



FELIPE DA COSTA MACIEL

**EFEITO DA INJEÇÃO DE VITAMINA A AO NASCIMENTO
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE GORDURA
INTRAMUSCULAR E QUALIDADE DA CARNE EM
BOVINOS DE CORTE**

**LAVRAS – MG
2020**

FELIPE DA COSTA MACIEL

**EFEITO DA INJEÇÃO DE VITAMINA A AO NASCIMENTO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE GORDURA INTRAMUSCULAR E QUALIDADE DA
CARNE EM BOVINOS DE CORTE**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como parte
dos requisitos do Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, área de concentração em
Produção e Nutrição de Ruminantes, para a
obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Marcio Machado Ladeira
Orientador

Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto
Co-Orientador

**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).**

Maciel, Felipe da Costa.

Efeito da injeção de vitamina A ao nascimento sobre o desenvolvimento de gordura intramuscular e qualidade da carne em bovinos de corte / Felipe da Costa Maciel. - 2020.

40 p.

Orientador(a): Marcio Machado Ladeira.

Coorientador(a): Otávio Rodrigues Machado Neto.

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

Bibliografia.

1. Marmoreio. 2. Vitamina A. 3. Programação neonatal. I. Ladeira, Marcio Machado. II. Machado Neto, Otávio Rodrigues. III. Título.

FELIPE DA COSTA MACIEL

**EFEITO DA INJEÇÃO DE VITAMINA A AO NASCIMENTO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE GORDURA INTRAMUSCULAR E QUALIDADE DA
CARNE EM BOVINOS DE CORTE**

**EFFECTS OF VITAMIN A ADMINISTRATION AT BIRTH ON INTRAMUSCULAR
FAT DEVELOPMENT AND MEAT QUALITY IN BEEF CATTLE**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como parte
dos requisitos do Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, área de concentração em
Produção e Nutrição de Ruminantes, para a
obtenção do título de Mestre

APROVADA em 09 de outubro de 2020.

Dr. Marcio de Souza Duarte

UFV

Dr. Mateus Pies Gionbelli

UFLA/DZO

Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto

UNESP

Dr. Marcio Machado Ladeira

ORIENTADOR

**LAVRAS-MG
2020**

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da administração de uma dose de vitamina A (300.000 UI) ao nascimento sobre o desempenho, características de carcaça, qualidade da carne e expressão gênica de bovinos de corte. Para isso, foram utilizados 34 bezerros (14 fêmeas e 20 machos) Montana × Nelore, em um delineamento inteiramente casualizado, desde o nascimento até a terminação. Foram realizadas biópsias do *longissimus thoracis* (LT) aos 40 dias de vida e no desmame, além de outra coleta ao abate. Os animais foram desmamados aos 270 dias e confinados por 180 dias. Os dados de desempenho não foram afetados pela vitamina A. Os machos apresentaram maiores ganho médio diário, peso final e peso de carcaça quente. A vitamina A aumentou os teores de gordura do LT. A administração de vitamina A aumentou a expressão dos genes angiogênicos, *PDFGRA* e *VEGF4*, nos 40 dias pós-nascimento e ao desmame. Já para os genes adipogênicos, a vitamina A aumentou a expressão do *ZNF423* no desmame e ao abate em todos os animais, e apenas nas fêmeas aos 40 dias pós-nascimento. Além disso, as fêmeas apresentaram maior expressão do *PPARG* nos 40 dias pós-nascimento e no desmame. A expressão do gene miogênico *WNT* foi maior nos 40 dias pós-nascimento e ao desmame nos animais que receberam vitamina A. No abate, a expressão do *WNT* foi maior nos machos do que nas fêmeas, ambos do tratamento controle. A vitamina A também aumentou a expressão dos genes lipogênicos: *FABP4* nos 40 dias pós-nascimento, *SREBF1* nos 40 dias pós-nascimento e ao desmame, mas por outro lado, reduziu a expressão do *FABP4* no desmame. Na desmama os machos que receberam vitamina A tiveram maior expressão do *FABP4* do que as fêmeas doo tratamento controle. Aos 40 dias pós-nascimento, as fêmeas apresentaram maior expressão do *PPARA* do que os machos. A expressão do *SCD1* foi maior aos 40 dias pós nascimento nos machos que receberam vitamina A, enquanto que no abate a expressão foi maior nas fêmeas controle. Diante disso, a administração vitamina A em bovinos ao nascimento se configurou como uma alternativa para aumentar o marmoreio da carcaça, sem afetar o desempenho dos animais.

Palavras-chave: Ácido retinóico, Expressão gênica, Marmoreio, Programação neonatal

ABSTRACT

The objective of the currently study was to evaluate the effects of one dose administration of vitamin A (300,000 IU) at birth on performance, carcass traits, meat quality and gene expression in beef cattle. So 34 calves Montana × Nelore were utilized (14 females and 20 males) in a completely randomized design, since birth until finishing. Were performed biopsies in *longissimus thoracis* (LT) muscle on day 40 after birth and at weaning, and a sampling at slaughter. Animals were weaning at 270 days and feedlot period lasted 180 days. Performance were not affected by vitamin A. Males presented higher average daily gain, final weight and hot carcass weight. Vitamin A improved fat content of LT. Vitamin A administration increased the expression of angiogenic genes *PDGFR* e *VEGF4* at day 40 after birth and at weaning. For adipogenic genes, the vitamin A administration increased *ZNF423* expression at weaning and slaughter in all animals. In addition, females presented greater expression of *PPARG* at day 40 after birth and at weaning. The expression of myogenic gene *WNT* were higher at day 40 after birth and at weaning in animals that received vitamin A. At slaughter, *WNT* expression were higher in males than females, both from control treatment. Vitamin A administration also increased expression of lipogenic genes *FABP4* at day 40 after birth, *SREBF1* at day 40 after birth and at weaning, on the other hand, decreased expression of *FABP4* at weaning. Also, at weaning males that received vitamin A presented greater expression of *FABP4* than females from control treatment. At day 40 after birth, females presented greater expression of *PPARA* than males. Furthermore, expression of *SCD1* were greater at day 40 after birth in males that received vitamin A, whereas at slaughter were greater in females from control treatment. Thus, vitamin A administration in cattle at birth proved to be effective as an alternative to improve marbling content without affect animal performance.

