionophores and non-ionophores additives

4.1. Highlights

- Performance and carcass traits was not influenced by the additives.
- The animals change their ingestive behavior because additives combination.
- Serum D-lactate are similar by the additives or its combination, and over time.
- *De novo* synthesis decreased while fatty acid uptake increased over time.
- *PPARA* and *CPT2* expression are influenced by additives.

4.2. Abstract

The objective was to evaluate the effects of monensin and its combination with virginiamycin or zinc bacitracin on performance, carcass traits, serum D-lactate and lipid turnover in Nellore × Angus young bulls. Seventy-two animals (417.4 ± 41.0 kg) were housed in 18 pens, 4 animals per pen, in a completely randomized design. There was three treatments: monensin (MON), monensin + zinc bacitracin (MONZB) and monensin + virginiamycin (MONVM). The diet consisted of 85% a corn-based concentrate and 15% of corn silage. Feedlot lasted 109 d, considering 27 d to adaptation and 82 d to experimental period. Muscle biopsy from *longissimus thoracis* were performed on day 7 and blood samples were taken on days 7 and 43 to analyze serum D-lactate. In the slaughter, muscle samples were also collected, to analyze gene expression using RT-qPCR, and carcass traits were measured. There was no significant effect of additives on overall performance, carcass traits and chemical composition of meat ($P > 0.16$). During days 0 to 31, MONVM had smaller average daily gain (ADG) compared to MONZB and MON ($P = 0.02$). However, MONVM tended to present greater ADG than MON and MONZB on days 52 to 81 ($P = 0.08$). Animals fed MONVM presented higher number of meals/day than MON ($P = 0.03$). Moreover, MON had greater preferential intake than MONVM ($P = 0.05$) of middle feed particle size (8 to 19 mm) and refused more small particle size (< 8 mm) than other treatments ($P < 0.01$). Serum D-lactate concentration

was not affected by the additives ($P = 0.50$) or time ($P = 0.40$). There was no significant effect of additives or time on *SREBF1*, *PPARG*, *ACACA* and *SCD1* expression ($P > 0.20$). The expression of *LPL* and *CD36* increased ($P = 0.02$) while *FASN* decreased ($P = 0.07$) over time. *PPARA* expression was greater on day 7 and lower at slaughter for MONZB than other treatments ($P = 0.07$). *CPT2* expression was greater for MONVM at slaughter and lower on day 7 for MONZB ($P = 0.07$). Thus, additive combined use in high-energy diet did not improved overall performance in feedlot and carcass traits, and monensin can be used alone or combined with zinc bacitracin or virginiamycin. In addition, the modifies on gene expression by the additives in the currently study did not change chemical composition of the meat.

Keywords: bacitracin, feedlot, lipid metabolism, lipogenesis, monensin, virginiamycin.

4.3. Introduction

The normal conditions of the ruminal environment is a goal during the beef cattle finishing phase, because changes, mainly in pH, can affect production, health and beef quality. Several factors affect ruminal pH variation, being diet composition one of them. In the feedlot, is regular the use of high-energy diets, with corn as the main ingredient. Moreover, starch is a carbohydrate with higher rumen fermentation rate compared to fiber carbohydrates, which results in greater organic acids formation and consequently ruminal pH decrease. Therefore, some additives are used to modulate ruminal environment, and they are an alternative way to control ruminal pH. For instance, 98.2% of the largest Brazilian feedlots use some type of dietary additive, which 86.7% use ionophores as the main additive and 13.3% use the combination of ionophores and other non-ionophores antibiotics (Pinto and Millen, 2018). Other effects of ionophores and other non-ionophores additives in the rumen are the methane reduction and the increase of propionate production. In this case, the greater endogenous glucose production may be used as substrate for *de novo* fatty acid synthesis, and increase intramuscular fat deposition (Smith et al., 2018).

Chaves et al. (2018) did not find effects of monensin, virginiamycin or flavomycin use compared to control diet (without additive) on performance of animals receiving high-grain diet. However, Heker Junior et al. (2018) evaluating the use of monensin, monensin + virginiamycin, monensin + essential oil or monensin + virginiamycin + essential oil, found that the combined use provided greater average daily gain, compared to the use of

monensin alone. In Heker Junior et al. (2018) study, diet had forage:concentrate ratio of 50:50, and the authors reported no difference in feed efficiency and carcass traits. Gorocica and Tedeschi (2017) found an improvement on average daily gain, feed efficiency and hot carcass weight in animals supplemented with combined use of monensin and virginiamycin compared to monensin alone supplementation. In another study, Lemos et al. (2016), using no-forage diet in zebu cattle did not find difference in average daily gain and carcass traits when monensin was used alone or combined with virginiamycin. Therefore, more studies are necessary about the combined use of monensin and virginiamycin. A statistical analysis (Tedeschi and Gorocica-Buenfil, 2018) shows that virginiamycin alone use is also effective in reducing liver abscesses incidence. Using another additive, zinc bacitracin, Dinusson et al. (1969) related no effect on feed intake or average daily gain of Hereford heifers, but zinc bacitracin reduced the incidence of liver abscesses. Some studies about bacitracin use reported in Page (2003) review show increase in average daily gain, improvement on feed efficiency and greater nitrogen retention in ruminants (Pivntak et al., 1981; Eranov et al., 1996; Jamroz et al., 1987ab; Lohnert et al., 1993; Lohnert and Ochrimenko, 1995; Männer et al., 1993 apud Page, 2003). Bacitracin shows effect on gram-positive bacteria (Russell and Strobel, 1988) but their use is not widespread yet.

Regardless of the steers performance in the feedlot, beef quality is another goal for the nutritionists. In this sense, high-energy diets can reduce ruminal pH, which changes microbiota and biohydrogenation pathways in the rumen, increasing the production of C18:2 *trans*10, *cis*12 (Ladeira et al., 2018). This CLA inhibits lipogenic transcription factors, like SREBP1c (encoded by *SREBF1* gene), reducing *de novo* synthesis (Obsen et al., 2012) and consequently marbling (Teixeira et al., 2017). Therefore, it is important to evaluate if the combined use of monensin and virginiamycin or zinc bacitracin, that has potential to change rumen microbiota and biohydrogenation, may affect the expression of lipogenic genes, and if there is any effect of these additives in the beginning or end of the feedlot.

We hypothesize that the combined use of monensin and zinc bacitracin, or monensin and virginiamycin in feedlot diets would be more efficient than monensin alone to improve animal performance during finishing phase. In addition, it is hypothesized that the combine used of additives would upregulate lipogenesis and increase intramuscular fat. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the combined use of monensin

and non-ionophores additives on performance, serum D-lactate, carcass traits, and expression of lipogenic genes, over time, during feedlot of Nellore × Angus young bulls.

4.4. Materials and methods

All experimental protocols and activities of this trial were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the *Universidade Federal de Lavras* under protocol number 045/18. The trial was carried out at Beef Cattle Facility of Animal Science Department of the *Universidade Federal de Lavras*.

4.4.1. Experimental design, animals, diet and feeding behavior

Seventy two Nellore × Angus young bulls, with initial body weight of 417.4 ± 41.0 kg, were allotted in 18 pens with 4 animals per pen in a completely randomized design with three treatments: monensin (MON), monensin + zinc bacitracin (MONZB) and monensin + virginiamycin (MONVM), resulting in 6 replicates per treatment, assuming pen as experimental unit. The doses of monensin, zinc bacitracin and virginiamycin were 25.0, 8.75 and 25.0 mg/kg of DM, respectively.