Keywords: Gene expression, Marbling, Neonatal programming, Retinoic Acid

RESUMO GRÁFICO

VITAMINA A AO NASCIMENTO E GORDURA INTRAMUSCULAR

Dissertação apresentada por Felipe Maciel, em 09 de Outubro de 2020.



A gordura entremeada na carne, conhecida como **MARMOREIO**, é um dos atributos que mais influencia a qualidade da carne. Este tipo específico de gordura é responsável por alterar parâmetros como: **suculência, maciez e sabor**, o que leva a uma experiência de consumo mais prazerosa e positiva.

Trabalhos indicam que a manipulação da formação desse tecido **entre o nascimento e a desmama** de bovinos é uma alternativa para se obter maiores quantidades do mesmo.

A **vitamina A** tem potencial de alterar a expressão de genes relacionados ao processo de formação do marmoreio e estimular o desenvolvimento de adipócitos intramusculares.

→ Ao **nascimento**, bezerros machos e fêmeas receberam, ou não, uma dose de **300.000 UI** de Vitamina A

→ Foram realizadas biópsias do contra-filé (*longissimus thoracis*) aos **40 dias** de vida e ao **desmame**, além de uma coleta ao **abate**

→ Foram analisadas características de desempenho, qualidade de carne e expressão de genes relacionados à formação e aumento do tecido adiposo intramuscular



Vitamina A

→ Aumento de **12%** no teor de gordura intramuscular

→ **Mesmo** desempenho

A administração de vitamina A ao nascimento se apresenta como uma **estratégia produtiva viável** para aumento do marmoreio das carcaças.

O incremento nessa variável pode resultar em **maior remuneração** para os produtores, além de **atender a demanda** de um mercado consumidor mais exigente.

SUMÁRIO

1.	Introdução	9
2.	Revisão bibliográfica	10
2.1.	Adipogênese	10
2.2.	A relação angiogênese x adipogênese x vitamina A	12
2.3.	Lipogênese	16
3.	Material e métodos	18
3.1.	Delineamento experimental, tratamentos e animais	18
3.2.	Terminação em Confinamento	19
3.3.	Abate, coleta de amostras e análise de qualidade de carne	20
3.4.	Expressão Gênica	21
3.5.	Análise estatística	22
4.	Resultados.....	25
4.1.	Desempenho, características de carcaça e de qualidade de carne.....	25
4.2.	Expressão gênica.....	27
5.	Discussão	30
6.	Conclusão	32
7.	Referências bibliográficas	33

1. Introdução

A pecuária de corte brasileira está tradicionalmente ligada à produção de carne com baixo teor de gordura intramuscular, que contribui de forma significativa para que a carne *in natura* brasileira tenha baixo valor agregado frente ao mercado internacional. Esse quesito está intimamente relacionado à predominância do uso de raças zebuínas no rebanho nacional, as quais tem baixa predisposição à formação de tecido adiposo intramuscular, quando comparado às raças taurinas (PEREIRA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2017). A baixa quantidade de gordura intramuscular, ou marmoreio, está relacionado com uma experiência não tão positiva no consumo da carne, uma vez que a gordura intramuscular é importante característica para o desenvolvimento do sabor, suculência e maciez da carne (DODSON *et al.*, 2010).

O grau de marmoreio da carne é dependente dos processos de hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos intramusculares (CIANZIO *et al.*, 1985). A hiperplasia, ou seja, o aumento do número de células através do recrutamento destas para a linhagem adipogênica, é mais pronunciado no tecido adiposo intramuscular do final da gestação até os 250 dias de idade (DU *et al.*, 2017). Portanto, do nascimento ao desmame existe uma janela para maior proliferação de adipócitos intramusculares. Dessa forma, o uso de ferramentas que possam impulsionar a produção de adipócitos nesse período se demonstra como alternativa viável para se aumentar o conteúdo de gordura intramuscular nos animais.

O processo angiogênico, que diz respeito à formação de vasos sanguíneos, está diretamente ligado ao processo adipogênico, uma vez que é através destes vasos que nutrientes e células indiferenciadas são transportadas até o tecido adiposo. Ainda, há indícios de que células situadas na parede desses vasos colaboram com a hiperplasia do tecido adiposo (GUPTA *et al.*, 2012). Em outras palavras, estimulando a angiogênese é possível aumentar o teor de gordura intramuscular.

Neste sentido, a vitamina A é capaz de provocar alterações no recrutamento de células indiferenciadas durante os estágios iniciais da vida de um bovino através de seu metabólito, o ácido retinóico, fazendo com que haja maior direcionamento destas células para a linhagem adipogênica, especialmente para os adipócitos intramusculares (HARRIS *et al.*, 2018).

Um estudo prévio (HARRIS *et al.*, 2018) avaliou a administração neonatal de vitamina A para bezerros com a aplicação de duas doses desta vitamina, sendo a primeira ao nascimento e a segunda aos 30 dias de vida, em animais Angus, no qual os autores identificaram o efeito positivo da vitamina A sobre a formação e deposição de tecido adiposo intramuscular. A fim de se otimizar o manejo na fase de cria, a proposta do presente estudo é condensar a

35 administração da vitamina A em uma única dose ao nascimento, em um manejo realizado junto
36 com os demais cuidados a serem tomados com um neonato. Além de avaliar este efeito em
37 animais cruzados com elevado grau de sangue zebuíno.

38 Assim, hipotetizou-se que a administração de vitamina A injetável logo após o
39 nascimento irá aumentar a deposição de gordura intramuscular em animais cruzados terminados
40 em confinamento, em função do aumento da expressão de genes angiogênicos, adipogênicos e
41 lipogênicos.

42 Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho, a composição química, a
43 qualidade da carne e a expressão de genes envolvidos na angiogênese, adipogênese e lipogênese
44 no músculo de bovinos que receberam ou não a aplicação de vitamina A logo após o
45 nascimento.

46

47 **2. Revisão bibliográfica**

48

49 **2.1. Adipogênese**

50

51 O processo de formação de adipócitos é denominado de adipogênese, o qual consiste na
52 transformação de células tronco mesenquimais (CTM) indiferenciadas em adipócitos maduros,
53 em uma sequência de eventos que envolve as etapas de determinação, proliferação e
54 diferenciação (HAUSMAN *et al.*, 2009). Os diversos tecidos adiposos de bovinos de corte se
55 desenvolvem de forma semelhante, porém de forma assíncrona, sendo que o tecido adiposo
56 visceral é o primeiro a se desenvolver, seguido pelo intermuscular, o subcutâneo e, por fim, o
57 intramuscular (HAUSMAN *et al.*, 2009). Tal processo se inicia por volta do meio do período
58 gestacional de uma vaca e perdura, aproximadamente, até os 250 dias de vida da progênie.
59 Durante esse intervalo de tempo, o período compreendido entre o nascimento e o desmame é
60 chamado de janela de marmoreio, onde a manipulação da adipogênese da gordura intramuscular
61 se torna mais efetiva, graças ao maior recrutamento das células progenitoras para a linhagem
62 de adipócitos intramusculares (DU *et al.*, 2017).

63 Uma vez que as CTMs são células pluripotentes, estas podem ser recrutadas para as
64 linhagens miogênica, fibrogênica, adipogênica ou osteogênica (GHABEN *et al.*, 2019). O
65 potencial de desenvolvimento das CTMs para determinada linhagem celular varia ao longo do
66 período gestacional e da vida do animal. O início do período em que há a possibilidade do
67 recrutamento adipogênico se sobrepõe à miogênese secundária durante o desenvolvimento fetal

68 (DU *et al.*, 2017), fazendo com que haja, em determinado intervalo de tempo, uma competição
69 entre os processos de miogênese e fibro-adipogênese por CTM.

70 A sinalização do Wnt (*Wingless and Int*) é um passo importante na determinação das
71 CTM. A família Wnt é constituída de proteínas sinalizadoras que desempenham papel relevante
72 no recrutamento adiposo, desenvolvimento embrionário e diferenciação celular (LIU *et al.*,
73 2013; NAKAMURA *et al.*, 2013). O Wnt é responsável por modular positivamente a expressão
74 do fator miogênico 5 (*myf5*) (KUHN *et al.*, 2012), direcionando as CTM para a linhagem
75 osteogênica ou miogênica. Quando inibida a via do Wnt, não há expressão do *myf5* e as CTM
76 são então deslocadas para a linhagem fibro-adipogênica, originando as chamadas células
77 progenitoras fibro-adipogênicas (FAPs), ou pré-adipócitos (DU;YIN; *et al.*, 2010).

78 Como o potencial miogênico diminui drasticamente no terço final da gestação, o
79 processo de hipertrofia das fibras musculares se torna predominante, fazendo com que haja a
80 possibilidade de inibir a via de sinalização do Wnt, a fim de se aumentar a determinação de
81 *myf5(-)* para a linhagem fibro/adipogênica (DU;TONG; *et al.*, 2010).

82 A *Zfp423* (Zinc finger protein 423) faz parte da família das proteínas dedos de zinco, a maior
83 família de fatores de transcrição em mamíferos, que regulam diversos processos de
84 desenvolvimento e crescimento (LEON *et al.*, 2000). É um marcador precoce da adipogênese,
85 no qual recruta células progenitoras a pré-adipócitos, durante a chamada fase de determinação
86 (GHABEN *et al.*, 2019).

87 Após o recrutamento das CTM em pré-adipócitos, estes precisam reentrar no ciclo
88 celular e se proliferar. Estímulos iniciais para a proliferação fazem com que haja a expressão
89 dos genes *C/EBPB* e *C/EBPD*, da família das proteínas de ligação ao intensificador CCAAT
90 (*C/EBP*), as quais por sua vez, induzem a expressão do *PPARG* (gene que codifica o receptor
91 ativado por proliferador de peroxissomas gama) (HISHIDA *et al.*, 2009). A atuação conjunta
92 do *PPARG* e da *C/EBPA* no processo de proliferação dos pré-adipócitos é resultado de uma
93 cascata de autorregulação destes dois marcadores adipogênicos. Com o estímulo da *Zfp423*
94 sobre o *PPARG*, este estimula a *C/EBPA* que tem seus níveis aumentados dentro dos pré-
95 adipócitos, causando estímulo maior no *PPARG*, levando à maior proliferação dos adipócitos
96 (DUARTE *et al.*, 2013). Quando *PPARG* e *C/EBPA* se expressam subsequentemente, há a
97 transativação de genes de parada do ciclo celular do adipócito e, como consequência, a
98 proliferação celular é interrompida (LADEIRA *et al.*, 2016). Por fim, a diferenciação terminal
99 de um adipócito para ativar a síntese lipídica e outros programas específicos dos adipócitos
100 necessita de uma ação sincronizada de *PPARG* e *C/EBPs* (DU;YIN; *et al.*, 2010).

101 Uma vez determinados, os pré-adipócitos precisam se diferenciar em adipócitos
102 maduros. Porém, o Wnt juntamente com o fator de transcrição β -catenina, quando ativos,
103 inibem a diferenciação. Assim, para que se tenha uma adipogênese mais abundante, se faz
104 necessário inibir a atuação da via sinalizadora do Wnt/ β -catenina. A inibição da diferenciação
105 se dá por meio da atuação desses fatores de transcrição sobre o *PPARG* e a *C/EBPA*, fatores de
106 transcrição responsáveis por regular a diferenciação adipogênica (MOSETI *et al.*, 2016).

107 As proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) também tem papel pro-adipogênico, sendo
108 relevantes no recrutamento das CTM para a linhagem adipogênica (TANG *et al.*, 2012), através
109 da dissociação de um complexo das proteínas Wnt, fazendo com que estas não inibam a
110 expressão do *PPARG* (GUPTA *et al.*, 2010). O BMP4 faz parte do fator de crescimento
111 transformante β (TGF β), que tem papel relevante na diferenciação das CTM para a linhagem
112 adipócita. De forma geral, o fator de transcrição *Zfp423* estimula a transcrição do *PPARG*,
113 através do estímulo da BMP4 (HAUSMAN *et al.*, 2014).

114 Após a expressão do *C/EBPA* e *PPARG*, há ação do elemento regulador de esterol ligado
115 a proteína 1c (SREBP-1c), codificado pelo gene *SREBPF1*. Esse fator de transcrição atua nos
116 eventos terminais da diferenciação adiposa, uma vez que, no núcleo, ativa a transcrição de genes
117 que codificam as enzimas lipogênicas (TANG *et al.*, 2012), como FABP4 (Proteína de ligação
118 ao ácido graxo 4), adiponectina e leptina (LADEIRA *et al.*, 2016). É também nessa fase que os
119 adipócitos passam a adquirir sensibilidade à insulina, fato esse relacionado ao aumento no
120 número de receptores de insulina e transportadores de glicose (GLUT4) (LADEIRA *et al.*,
121 2016).