The diet was formulated according to NASEM 2016 (Table 1) for average daily gain of 1.5 kg/d and offered *ad libitum* twice a day (07:30 am and 04:00 pm). Every day before feeding the bunk score was evaluated to adjust the amount of feed of the day. Bunk score goal was score 0. In addition, the fecal score was analyzed over weeks during the experimental period in a gradual scale, considering score 0 as aqueous feces and 5 as consistent and dry feces.

Feed samples were analyzed according to the Association of the Official Analytical Chemists (AOAC, 1990) to describe the experimental diet composition (Moisture, 934.01; Crude Protein (CP), 984.13; Ether Extract (EE), 920.39; Ash, 942.05). Starch content was analyzed according to Hall (2008) and neutral detergent fiber was analyzed according to Van Soest et al. (1991) using amylase (ISO, 16472, 2006). Non-fiber carbohydrates were calculated according to Sniffen et al. (1992).

Before the start of the trial, the animals were treated against endo and ectoparasites (Dectomax[®], Zoetis, Brazil). The first 27 days were used for diet and facilities adaptation, and the experimental period lasted 82 days. The adaptation method used was the step-up, starting with the forage:concentrate ratio of 55:45. The forage:concentrate ratio of each step were 55:45 for 7 days, 45:55 for 7 days, 35:65 for 7 days and 25:75 for 6 days.

Feeding behavior was performed by visual observation during 48 uninterrupted hours among days 76 and 78 of the experimental period, recording at 5-minute intervals the activities: idleness, rumination, ingestion and others activities. The meal was defined when lasted at least 10 minutes of ingestion and the intermeal interval was considered by at least 5 minutes not ingesting (idleness or rumination). First meal duration was measured by the spend time of ingestion from the first offering feed of the day (07:30 h). On days 32, 35, 42, 46 and 49 of the experimental period feed sorting behavior was evaluated according to Leonardi and Armentano (2003). Time-period division within the same day was not considering on our trial. Data collected on those days mentioned above were summed and divided by 5 to obtain just one average data.

To calculate the average daily gain the animals were weighted in the beginning and in the end of the adaptation period and in the end of experimental period, after 16 fasting hours. Intermediate weighing was performed on d 31 and 51 of the experimental period but the animals were not fasted. To estimate the fasting body weight (FBW) it was used the equation $FBW = 0.9664 * (BW^{1.0017})$ (Gionbelli et al., 2016).

4.4.2. Serum D-lactate

On days 7 and 43 of the experimental period blood samples were taken from jugular vein of 2 animals per pen to measure serum D-lactate levels. In the first collection, animals were randomly chosen, but in the following collection, the samples were collected in the same animals of the first collection.

Blood samples were collected using commercial tubes (Vacutainer, 10 mL; Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA) without sodic heparin. After a period of 30-180 minutes for clot formation, samples were centrifuged ($2,500 \times g$ during 30 minutes at 4°C) and serum was transferred to Eppendorf microtubes and later stored at -80°C .

Serum D-lactate levels were measured by a commercial kit (MAK058 for D-Lactate Colorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) according to manufacture's recommendations and the results mensuration was performed on Multiskan GO[®] spectrophotometer reader (Thermo Scientific, Waltham, USA)

4.4.3. Muscle biopsy

On day 7, *longissimus thoracis* biopsies were performed at the 13th rib of the right side of 2 animals per pen (same animals of the blood samples). Biopsy local was cleaned

with skin disinfectant (Iodophor/Betadine). After cleaning and anesthetized (lidocaine), an incision of 1 cm was made using a scalpel and taken 1 g of muscle tissue using a sterile Bergstrom biopsy needle (Eskilds Tuna, Sweden). Muscle samples collected were placed in liquid nitrogen before storing at -80°C for later gene expression analysis. After the procedure, incision was washed with sterile saline and water and then closed using veterinary fabric glue and an antibiotic spray was applied in the incision area.

4.4.4. Slaughter and sampling

After 82 days of the experimental period, animals were slaughtered in a commercial abattoir using brain concussion technique and jugular vein section, later removal of leather and evisceration. Just after the slaughter, muscle samples were taken from the *longissimus thoracis* muscle of left half-carcass, of the same animals that were biopsied on day 7 of the feedlot period, and placed in liquid nitrogen to transport and then stored at -80°C, for gene expression analysis. Later, carcasses were divided into two half-parts and weighted to obtain the hot carcass weight (HCW). The backfat thickness was measured between 12th and 13th ribs from the left half-carcass using a digital pachymeter on $\frac{3}{4}$ of the lumbar eye length from the cranial portion. The ribeye area was drawn in transparency paper and later determined using the area meter LI-3100 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Carcass pH was measured after 24 hours of cooling at 2°C into the abattoir.

During slaughter, the livers were classified in relation to the liver abscesses incidence and attributed scores according to Amachawadi and Nagaraja (2016): Normal = liver free from abscesses; A- = liver with 1 to 2 small abscesses; A = liver with 2 to 4 large abscesses or multiple small abscesses; A+ = liver with multiple large abscesses, abscesses adhered to diaphragm, abdominal organs or both, or open or ruptured abscesses.

One steak (2.54 cm) were collected, at the 13th rib from the left half-carcass after 24 hours of cooling at 2°C, and processed to determine chemical composition. Chemical composition analysis was performed by near infra-red according to 2007-04 method of AOAC using FoodScanTM (FOSS, Hillerod, Denmark).

4.4.5. Gene expression

All primers used for the target genes are in Table 2. Reference genes used were *ACTB* and *CASC3* based on Coelho (2018) results that utilized Nellore x Angus animals and *longissimus thoracis* muscle.

The primers design was done by indexed and published sequences on Genbank public database, NCBI platform (National Center for Biotechnology Information). Final primer was done using Oligo Perfect Designer (Primer Quest Tool) software and analyzed on Oligo Analyzer 3.1 and Premier Biosoft. Then, primers were synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and determined their efficiencies and regression coefficient (R^2) using a diluted sample pool.

Total RNA was extracted using QIAzol reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA) according to manufacture's recommendations. After that, the samples were treated with DNase DNA free (Invitrogen, Vilnius, Lithuania) to eliminate contaminations.

Both extracted and treated RNA were submitted to electrophoresis in agarose gel 1.0% (m/v) and stained with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA) which was visualized in E-Gel® Imager Camera Hood (Life Technologies, Neve Yamin, Israel) to evaluate integrity and quality of the RNA. Samples were quantified at 260 nm in nanospectrophotometer (DeNovix DS-11, Wilmington, DE, USA) to determine the RNA quantity (ng/ μ L) and purity (260/280 e 260/230).

cDNA synthesis was realized with Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) according to manufacture's recommendations.

For RT-qPCR analyze was performed according to Oliveira et al. (2014). All the RT-qPCR assay for each gene was conducted in basis of cDNA obtained from 12 biologic replicates per treatment and with 2 technic replicates for each one. Relative expression levels were calculated according to Pfaffl (2001).

4.4.6. Statistical analyses

All data were analyzed for individual animal data (72 animals in total) with pen as experimental unit (6 pens per treatment). Also, for D-lactate and gene expression were used individual animal data with pen as the experimental unit according to St-Pierre (2007) but considering animals that were sampled (36 animals in total).