122 A expressão do gene *FABP4* ocorre principalmente nos adipócitos maduros e este
123 codifica proteína relacionadas à absorção e transporte de ácidos graxos (AG), estando envolvido
124 na deposição de gordura (DEL PINO *et al.*, 2017). Assim, o acúmulo de *FABP* pode ser um
125 indicativo do número de adipócitos no tecido muscular.

126

127 **2.2. A relação angiogênese x adipogênese x vitamina A**

128

129 A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos, o qual é crucial
130 para o crescimento, expansão e reparo dos tecidos do corpo, incluindo o tecido adiposo que é,
131 provavelmente, o mais vascularizado entre todos os tecidos, uma vez que cada adipócito é
132 circulado por capilares (CAO, 2010). Diante disso, esse processo é espacial e temporalmente
133 associado com o desenvolvimento do tecido adiposo (WANG;FU;LIANG;DEAVILA; *et al.*,
134 2017). A alta vascularização do tecido adiposo é responsável pelo suprimento de nutrientes e

135 oxigênio necessários para a sua expansão, além do transporte de células tronco oriundas da
136 medula óssea e do fornecimento de células tronco, derivadas dos próprios vasos angiogênicos
137 para o recrutamento de adipócitos (TANG *et al.*, 2016). A circulação e entrega de produtos
138 metabólicos necessários para expansão e remodelagem do tecido adiposo, como fatores de
139 crescimento e citocinas, também são realizados através desses vasos
140 (WANG;FU;LIANG;DEAVILA; *et al.*, 2017).

141 Estudos tem demonstrado que pericitos localizados no compartimento celular da parede
142 dos vasos sanguíneos tem características de células troncos e a capacidade de se diferenciar em
143 pré-adipócitos e adipócitos (CAO, 2013; GUPTA *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2008).

144 O fator de crescimento endotelial vascular (Vegfa) é crítico para a angiogênese, uma
145 vez que SUNG *et al.* (2013) mostram que a deleção de Vegfa reduz a densidade vascular e leva
146 à hipoxia, apoptose, inflamação e defeitos metabólicos no tecido adiposo. De modo contrário,
147 a alta expressão de Vegfa aumenta a vascularização do tecido adiposo e a sensibilidade à
148 insulina (ELIAS *et al.*, 2012).

149 Adicionalmente, alguns estudos mostram que fatores de transcrição adipogênicos
150 possuem atividade angiogênica. A marcação da Zfp423, que é um fator de transcrição
151 necessário e suficiente para que um precursor se desenvolva em adipócito, mostrou a origem
152 perivascular dos pré-adipócitos (GUPTA *et al.*, 2012). Além deste, o fator de crescimento
153 transformador beta 2 (TGF- β 2) também pode atuar sobre as células endoteliais vasculares,
154 causando a diferenciação destas em adipócitos (MEDICI *et al.*, 2010).

155 A vitamina A desempenha papel relevante na regulação de diversos processos do
156 desenvolvimento e metabolismo de mamíferos, incluindo reprodução, embriogênese, visão,
157 crescimento, diferenciação e proliferação celular, manutenção da integridade celular epitelial e
158 função imune, além do controle da biologia do tecido adiposo (ARREGUIN *et al.*, 2018; BAR-
159 EL DADON *et al.*, 2017).

160 A absorção da vitamina A é realizada pelos enterócitos, sendo esta posteriormente
161 incorporada nos quilomícrons para ser transportada. Cerca de 66 a 75% dos retinóides oriundos
162 da dieta são captados pelos hepatócitos para serem armazenados na forma de ésteres de retinil
163 ou hidrolisados para retinol (D'AMBROSIO *et al.*, 2011).

164 Uma vez na circulação sanguínea, o retinol se liga às proteínas ligadoras do retinol
165 (RBPs), as quais interagem com o receptor RBP, que atua na absorção celular do retinol. No
166 interior da célula, o retinol é convertido em retinaldeído, através da atuação reversível da
167 enzima álcool desidrogenases (ADHs). Porém, o retinaldeído pode ser convertido,
168 irreversivelmente, a ácido retinóico em uma reação catalisada por retinaldeído desidrogenases

169 (RADHs) (KUMAR *et al.*, 2012; THEODOSIOU *et al.*, 2010). Os ácidos retinóicos
170 sintetizados no citoplasma podem então se unir a duas proteínas celulares ligadoras do ácido
171 retinóico (CRABPs): CRABPI e CRABPII. Quando ligado à CRABPI, o ácido retinóico tem
172 como destino a sua degradação. Entretanto, ao se ligar à CRABPII ou à FABP5, é direcionado
173 para o núcleo celular, onde interage com os receptores do ácido retinóico (RARs) ou com
174 PPARs, respectivamente (CONSERVA *et al.*, 2019). Essa partição do ácido retinóico é o que
175 define seus efeitos biológicos (WANG *et al.*, 2016). Segundo NOY (2013), uma alta relação de
176 CRABP-II/FABP5 é característica de células progenitoras adipogênicas. Já a diferenciação é
177 regulada positivamente por uma maior expressão da FABP5, ativando a sinalização de
178 PPAR β/δ em adipócitos maduros (BERRY *et al.*, 2010). Esses dados mostram que o ácido
179 retinóico afeta de maneira distinta as células progenitoras e adipócitos maduros, devido à
180 expressão específica dos genes de transcrição em cada estágio de desenvolvimento (WANG *et*
181 *al.*, 2016).

182 A epigenética envolve o estudo das mudanças na expressão gênica sem que haja
183 alterações fundamentais na sequência do DNA (WU *et al.*, 2019) e pode atuar como um
184 mecanismo chave que permite a plasticidade fenotípica mantendo um genótipo fixo
185 (FUNSTON *et al.*, 2013). As alterações epigenéticas incluem metilação do DNA, modificações
186 das histonas (metilação e acetilação) e RNAs não codificados (OSORIO *et al.*, 2019).

187 A metilação do DNA é o processo pelo qual grupos metil são adicionados às moléculas
188 do DNA, sem alterar sua sequência, mas modulando a estrutura da cromatina (WU *et al.*, 2019).
189 Esse processo é dependente da via do metabolismo de um carbono, o qual, por sua vez, depende
190 de diversas enzimas na presença de micronutrientes como cofatores, incluindo a disponibilidade
191 de folato, colina e betaína através da dieta (ANDERSON *et al.*, 2012). No metabolismo de um
192 carbono, a metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM), que é considerada o doador
193 metil celular universal (SELHUB, 1999). As DNA metiltransferases (DNMTs) então unem os
194 grupos metil da SAM ao carbono 5 do anel de citosina localizado próximo a um nucleotídeo
195 CpG, gerando 5-metilcitosina, metilando assim o DNA (ANDERSON *et al.*, 2012; BAR-EL
196 DADON *et al.*, 2017).

197 Na região promotora dos genes, a metilação do DNA está relacionada ao silenciamento
198 gênico, ou seja, impede a ligação de fatores de transcrição ou afeta o estado de condensação e
199 a estrutura da cromatina. Em células normais, as ilhas CpG nas regiões promotoras de genes
200 expressos são normalmente não-metiladas, enquanto que em outras partes do genoma são
201 normalmente metiladas (TEODORIDIS *et al.*, 2004).

202 O ciclo de um carbono portanto, é uma via importante para que as mudanças
203 epigenéticas possam ser realizadas no DNA de um mamífero, já que é a partir desta via que são
204 gerados grupos metil para a metilação do DNA. A citosina, ao ser metilada, dá origem à 5-
205 metilcitosina, que confere à cromatina uma conformação mais condensada, o que resulta em
206 expressão diminuída ou inibida de determinados genes. O ácido retinóico é capaz de estimular
207 uma proteína da família *ten-eleven translocation*, a TET2, uma desoxigenase cuja função é
208 converter 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina. Essa reação é caracterizada como sendo o
209 passo inicial para a desmetilação do DNA (HORE, 2017). De maneira geral, uma cromatina
210 hidroximetilada ou desmetilada apresenta uma arquitetura que permite maior acesso dos fatores
211 de transcrição, resultando em maior expressão gênica.

212 Diante disso, com a finalidade de regular a expressão de determinados genes, o ácido
213 retinóico se liga aos receptores do ácido retinóico (RARs) ou aos receptores X dos retinóides
214 (RXRs). Os ácidos trans-retinóicos (ATR), que predominam no interior das células, tem maior
215 afinidade de ligação aos RAR (CORONEL *et al.*, 2019). Ou seja, na presença dos ATR, os
216 RARs dimerizam com os RXRs, formando heterodímeros que atuam como fatores de
217 transcrição, ativando as regiões dos elementos de resposta ao ácido retinóico no promotor dos
218 genes alvo (BASTIEN *et al.*, 2004), como por exemplo, o gene *Zfp423*, aumentando sua
219 expressão (WANG *et al.*, 2016).

220 Estudos recentes demonstraram que o PDGFR α é um marcador de precursores
221 adipogênicos (BERRY *et al.*, 2013; UEZUMI *et al.*, 2010), onde células com expressão desses
222 receptores respondem ao estímulo β -adrenérgico e/ou dietas de alta gordura para se
223 diferenciarem em adipócitos (LEE *et al.*, 2012).

224 Como mencionado anteriormente, as formas bioativas da vitamina A, em especial o
225 ácido retinóico, tem a capacidade de afetar a metilação do DNA (BAR-EL DADON *et al.*,
226 2017), entretanto pouco se sabe sobre o seu papel na biologia do tecido adiposo, metabolismo
227 e nutrição. De acordo com Arreguin *et al.* (2018), o período lactente, em ratos, é crítico para a
228 formação do tecido adiposo. A suplementação com vitamina A, na forma de ésteres de retinol,
229 favoreceu a hiperplasia e o ganho de gordura corporal quando aliada à uma dieta rica em
230 gordura. Fatos estes que foram resultado de uma diminuição na expressão do *PPARG* e a
231 manutenção da capacidade proliferativa aumentada em células adiposas ao desmame, que
232 permitiu o maior recrutamento de adipócitos posteriormente (GRANADOS *et al.*, 2013).

233 Em trabalho conduzido por Arreguin *et al.* (2018), a suplementação pós-natal de
234 vitamina A em doses médias com ésteres de retinil ou β -caroteno, independente da forma de
235 fornecimento diminuiu a metilação no promotor do *Zfp423*, que resultou em maior expressão

236 do gene *Zfp423* no tecido adiposo inguinal ao desmame. Essas descobertas indicam que os
237 efeitos dos retinóides sobre a *Zfp423* possa ser dependente do estágio de desenvolvimento do
238 animal.

239 A expressão da *Zfp423* nos adipócitos é dependente do ácido retinóico, assim como
240 demonstraram (REICHERT *et al.*, 2011). Trabalhando com ratos sem a expressão da enzima
241 aldeído desidrogenase-1a1, que é a responsável pela produção de ácido retinóico a partir de
242 retinaldeído, os autores encontraram uma redução de 70% na expressão de *Zfp423*, *PPARG* e
243 *FABP4*.

244 Coronel *et al.* (2019) desenvolveram um experimento com ratos, onde recém-nascidos
245 foram suplementados com vitamina A na forma de ésteres de retinil, com três vezes a
246 quantidade desse composto no leite durante todo o período de amamentação, uma vez que este
247 é crítico para o desenvolvimento do tecido adiposo. Como resultado encontraram que ratos
248 tratados com vitamina A apresentaram maior proliferação de adipócitos, definida por um
249 número aumentado de pequenos adipócitos.

250 No trabalho conduzido por Wang *et al.* (2017), a suplementação materna com vitamina
251 A promoveu uma angiogênese ampliada através da regulação positiva da expressão de *Vegfa*,
252 um dos principais fatores de crescimento que modulam a angiogênese (ABHINAND *et al.*,
253 2016) e *Vegfr2*, um receptor para os *Vegf*, resultando em um pool mais abundante de células
254 progenitoras adiposas *PDGFR α* ⁺ no tecido adiposo. Assim, a suplementação materna com
255 vitamina A ou ácido retinóico aumenta o pool progenitor na progênie, reduzindo o tamanho
256 médio e aumentando a hiperplasia dos adipócitos. Além disso, os genes pré-adiposos *Pref1*,
257 *Sox9* e *Klf2* tiveram sua expressão induzida nos animais filhos de mães suplementadas
258 (WANG;FU;LIANG;WANG; *et al.*, 2017).