Performance, carcass traits, chemical composition, animal feed behavior and feed sorting behavior was analyzed with the PROC MIXED of SAS 9.4 statistical software (SAS Inst. Inc., Cary, NC) considering initial body weight as covariate adjustment and pen as experimental unit, using feed treatment as fixed effect and pen nested within treatment as random effect.

Serum D-lactate, fecal score and gene expression was analyzed with the PROC MIXED of SAS 9.4 statistical software (SAS Inst. Inc., Cary, NC), considering initial body weight as covariate adjustment, and pen as experimental unit, using feed treatment as fixed effect. Pen nested within treatment, time and interaction between feed treatment and time were considered as random effect. For gene expression data, Shapiro-Wilk test was performed to assess the data normality and when they didn't present normal distribution they were transformed using PROC RANK of SAS 9.4 statistical software (SAS Inst. Inc., Cary, NC). The best covariance structure was chosen by the Akaike's information criterion.

For most of variables, P values were considered significant when $P \leq 0.05$ and as trends when $0.05 < P \leq 0.10$. For gene expression data P values were considered significant when $P \leq 0.10$.

4.5. Results

There was no significant effect of additives and/or its combination on overall ADG (Table 3). In addition, additives did not affect ADG during adaptation period and on days 32 to 51. However, MONVM had lower ADG ($P = 0.02$) than MON and MONZB on days 0 to 31. On the other hand, on days 52 to 82, MONVM had a tendency of greater ADG ($P = 0.08$) than MON and MONZB. Dry matter intake (DMI) was not affected by additives in any of periods ($P > 0.11$) or overall feedlot ($P = 0.45$). Likewise, feed efficiency was not affect at all periods and in overall feedlot for all treatments ($P > 0.20$). In addition, at slaughter, the presence of liver abscesses was not found in the animals. Animals fed MONVM had greater final carcass pH ($P < 0.01$) compared to MON and MONZB. However, there was no effect of additives on the other carcass traits and meat chemical composition ($P > 0.16$).

Animal feeding behavior (Table 4) was affected only on meals/day, where animals receiving MONVM had greater number of meals/day than MON. Other feeding behavior

analyzed variables were not affected by the additives ($P > 0.11$). In addition, in feed sorting behavior, there was a trend ($P = 0.09$) of MON had higher preferential intake of long feed particle size (> 19 mm, Table 5). Moreover, all treatment presented preferential intake (observed/predicted $> 100\%$) of middle feed particle size (8 to 19 mm) while the small feed particle size (< 8 mm) were rejected by all treatments (observed/predicted $< 100\%$). Animals fed MON had higher preferential intake than MONVM ($P = 0.05$) of middle feed particle size. On the other hand, MON refused more small particle size than MONZB and MONVM ($P < 0.01$). Fecal score throughout days on feed (Figure 1) was not influenced by additives ($P = 0.97$) but showed a time effect ($P < 0.01$). Also, serum D-lactate concentrations (Figure 2) was not influenced by additives ($P = 0.50$) or days on feed ($P = 0.40$).

None of the evaluated genes was affected by the additives. However, there was an additive and time interaction on *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (*PPARA*) (Figure 3) and *carnitine palmitoyltransferase 2* (*CPT2*) (Figure 6) expression. In this case, the use of MONZB increased *PPARA* expression on d 7 and decreased at the slaughter, comparing to the other treatments. For *CPT2*, MONZB decreased its expression on day 7 and MONVM increased at the slaughter.

The expression of the other lipogenic transcription factors, *sterol regulatory element-binding transcription factor 1* (*SREBF1*) and *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (*PPARG*), were not affected by additives, time and their interaction (Figure 3). On the other hand, expression of *lipoprotein lipase* (*LPL*) and *cluster of differentiation 36* (*CD36*) increased with time (Figure 4), while *fatty acid synthase* (*FASN*) decreased over time (Figure 5). No significance effect of additives, time or their interaction ($P > 0.19$) was found in *acetyl CoA carboxylase α* (*ACACA*) and *stearoyl-CoA desaturase* (*SCD1*).

4.6. Discussion

Our results suggest that combined use of monensin and virginiamycin or monensin and zinc bacitracin have similar effect on performance and carcass traits, when high concentrate diets are used, compared to the use alone of monensin. Similar results of additives combined use was found by Lemos et al. (2016) and Silva et al. (2019). The lack of difference on performance may have been due to the dry matter intake (DMI)

being similar for all treatments. There are reports that the use of monensin reduces DMI (Goodrich et al., 1984; Duffield et al., 2012), however in the currently study all three treatments had monensin inclusion. Possibly this can explain the fact that MONVM had good results, once that the ADG of animals fed MONVM was lower in the beginning of the experiment but had the advantage of maintained during experimental period and being higher at the end of feedlot. Besides that, Rigueiro et al. (2016) recommend just during adaptation period the combined use of additive (monensin + virginiamycin) and during finishing phase they have recommended only virginiamycin use. The scope of monensin treatment effect is influenced by dietary factors, dose and experimental design (Duffield et al., 2012). In addition, Chaves et al. (2018) reported that the use of different additives alone on high-grain diets did not affect steers ADG compared to control diet (without additive). Similar results was found by Benatti et al. (2017) using virginiamycin + monensin combination in high energy diet. There is a possibility that in high concentrate diets, propionate production is already high and the additives combined use would not be able to change ruminal pH, acetate:propionate ratio and other ruminal parameters, compared to the use of just monensin. Likewise, Lemos et al. (2016), using different additives and their combinations states that lack on performance and carcass traits is due to similarity on volatile fatty acids profile, and the absence of difference on rumen ammonia nitrogen concentration, suggesting similar efficiency of additives in ruminal deamination. The same authors reported similar results on ruminal pH and acetate:propionate ratio. The additives combined use seems to be more effective in diets with lower concentrate inclusion. Heker Junior et al. (2018), using ½ Angus steers during feedlot had positive results with the additive combination in diets with forage:concentrate ratio of 50:50, where the combined use increased ADG and backfat thickness compared to the monensin alone. The lack of difference on performance in our study also can be explained by the great adaptation and offered management performed during the trial, since both factors are important to animal production and animal performance.

The persistent low ruminal pH caused by high-grain diets for long periods influence feed sorting behavior, according to DeVries et al. (2014a). In the currently study, the higher number of meals/d in MONVM than MON may be to the higher sorting of large and middle particles (> 8 mm) and greater refusal of small particles (< 8 mm) in MON than MONVM, which was probably the alternative that animals of each treatment used. The animals fed MON preferred long and middle particles while animals fed

MONVM increased the number of meals/d, both changes in feed sorting and feeding behavior in both treatments may be used as alternatives to control ruminal pH. However, D-lactate results did not suggest difference in the rumen pH. According to DeVries et al. (2014b), in high-grain diets, the severity of acidosis, which is correlated with ruminal pH, will affect the degree by each animal will change your sorting if diet contain long forage particles.

According to Smith et al. (2009), the major factors that influence fat deposition are the age of animal and time on a high-grain diet. The absence of difference in the results of gene expression over time in sterol regulatory element-binding protein-1c (*SREBF1*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*), acetyl CoA carboxylase α (*ACACA*) and stearoyl-CoA desaturase (*SCDI*) was due to animals were slaughtered with only 82 days of feedlot and once that were non-castrated animals they still presented very high ADG which means that they were not depositing fat in an accelerated way.