259 De forma contrária, em adipócitos maduros, a vitamina A tem efeito inibitório sobre o
260 acúmulo lipídico, isso porque o ácido retinóico ativa os genes *PPARA* e o *PPARB/D* nessas
261 células, induzindo a oxidação dos ácidos graxos e o catabolismo lipídico (BERRY *et al.*, 2010;
262 NOY, 2013). Além disso, o ácido retinóico é capaz de afetar a atividade transcricional do
263 *PPARG* melhorando a parceria RAR-RXR e deprimindo os dímeros RAR-*PPARG* necessário
264 para o estágio tardio da adipogênese (DAWSON *et al.*, 2012; ZIOUZENKOVA *et al.*, 2008).

265

266 2.3. Lipogênese

267

268 O processo de síntese endógena de ácidos graxos é denominado como lipogênese. A
269 deposição de gordura ocorre de forma heterogênea ao longo do corpo animal e, assim como a

270 adipogênese, inicia-se no tecido adiposo visceral, seguido pelo intermuscular, subcutâneo e
271 intramuscular (PETHICK *et al.*, 2004).

272 A síntese de gordura é dependente da incorporação dos triglicerídeos aos adipócitos,
273 sejam eles oriundos da absorção de ácidos graxos da dieta ou da síntese *de novo* (ROLLIN *et*
274 *al.*, 2007). A deposição de gordura ocorre quando o consumo de energia líquida é superior às
275 exigências, principalmente após a maturidade, quando a taxa de crescimento muscular diminui
276 e a do tecido adiposo aumenta (OWENS *et al.*, 1995).

277 Os triglicerídeos da dieta que atingem o intestino delgado de ruminantes principalmente
278 na forma de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), são absorvidos e, nos enterócitos, são
279 reesterificados para triglicerídeos ou fosfolipídios. Devido à sua natureza lipofílica, os
280 triglicerídeos precisam se associar a proteínas transportadoras, para serem transportados na
281 corrente sanguínea até os tecidos-alvo. Ao atingirem o tecido-alvo, os triglicerídeos são
282 hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL), produzindo ácidos graxos livre (KERSTEN, 2014),
283 e transportados para dentro do adipócito através da proteína de ligação ao ácido graxo (FABP4),
284 uma vez que os ácidos graxos são hidrofóbicos e não se difundem rapidamente pela membrana
285 (LADEIRA *et al.*, 2018).

286 A síntese *de novo* dos AG é dependente da presença de acetil-CoA e NADPH no interior
287 da célula. A acetil-CoA pode ser oriunda de acetato, que é o principal precursor da gordura
288 subcutânea, ou da glicose, que assume o papel de precursor de acetil-CoA no tecido adiposo
289 intramuscular (SMITH *et al.*, 1984). Entretanto, estudos recentes sugerem que em dietas de alto
290 concentrado, a glicose contribui apenas como uma pequena proporção de unidades acetil para
291 a biossíntese dos AG, quando comparado à contribuição do acetato, independentemente do tipo
292 do tecido adiposo (SMITH *et al.*, 2018). Além de fornecer acetil-CoA para a síntese *de novo* de
293 AG, a glicose, oriunda da gliconeogênese a partir de propionato/lactato ou absorvida no
294 intestino delgado, é responsável por originar o glicerol utilizado na formação dos triglicerídeos
295 (NAFIKOV *et al.*, 2007).

296 Para produção de acetil-CoA a partir da glicose duas enzimas são fundamentais: ATP-
297 citrato liase e NADP malato desidrogenase. A primeira, tem atividade sabidamente reduzida
298 em ruminantes. Entretanto, no tecido adiposo intramuscular, sua atividade é maior quando
299 comparada com o tecido adiposo subcutâneo, sendo que em dietas de alta energia, ambas são
300 induzidas no tecido adiposo (PARK *et al.*, 2018). Além disso, os adipócitos intramusculares
301 tem maior expressão de GLUT4, permitindo uma maior utilização de glicose como precursora
302 da síntese *de novo* de gordura (HOCQUETTE *et al.*, 2010).

303 Independente do substrato (acetato e/ou glicose), a lipogênese inicia-se pela ação da
304 acetil-CoA carboxilase (que é codificada pelo gene *ACACA*) (PETHICK *et al.*, 2004), que
305 catalisa a carboxilação da acetil-CoA em malonil-CoA. Posteriormente, a molécula de malonil-
306 CoA sintetizada, irá se unir a outras moléculas de acetil-CoA em uma série de reações em
307 cadeia, catalisadas pelo complexo enzimático ácido graxo sintetase, codificado pelo gene
308 *FASN*, tendo como produto final um ácido graxo saturado de cadeia longa (LADEIRA *et al.*,
309 2016).

310 Uma vez que o ácido graxo é produzido ou absorvido pelos adipócitos, este pode sofrer
311 a ação da enzima estearoil-CoA dessaturase, codificada pelo gene *SCD1*, responsável por inserir
312 duplas ligações na cadeia do ácido graxo, tornando-o insaturado (LADEIRA *et al.*, 2018).

313

314 **3. Material e métodos**

315

316 Todas as atividades realizadas na condução do experimento foram aprovadas pela
317 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
318 Mesquita” - Unesp sob o número de protocolo 0107/2018.

319 O experimento foi realizado nas Fazendas Experimentais Edgárdia e Lageado e no
320 laboratório de qualidade de carne da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” –
321 Unesp, Campus de Botucatu, e laboratório de biologia molecular da Universidade Federal de
322 Lavras.

323

324 **3.1. Delineamento experimental, tratamentos e animais**

325

326 Trinta e quatro bezerros F1 Montana × Nelore foram utilizados desde o nascimento até
327 a fase de terminação em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 × 2
328 (com ou sem aplicação de vitamina A e machos ou fêmeas). Dez bezerros machos e 7 fêmeas
329 receberam a aplicação de vitamina A, enquanto outros 17 (10 machos e 7 fêmeas) não
330 receberam.

331 No dia do nascimento, os bezerros do tratamento com vitamina A receberam uma dose
332 de 300.000 UI de Vitamina A (Monovin A, Bravet, Rio de Janeiro), via injeção intramuscular.
333 Durante a fase de cria, os animais de ambos tratamentos foram mantidos com suas respectivas
334 mães no mesmo piquete e, a partir dos 40 dias de idade, aproximadamente, estes receberam
335 suplemento de *creep feeding* até o desmame.

336 Aos 40 dias e no momento do desmame, foram realizadas biópsias musculares nos
337 animais de ambos tratamentos para futuras análises de expressão gênica. Para a realização da
338 biópsia foi feita a tricotomização na região lombar e administrado um anestésico local
339 (cloridrato de lidocaína HCl, 20 mg/mL, 6mL volume total) via subcutânea. As biópsias foram
340 realizadas na altura da 13^a costela de lados alternados em cada tempo. O local da biópsia foi
341 limpo com um desinfetante para a pele (Iodophor / Betadine). Após a higienização, uma incisão
342 de 1 cm foi feita com um bisturi, e uma agulha esterilizada de biópsia Bergstrom foi usada para
343 obter 1 g de tecido do músculo *longissimus thoracis*, que foi imediatamente armazenado em
344 nitrogênio líquido para posterior análise de expressão gênica. Após o procedimento, a incisão
345 foi lavada com solução salina estéril, água e fechada com cola de tecido veterinário. Um spray
346 antibiótico foi aplicado no local da incisão. Todos os bezerros foram monitorados durante um
347 período de 48 horas pós-biópsia.

348 Além disso, todos os animais foram imunocastrados, recebendo 3 doses do agente
349 imunocastrador, sendo a primeira aos 270 dias, a segunda aos 300 dias e a última aos 390 dias
350 de vida.

351

352 **3.2. Terminação em Confinamento**

353

354 Aos 270 dias, os animais foram desmamados e levados ao confinamento, onde foram
355 alojados em baias individuais cobertas, com piso de concreto, dotadas de comedouros e
356 bebedouros individuais. Os dois grupos de animais receberam a mesma dieta, sendo esta
357 formulada segundo o NASEM 2016 (Tabela 1), fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia, às
358 07h30 e 15h30, além de disporem de acesso livre à água.

359 A cada 15 dias foram coletadas amostras dos ingredientes da dieta. Destas amostras,
360 originou-se uma amostra composta que, após sofrer pré-secagem em estufa de ventilação
361 forçada a 55°C por 72 horas, foram moídas em moinhos com peneira de malha de 1 mm. A
362 análise química das dietas foi realizada de acordo com a Association of Official Analytical
363 Chemists (AOAC, 1990) para Proteína bruta (método 920.87), Cinzas (método 924.05), Extrato
364 etéreo (método 920.85) e Umidade (método 934.01). O conteúdo de amido foi analisado de
365 acordo com HALL (2009) e a fibra em detergente neutro foi analisada de acordo com (VAN
366 SOEST *et al.*, 1991) usando amilase (ISO, 16472, 2006). O conteúdo de carboidratos não
367 fibrosos foram calculados de acordo com SNIFFEN *et al.* (1992).

368 Para determinação do ganho de peso médio diário, os animais foram pesados no início
369 e final do período experimental, após jejum de 16 horas.

370 **Tabela 1.** Quantidade dos ingredientes e composição química da
 371 dieta experimental durante o confinamento.

Composição	
Dieta, g/kg MS	
Milho Moído	660,8
Farelo de Soja	154,6
Bagaço de Cana	152,0
Suplemento mineral ¹	32,6
Composição química, g/kg MS	
Matéria seca, %MN	840,8
Proteína bruta	126,9
FDNcp	230,1
Carboidratos não fibrosos	560,7
Amido	485,0
Cinzas	52,5
Extrato etéreo	29,8

372 ¹ Sódio: 0,2076%; Potássio: 0,87%; Magnésio: 0,3585%; Enxofre:
 373 0,6%; Ferro: 75,458 ppm; Cobre: 14,5 ppm; Manganês 38,3 ppm;
 374 Zinco: 59,4 ppm; Cbalto: 0,93 ppm; Iodo: 0,59 ppm; Selênio: 0,22 ppm;
 375 Fluor: 15,3542 ppm; Vitamina A: 1231.10 UI/kg; Vitamina D3:
 376 576,2042 UI/kg; Vitamina E: 46,5 UI/kg; Tiamina (B1): 2,9703 ppm;
 377 Niacina (B3): 22,0183 ppm; Biotina: 0,9379 ppm; Pirodoxina (B6):
 378 6,3750 ppm; Vitamina B12: 0,0767 ppm; Ácido Fólico: 1,0875 ppm.
 379

380 3.3. Abate, coleta de amostras e análise de qualidade de carne

381

382 Após 180 dias de confinamento os animais foram abatidos em frigorífico comercial,
 383 utilizando a técnica de concussão cerebral e secção da veia jugular, seguido de remoção do
 384 couro e evisceração. Após a esfolagem foram retiradas amostras do músculo *longissimus thoracis*
 385 (LT) da meia-carcaça esquerda na altura da 13^a costela e transportadas em nitrogênio líquido
 386 para análise de expressão gênica.

387 Posteriormente, as carcaças foram divididas longitudinalmente em duas metades para
 388 obtenção do peso de carcaça quente (PCQ) e rendimento de carcaça quente (RC). Após as 24
 389 horas de refrigeração a 2°C, a espessura de gordura subcutânea (EGS) foi medida entre a 12^a e
 390 13^a costelas da meia carcaça esquerda, com auxílio de um paquímetro graduado a ¼ do
 391 comprimento do olho lombar a partir da porção cranial. A área de olho de lombo, também

392 medida entre a 12^a e 13^a costelas, foi delineada em papel de transparência e determinada após
393 a leitura pelo medidor de área LI-3100 (LI-COR Inc., Lincoln, Nebraska, USA).

394 Foi retirado um bife de 2,54 cm de espessura do músculo *longissimus thoracis* da meia-
395 carcaça esquerda a partir da 13^a costela, em direção cranial, para análise de gordura
396 intramuscular. Após o procedimento no frigorífico, a amostra foi transportada e armazenada a
397 -20°C para posterior análise.

398 A análise de composição centesimal foi realizada a partir de um bife moído, por meio
399 do equipamento Foodscan™ (FOSS, Hillerod, Dinamarca) usando o infravermelho próximo de
400 acordo com o método 2007-04 da AOAC.

401

402 3.4. Expressão Gênica

403

404 O desenho dos *primers* (Tabela 2) foi realizado de acordo com as sequências cadastradas
405 e publicadas no banco de dados público do Genbank, uma plataforma do NCBI (*National*
406 *Center for Biotechnology Information*), através do software Oligo Perfect™ Designer (Primer
407 Quest Tool) e analisados no Oligo Analyzer 3.1 e Premier Biosoft (Tabela 2). A partir das
408 sequências, os *primers* foram sintetizados comercialmente (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

409 A extração do RNA total foi feita a partir de tecido muscular congelado com o uso do
410 reagente QIAzol (QIAGEN, Valencia, CA), seguida de tratamento com o DNase DNA free
411 (Invitrogen), de acordo com as instruções da fabricante.