The decrease in *FASN* and the increase in *LPL* and *CD36* expression over time showed a higher uptake of fatty acids later on, compared to a *de novo* fatty acid synthesis. Similar results were reported by Li et al. (2018) for *FASN*, *LPL* and *FABP4* which there was an increase in fatty acid uptake later on. Probably, this result occurred due to the increase in amount of fatty acids intake during the feedlot. In the beginning, animals were ingesting 389 g of ether extract, in the middle 414 g and at the end 389 g. Smith et al. (2009) reported that marbling amount increase with time on feed in grain-based diet. Therefore, we expected the increase in expression over time of the genes involved in the fatty acid uptake, as the genes responsible to encode enzymes involved in the lipogenesis process. An higher expression of *SREBF1* indicates an high capacity for *de novo* synthesis according to Li et al. (2018). However, this effect was not verified over time, and it can explain the lack of time effect on *ACACA* and *SCDI* genes. This transcription factor (*SREBF1*) is important in lipogenesis process and presents positive correlation with *ACACA* (Oliveira et al., 2014) and also to *SCDI* expression (Waters et al., 2009; Teixeira et al., 2017). According to Ladeira et al. (2018) the final balance between fatty acids uptake, synthesis and degradation can increase or decrease intramuscular fat, which is defined as lipid turnover. The fact that even the expression of the genes related to fatty acid uptake (*LPL* and *CD36*) has been higher over time was not enough to increase

marbling nor to change the chemical composition (Table 6). In addition, *FASN* decreased over time, representing lower *de novo* synthesis.

PPARs isotypes are activated by long-chain fatty acids (LCFA) and among the 3 subtypes (PPAR α , PPAR γ , PPAR δ/β) in muscle, *PPARA* is the most expressed and its expression is more abundant in tissues that have high LCFA oxidation (Bionaz et al., 2013). During ruminal biohydrogenation process, the linoleic acid (C18:2), is metabolized into stearic acid (C18:0) in normal conditions of the rumen. Changes in microbiota and consequently on biohydrogenation pathways can affected the fatty acids that scape from the rumen and then *PPARA* expression. Bionaz et al. (2012) reported that C18:0 and C16:0 are *PPARA* strong agonists while C18:1 *cis*9, C20:0, C20:4 n-6 and C20:5 n-3 are *PPARA* agonists in ruminant tissues.

4.7. Conclusion

In conclusion, no improve result to Nellore x Angus young bulls was found in our study to recommend the associative use ionophores and non-ionophores additives, so the monensin can be used alone or combined with zinc bacitracin or virginiamycin in high-energy diets, and this decision will depend of the additive economic viability. In addition, additives use did not affected most of gene expression in the currently study, only *PPARA* and *CPT2* expression were affected, but the magnitude was minor and was not enough to change the chemical composition of the meat. Changes in gene expression may occur over time in the feedlot, where there is an increase in the expression of genes related to the fatty acid uptake and a decrease in the expression of *FASN*.

4.8. Funding

This work was supported by the CAPES, Agroceres Multimix Nutrição Animal, Brazil and CNPq.

4.9. References

- Amachawadi, R., Nagaraja, T.G., 2016. Liver abscesses in cattle: A review of incidence in Holsteins and of bacteriology and vaccine approaches to control in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 94, 1620-1632.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis. Association of Official Analysis Chemists, Arlington, VA.
- Benatti, J.M.B., Alves Neto, J.A., de Oliveira, I.M., de Resende, F.D., Siqueira, G.R., 2017. Effect of increasing monensin sodium levels in diets with virginiamycin on the finishing of Nelore cattle. *Animal Science Journal* 88, 1709-1714.
- Bionaz, M., Chen, S., Khan, M.J., Loor, J.J., 2013. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Research*, 28 p.
- Bionaz, M., Thering, B.J., Loor, J.J., 2012. 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* 107, 179-191.
- Chaves, F.B.A., Sousa, V.A., Alencar, W.M., Dias, D.M., Araujo, V.L., Silva, R.d.O., Miotto, F.R.C., Castro, F.G.F., 2018. Desempenho produtivo novilhos Nelore terminados em confinamento e alimentados com dietas de alto grão contendo diferentes aditivos. In:.... Proceedings, Zootecnia Brasil, Goiânia GO.
- Coelho, T.C., 2018. Avaliação de genes de referência em diferentes tecidos de bovinos de corte. Master's thesis, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.
- DeVries, T., Schwaiger, T., Beauchemin, K., Penner, G., 2014a. The duration of time that beef cattle are fed a high-grain diet affects feed sorting behavior both before and after acute ruminal acidosis. *Journal of Animal Science* 92, 1728-1737.
- DeVries, T., Schwaiger, T., Beauchemin, K., Penner, G., 2014b. Impact of severity of ruminal acidosis on feed-sorting behaviour of beef cattle. *Animal Production Science*. 54, 1238-1242.
- Dinusson, W., Erickson, D., Haugse, C., Buchanan, M., 1969. High moisture oats in rations for beef cattle.
- Dow, D.L., Wiegand, B.R., Ellersieck, M.R., Lorenzen, C.L., 2011. Prediction of fat percentage within marbling score on beef longissimus muscle using 3 different fat determination methods¹. *Journal of Animal Science* 89, 1173-1179.

- Duffield, T., Merrill, J., Bagg, R., 2012. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *Journal of Animal Science* 90, 4583-4592.
- Gionbelli, M.P., Valadares Filho, S.C., Detmann, E., 2016. Adjustment of cattle body weight for physiological and feeding conditions, In: Valadares Filho, S.C., Costa e Silva, L.F., Gionbelli, M.P., Rotta, P.P., Marcondes, M.I., Chizzotti, M.L., Prados, L.F. (Eds.), *Nutrient Requirements of Zebu and Crossbred Cattle*, Suprema, Viçosa, pp. 1 - 14.
- Goodrich, R.D., Garrett, J.E., Gast, D.R., Kirick, M.A., Larson, D.A., Meiske, J.C., 1984. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science* 58, 1484-1498.
- Gorocica, M., Tedeschi, L., 2017. Virginiamycin increases performance and carcass weight of feedlot cattle under Mexican conditions. *Journal of Animal Science* 95, 243.
- Hall, M.B., 2008. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: Comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *Journal of AOAC International* 92, 42-49.
- Heker Junior, J.C., Neumann, M., Ueno, R.K., Falbo, M.K., Galbeiro, S.G., Souza, A.M., Venancio, B.J., Santos, L.C.S., Askel, E.J., 2018. Effect of monensin sodium associative to virginiamycin and/or essential oils on the performance of feedlot finished steers. *Semina: Ciências Agrárias* 39, 261-274.
- Ladeira, M.M., Schoonmaker, J.P., Swanson, K.C., Duckett, S.K., Gionbelli, M.P., Rodrigues, L.M., Teixeira, P.D., 2018. Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. *Animal*, 1-13.
- Lemos, B.J.M., Fernandes, J.J.R., Santos, L.S., Couto, V.R.M., Mendonça, B.P.C., Castro, F.G.F., 2016. Monensin, virginiamycin, and flavomycin in a no-roughage finishing diet fed to zebu cattle¹. *Journal of Animal Science* 94, 4307-4314.
- Leonardi, C., Armentano, L., 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 557-564.
- Li, X.Z., Yan, C., Gao, Q.S., Yan, Y., Choi, S.H., Smith, S.B., 2018. Adipogenic/lipogenic gene expression and fatty acid composition in chuck, loin, and round muscles in response to grain feeding of Yanbian Yellow cattle. *Journal of Animal Science* 96, 2698-2709.
- Obsen, T., Faergeman, N.J., Chung, S., Martinez, K., Gobern, S., Loreau, O., Wabitsch, M., Mandrup, S., McIntosh, M., 2012. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases

de novo lipid synthesis in human adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 580-590.

Oliveira, D.M., Chalfun-Junior, A., Chizzotti, M.L., Barreto, H.G., Coelho, T.C., Paiva, L.V., Coelho, C.P., Teixeira, P.D., Schoonmaker, J.P., Ladeira, M.M., 2014. Expression of genes involved in lipid metabolism in the muscle of beef cattle fed soybean or rumen-protected fat, with or without monensin supplementation. *Journal of Animal Science*

Page, S., 2003. The role of enteric antibiotics in livestock production. A review of published literature.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29.

Pinto, A.C.J., Millen, D.D., 2018. Nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists: the 2016 Brazilian survey. *Canadian Journal of Animal Science*.

Rigueiro, A., Luiz, F., Squizatti, M., Assumpção, A., Ferreira, M., Garcia, C., Muller, L., Bueno, A., Martins, C., Arrigoni, M., 2016. 1400 Feedlot performance and carcass traits of Nellore cattle fed different combinations of sodium monensin and virginiamycin. *Journal of Animal Science* 94, 678-678.

Russell, J., Strobel, H., 1988. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. *Journal of Animal Science* 66, 552-558.

Silva, A.P.S., Zotti, C.A., Carvalho, R.F., Corte, R.R., Cônsolo, N.R.B., Silva, S.L., Leme, P.R., 2019. Effect of replacing antibiotics with functional oils following an abrupt transition to high-concentrate diets on performance and carcass traits of Nellore cattle. *Animal Feed Science and Technology* 247, 53-62.

Smith, S.B., Blackmon, T.L., Sawyer, J.E., Miller, R.K., Baber, J.R., Morrill, J.C., Cabral, A.R., Wickersham, T.A., 2018. Glucose and acetate metabolism in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues from steers infused with glucose, propionate, or acetate. *Journal of Animal Science* 96, 921-929.

Smith, S.B., Gill, C.A., Lunt, D.K., Brooks, M.A., 2009. Regulation of fat and fatty acid composition in beef cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 22, 1225-1233.

Sniffen, C.J., O'Connor, J., Van Soest, P., Fox, D., Russell, J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science* 70, 3562-3577.

- St-Pierre, N.R., 2007. Design and analysis of pen studies in the animal sciences. *Journal of Dairy Science*. 90, E87-E99.
- Tedeschi, L.O., Gorocica-Buenfil, M.A., 2018. An assessment of the effectiveness of virginiamycin on liver abscess incidence and growth performance in feedlot cattle: a comprehensive statistical analysis. *Journal of Animal Science* 96, 2474-2489.
- Teixeira, P.D., Oliveira, D.M., Chizzotti, M.L., Chalfun-Junior, A., Coelho, T.C., Gionbelli, M.P., Paiva, L.V., Carvalho, J.R.R., Ladeira, M.M., 2017b. Subspecies and diet affect the expression of genes involved in lipid metabolism and chemical composition of muscle in beef cattle. *Meat Science* 133, 110-118.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
- Waters, S.M., Kelly, J.P., O'Boyle, P., Moloney, A.P., Kenny, D.A., 2009. Effect of level and duration of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of $\Delta 9$ -desaturase in muscle of beef cattle. *Journal of Animal Science* 87, 244-252.

4.10. Tables and Figures

Table 1. Ingredients percentage and chemical composition of the experimental diets.

Composition	
Diet, g/kg DM	
Corn silage	150
Ground corn	759.2
Soybean meal	59.5
Urea	10.0
Mineral and vitamin ^a	21.3
Additive ^b	
Chemical composition, g/kg DM	
Dry matter, g/kg NM	804.2
Crude protein	143.2
Neutral detergent fiber	175.8
Ether extract	31.10
Non fiber carbohydrates ^c	611.0
Starch	579.8
Ash	54.90

^a Limestone, mineral oil, dicalcium phosphate, sodium chloride, kaolin, magnesium oxide, sulfur filtrate, cobalt sulfate, calcium iodate, sodium selenite, manganese monoxide, zinc oxide, vitamin A, silicone dioxide, citric acid, butyl hydroxyanisole, butylated toluene hydroxide, etoquin, probiotic additive, antibiotic additive^b.

^b MON = 25 mg of monensin / kg DM; MONZB = 25 mg of monensin + 8.75 mg of zinc bacitracin / kg of DM; MONVM = 25 mg of monensin + 25 mg of virginiamycin / kg of DM.

^c Non-fiber carbohydrates calculated according to Sniffen et al. (1992).

Table 2. Sequences and primers efficiencies used in RT-qPCR analyze.

Symbol	Name	Foward (F) and Reverse (R)	Access number	Amplicon (pb)	R ²	Efficiency
<i>SREBF1</i>	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1	F: GACTACATCCGCTTCCTTCAG R: CCAGGTCCTTCAGCGATTT	XM_024980343.1	100	0.998	98
<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	F: CAATGGAGATGGTGGACACA R: TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	NM_001034036.1	95	0.992	99.2
<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	F: GCAATCAAAGTGGAGCCTGT R: CCATGAGGGAGTTGGAAGG	NM_181024.2	94	0.973	100
<i>LPL</i>	Lipoprotein lipase	F: CTCAGGACTCCCGAAGACAC R: GTTTTGCTGCTGTGGTTGAA	NM_001075120.1	98	0.99	96.7
<i>CD36</i>	Cluster of differentiation 36	F: GTGATGAGAAGGCGGAAATG R: ACCACACCAACACTGAGCAA	NM_001278621.1	94	0.996	94.5
<i>ACACA</i>	Acetyl-CoA carboxylase alpha	F: TGAAGAAGCAATGGATGAACC R: TTCAGACACGGAGCCAATAA	NM_174224.2	88	0.994	96.6

<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	F: ATCAACTCTGAGGGGCTGAA R: CAACAAAACCTGGTGCTCACG	U34794.1	83	0.974	99.5
<i>SCD1</i>	Stearoyl-CoA desaturase	F: ACCATCACAGCACCTCCTTC R: ATTCAGGGCGGATGTCCTTC	NM_173959.4	95	0.991	98
<i>CPT2</i>	Carnitine palmitoyltransferase 2	F: CTATTCCCAAACCTTGAAGAC R: TTTTCCTGAACTGGCTGTCA	NM_001045889.2	81	0.952	98
<i>ACTB</i>	Actin beta	F: GTCCACCTTCCAGCAGATGT R: CAGTCCGCCTAGAAGCATTT	NM_173979.3	90	0.996	105
<i>CASC3</i>	Cancer susceptibility candidate 3	F: GGACCTCCACCTCAGTTCAA R: GTCTTTGCCGTTGTGATGAA	NM_001098069.1	85	0.976	98

Table 3. Performance of Nellore × Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives.

Item	Treatments ^a			SEM ^b	P value
	MON	MONZB	MONVM		
Body weight, kg					
Background	368	369	366	15.5	0.99
Adaptation period	418	417	422	3.05	0.46
Days 31	502	503	496	4.71	0.55
Days 51	541	547	538	5.94	0.53
Final body weight	592	598	596	6.30	0.75
Average daily gain, kg/d					
Adaptation period	1.88	2.13	2.19	0.105	0.15
Days 0 to 31	2.84 ^a	2.93 ^a	2.49 ^b	0.105	0.02
Days 32 to 51	2.03	2.21	1.97	0.084	0.12
Days 52 to 82	1.71 ^b	1.68 ^b	1.95 ^a	0.085	0.08
Days 0 to 82	2.22	2.26	2.15	0.065	0.45
Dry matter intake, kg/d					
Adaptation period	11.2	11.2	10.9	0.129	0.26
Days 0 to 31	12.6	12.9	12.0	0.290	0.11
Days 32 to 51	13.2	13.7	13.1	0.267	0.29
Days 52 to 82	12.4	12.4	12.6	0.248	0.90
Days 0 to 82	12.7	12.9	12.5	0.231	0.42
Feed efficiency, G:F					
Adaptation period	0.176	0.189	0.203	0.011	0.25

Days 0 to 31	0.224	0.226	0.204	0.010	0.26
Days 32 to 51	0.150	0.161	0.152	0.007	0.49
Days 52 to 82	0.141	0.138	0.152	0.006	0.20
Days 0 to 82	0.174	0.177	0.171	0.005	0.71

Means followed by the same lowercase letters on each line do not differ from each other.

^a MON = Monensin; MONZB = Monensin + Zinc Bacitracin; MONVM = Monensin + Virginiamycin.

^b Standard error of means.

Table 4. Feeding behavior on d 76 to 78 of Nellore × Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives.

Item	Treatments ^a			SEM ^b	P value
	MON	MONZB	MONVM		
Ingestion, min/d	110	109	122	6.28	0.28
Idleness, min/d	1037	1035	1003	14.4	0.21
Rumination, min/d	191	197	219	11.5	0.22
Others activities, min/d	102	105	96	9.23	0.81
Meals/day	5.24 ^b	5.68 ^{ab}	6.40 ^a	0.27	0.03
First meal duration, min	21.2	20.5	18.9	2.49	0.80
Average meal time ^c , min	15.6	15.3	15.9	0.54	0.73
Maximum meal time ^c , min	30.0	26.9	29.5	1.54	0.30
Average intermeal interval, min	240	241	216	14.1	0.38
Minimum intermeal interval, min	17.6	16.7	12.8	5.20	0.77
Maximum intermeal interval, min	691	767	631	43.3	0.11

Means followed by the same lowercase letters on each line do not differ from each other.

^a MON = Monensin; MONZB = Monensin + Zinc Bacitracin; MONVM = Monensin + Virginiamycin.

^b Standard error of means.

^c Minimum meal time was set as 10 min.

Table 5. Feed sorting behavior of Nellore × Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives.

Item	Treatments ^a			SEM ^b	P value
	MON	MONZB	MONVM		
Offered in the pen, kg	57.5	60.1	56.6	2.04	0.47
Refuses in the pen, kg	4.51	5.49	4.33	0.402	0.12
Dry matter intake of the pen, kg	53.0	54.6	52.3	1.83	0.66
Selection index, % ^c					
> 19 mm	106.59	105.07	104.21	0.714	0.09
8 to 19 mm	103.86 ^a	102.16 ^{ab}	101.70 ^b	0.603	0.05
< 8 mm	97.64 ^a	99.14 ^b	99.51 ^b	0.242	< 0.01

Means followed by the same lowercase letters on each line do not differ from each other.

^aMON = Monensin; MONZB = Monensin + Zinc Bacitracin; MONVM = Monensin + Virginiamycin.

^b Standard error of means.

^c Observed / Predicted, %; Sorting values equal to 100% indicate no particle selection, <100% particle rejection and >100% particle preference.

Table 6. Carcass traits and meat chemical composition of Nellore × Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives.

Item	Treatments ^a			SEM ^b	P value
	MON	MONZB	MONVM		
Hot carcass weight, kg	338	334	330	5.790	0.64
Dressing percentage, %	56.9	55.5	56.6	0.750	0.42
Back fat, cm	3.06	3.55	3.37	0.291	0.49
Ribeye area, cm ²	93.4	90.5	94.8	2.390	0.45
Final carcass pH	5.55 ^b	5.50 ^c	5.65 ^a	0.018	< 0.01
Marbling score ^c	391	370	374	18.76	0.63
Chemical composition					
Protein, %	23.6	23.3	23.4	0.154	0.33
Fat, %	3.57	3.20	3.28	0.319	0.63
Moisture, %	70.6	70.9	70.8	0.316	0.67
Collagen, %	2.02	1.86	2.01	0.070	0.16
Ash, %	2.43	2.54	2.47	0.207	0.78

Means followed by the same lowercase letters on each line do not differ from each other.

^aMON = Monensin; MONZB = Monensin + Zinc Bacitracin; MONVM = Monensin + Virginiamycin.

^b Standard error of means.

^c Calculated according to (Dow et al. (2011))

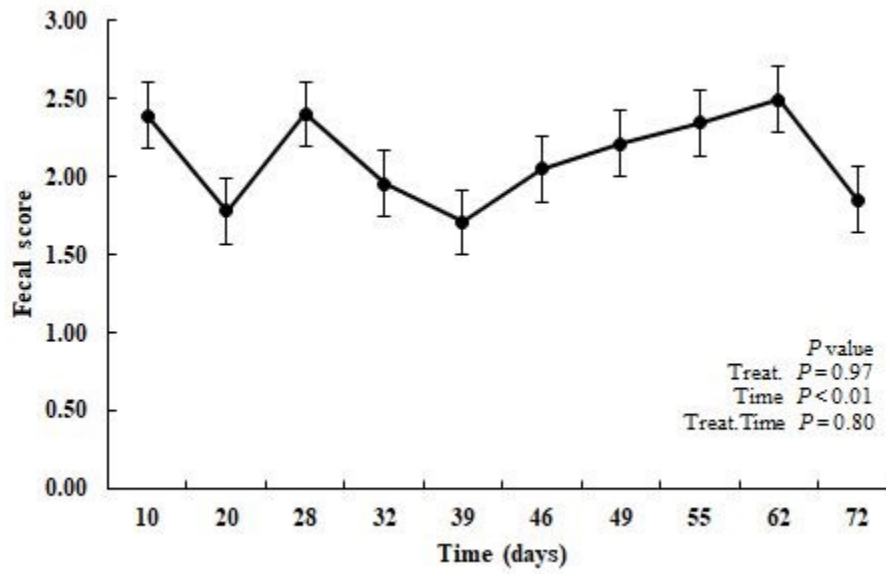


Figure 1. Fecal score on days 10, 20, 28, 32, 39, 46, 49, 55, 62 and 71 of Nellore \times Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives. Standard error of means (SEM) = 0.282.

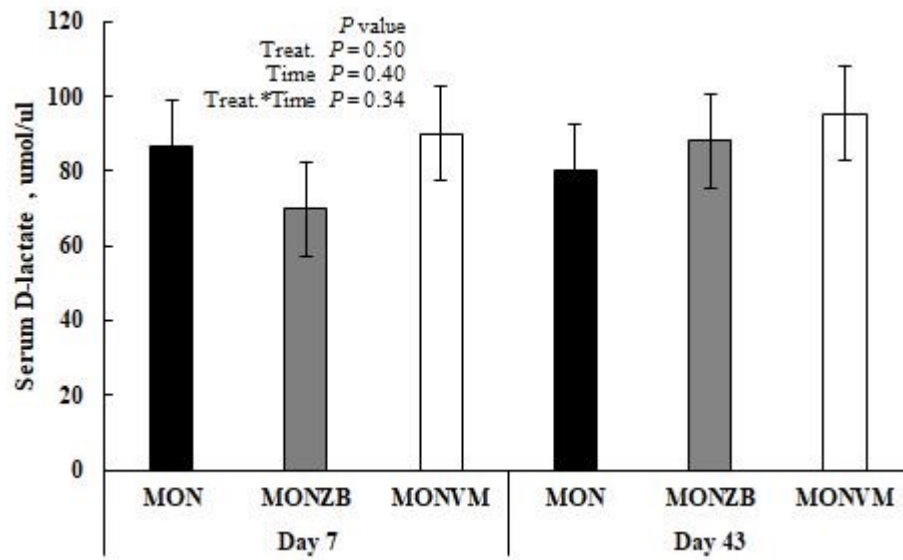


Figure 2. Serum D-lactate concentrations on d 7 and 43 of Nellore × Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives. Standard error of means (SEM) = 12.616.

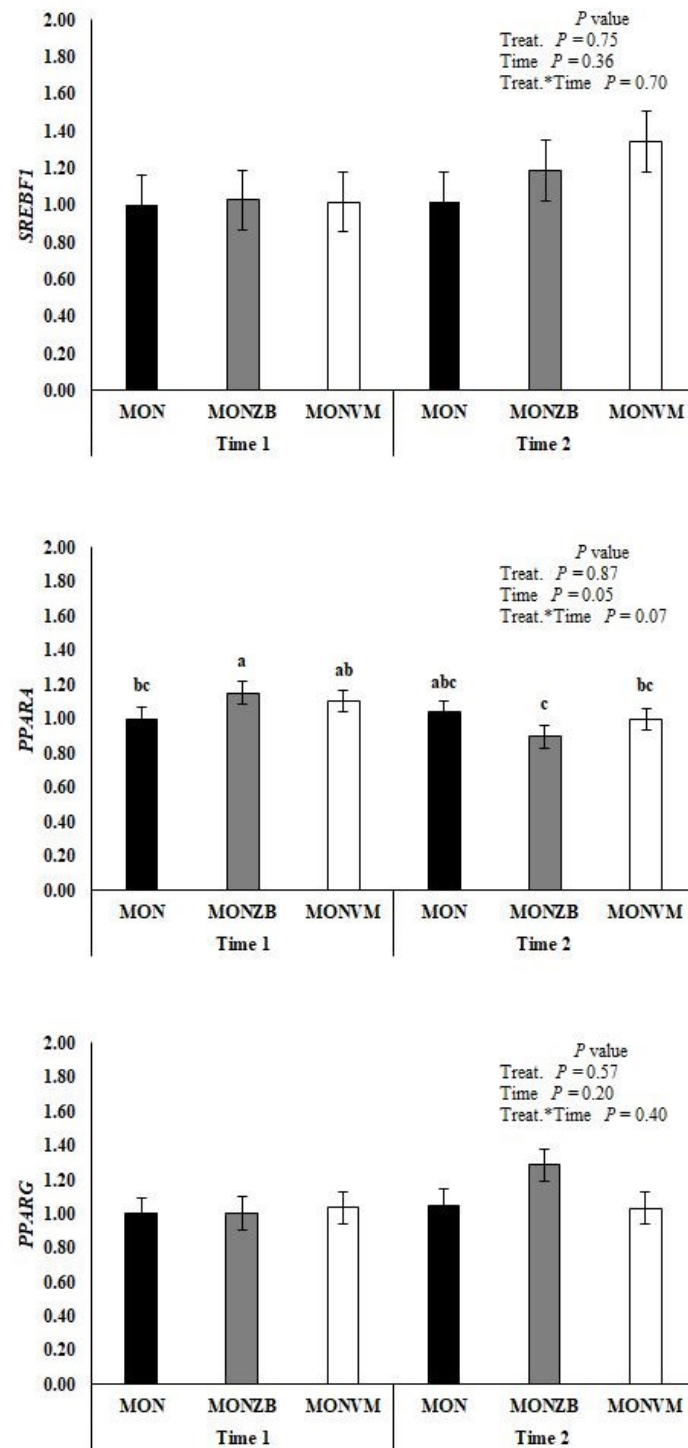


Figure 3. Relative expression of the *SREBF1*, *PPARA* and *PPARG* genes in the *longissimus thoracis* muscle of Nellore \times Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives. Standard error of means (SEM) = 0.163 (*SREBF1*), 0.065 (*PPARA*) and 0.096 (*PPARG*). Time 1: day 7 and Time 2: slaughter.

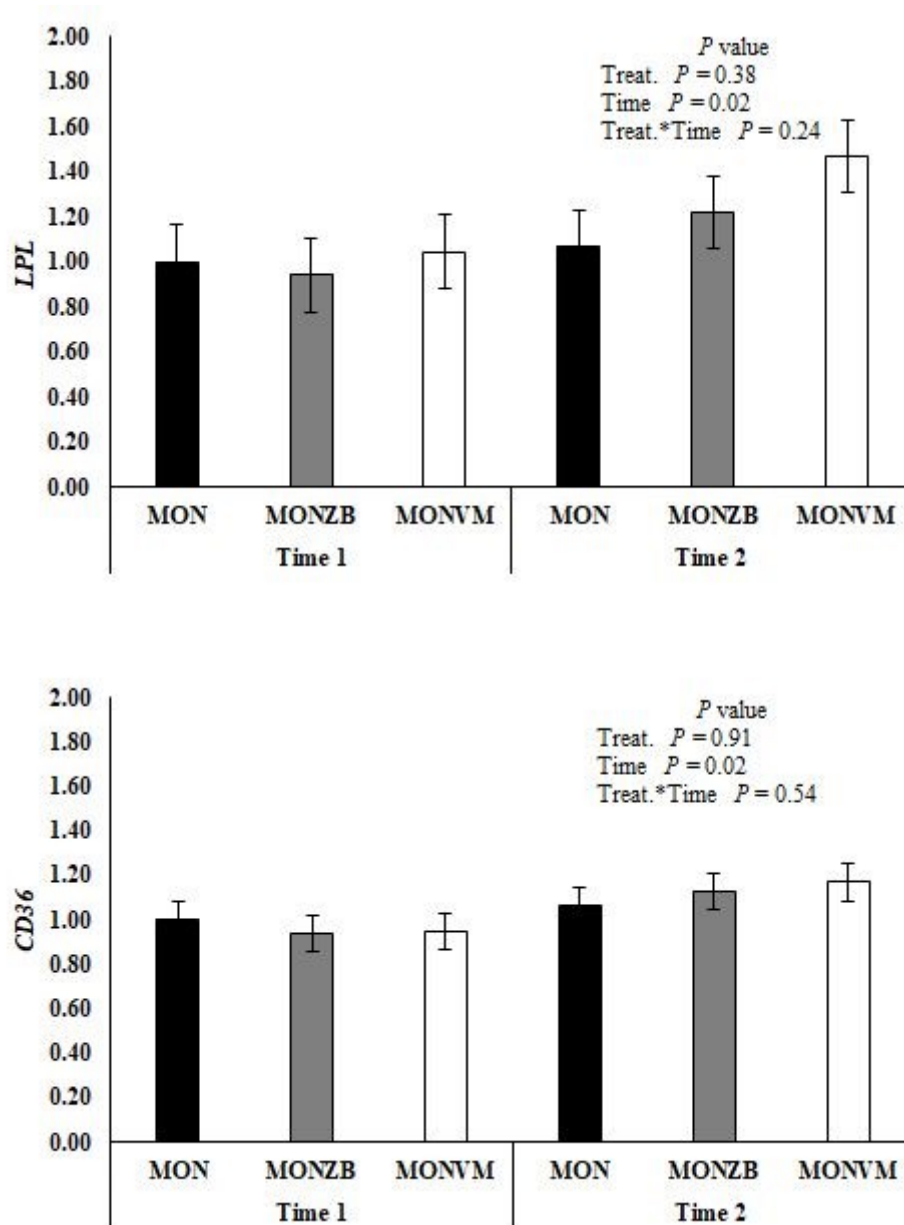


Figure 4. Relative expression of the *LPL* and *CD36* genes in the *longissimus thoracis* muscle of Nellore × Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives. Standard error of means (SEM) = 0.164 (*LPL*) and 0.083 (*CD36*). Time 1: day 7 and Time 2: slaughter.

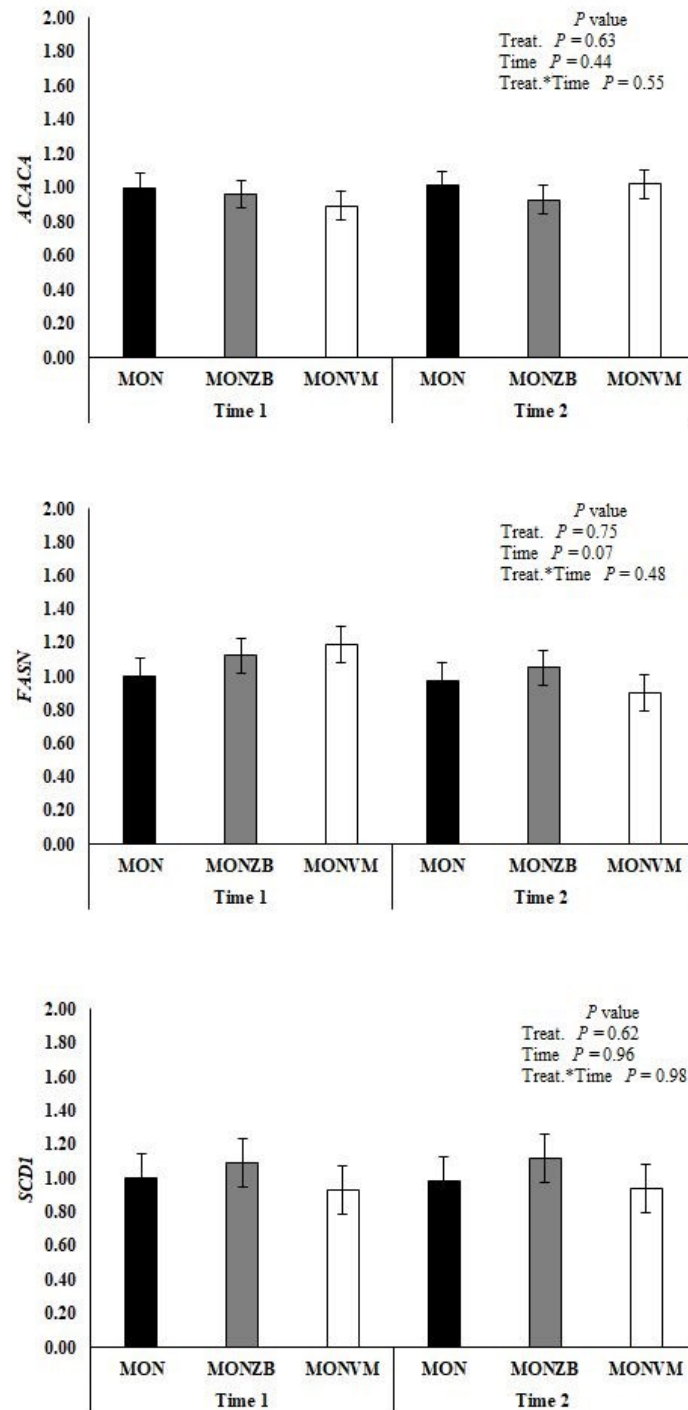


Figure 5. Relative expression of the *ACACA*, *FASN* and *SCDI* genes in the *longissimus thoracis* muscle of Nellore \times Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives. Standard error of means (SEM) = 0.081 (*ACACA*), 0.106 (*FASN*) and 0.140 (*SCDI*). Time 1: day 7 and Time 2: slaughter.

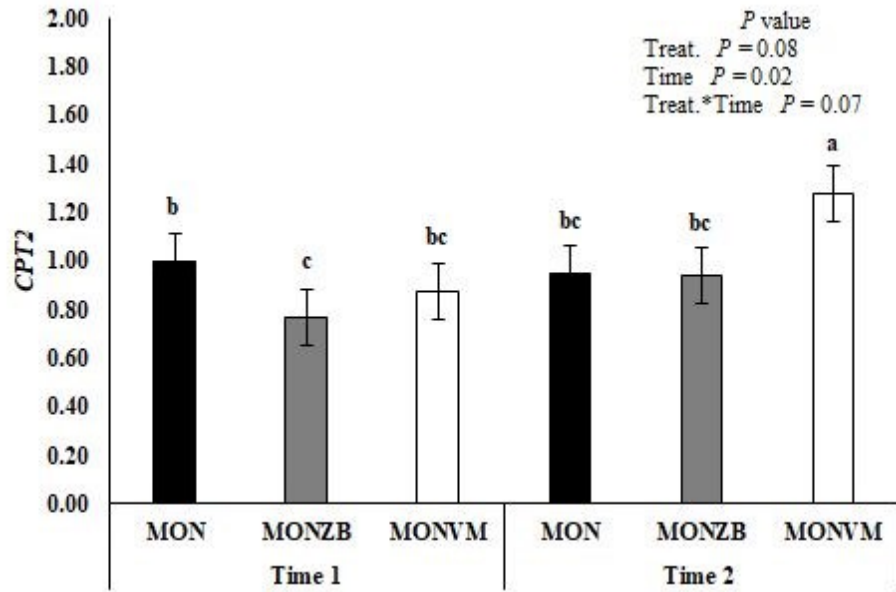


Figura 6. Relative expression of the *CPT2* gene in the *longissimus thoracis* muscle of Nellore × Angus young bulls receiving ionophores and non-ionophores additives. Standard error of means (SEM) = 0.1154. Time 1: day 7 and Time 2: slaughter.