412 A fim de se avaliar a integridade e qualidade das amostras extraídas, o RNA foi
413 submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com *GelRed Nucleic Acid Gel*
414 *Stain* (Biotium, Hayward, CA, USA) o qual foi então visualizado em fotodocumentador E-
415 Gel® Imager Camera Hood (Life Technologies, Neve Yamin, Israel). A quantidade (ng/μL) e
416 qualidade (260/280 e 260/230) do RNA foi avaliada através do nanoespectrofotômetro
417 (DeNovix DS-11, Wilmington, DE, USA).

418 O cDNA foi sintetizado com *Kit High-Capacity cDNA Reverses Transcription* (Applied
419 Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, e, após o
420 processo, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

421 Para RT-qPCR foi utilizado o termociclador Eppendorf Realplex (Eppendorf, Hamburg,
422 Germany), utilizando o sistema de detecção SYBR Green (Applied Biosystems, USA) de
423 acordo com as recomendações descritas por
424 OLIVEIRA *et al.* (2014). Para cada gene em estudo, todo o experimento de RT-qPCR fez uso
425 de diferentes cDNAs obtidos de 34 repetições biológicas, com duas réplicas técnicas cada uma.

426 Os resultados foram normalizados usando o Ciclo Threshold (Ct) obtidos pela expressão do
427 gene de referência *ACTB*. O gene *ACTB* foi escolhido com base no trabalho de COELHO
428 (2018).

429 Os níveis de expressão relativa foram calculadas de acordo com PFAFFL (2001), que
430 se baseia nos valores de Ct que são corrigidos para a eficiência de amplificação para cada par
431 de primers.

432

433 3.5. Análise estatística

434

435 Os dados foram analisados usando o procedimento Mixed do SAS (SAS Inst. Inc., Cary,
436 NC, USA) em um delineamento inteiramente casualizado. Os animais foram considerados a
437 unidade experimental, com a administração de vitamina A, sexo e a interação entre a
438 administração de vitamina A e sexo considerados efeitos fixos, além disso o dia do nascimento
439 dos animais foi usado como covariável. As médias dos mínimos quadrados foram usados para
440 calcular as médias ajustadas para tratamento.

441 Para a análise da expressão gênica, os dados foram analisados através do procedimento
442 Mixed do SAS, considerando os animais como unidade experimental e os efeitos fixos da
443 administração de vitamina A, do sexo e da interação entre a administração de vitamina A e o
444 sexo dos animais. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para análise de
445 normalidade, sendo que quando não apresentaram distribuição normal, foram transformados
446 utilizando o procedimento RANK do SAS. Além disso, o teste de Tukey foi utilizado para
447 determinar as diferenças entre as médias dos tratamentos quando a interação sexo x vitamina
448 foi significativa.

449 Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos e tendências foram aceitas
450 com $P > 0,05$ a $P \leq 0,10$.

451 **Tabela 2.** Sequências e eficiências dos primers usados na análise de RT-qPCR.

Símbolo	Nome	Sequência	Número de acesso	Amplicon (pb)	R ²	Eficiência
<i>PPARA</i>	Receptor ativado por proliferador de peroxissomas alfa	F: CAATGGAGATGGTGGACACA R: TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	NM_001034036.1	95	0.992	99.2
<i>PPARG</i>	Receptor ativado por proliferador de peroxissomas gama	F: GCAATCAAAGTGGAGCCTGT R: CCATGAGGGAGTTGGAAGG	NM_181024.2	83	0.989	99
<i>SREBF1</i>	Elementos reguladores de esterol ligados à proteína	F: GACTACATCCGCTTCCTTCAG R: CCAGGTCCTTCAGCGATT	XM_024980343.1	100	0.985	94.6
<i>SCD1</i>	Estearoil-CoA dessaturase	F: ACCATCACAGCACCTCCTTC R: ATTCAGGGCGGATGTCTTC	NM_173959.4	95	0.999	98
<i>FABP4</i>	Proteína de ligação ao ácido graxo 4	F: GGATGGAAAATCAACCACCA R: GTGGCAGTGACACCATTCAT	NM_174314.2	84	0.995	97
<i>VEGF4</i>	Fator de crescimento endotelial-vascular alfa	F: ACTTGAGTTGGGAGGAGAATG R: GCTGCCGTAAGAGGGATAAA	NM_001316992.1	98	0.999	99.2
<i>PDGFRA</i>	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas alfa	F: CGAGATGGGAGTTTCCAAGAG R: GACAGGTTGAGACCGACTTAAT	XM_024993021.1	107	0.999	99

<i>WNT</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 10B</i>	F: ACTTGAGTTGGGAGGAGAATG R: GCTGCCGTAAGAGGGATAA	XM_010805029.3	106	0.998	98
<i>ZNF423</i>	Proteína dedos de zinco 423	F: AGACAGGAACAGCGTGACAA R: CTGACAGTGATCGCAGGTGT	NM_001101893.1	91	0.996	97.8
<i>CEBPA</i>	Proteína de ligação ao intensificador CCAAT alfa	F: GGCAACGACTTTGACTACCC R: TCGTTGCTGTTCTTGTCCAC	NM_176784.2	83	0.995	92.8
<i>ACACA</i>	Acetil CoA carboxilase	F: TGAAGAAGCAATGGATGAACC R: TTCAGACACGGAGCCAATAA	NM_174224.2	88	0.994	96.6
<i>ACTB</i>	β -actina	F: GTCCACCTTCCAGCAGATGT R: CAGTCCGCCTAGAAGCATTT	NM_173979.3	90	0.998	100
<i>CASC3</i>	Candidato de suscetibilidade para câncer 3	F: GGACCTCCACCTCAGTTC R: GTCTTTGCCGTTGTGATGAA	NM_001098069.1	85	0.976	98

453 4. Resultados

454

455 4.1. Desempenho, características de carcaça e de qualidade de carne

456

457 Não houve efeito significativo da aplicação de vitamina A ou sexo para as variáveis
458 peso ao nascimento, peso ao desmame e ganho médio diário durante a fase de cria ($P \geq 0,28$)
459 (Tabela 3). Da mesma forma, na fase de terminação, não houve efeito sobre as características
460 de desempenho quando os animais receberam vitamina A ($P \geq 0,46$). Em relação ao sexo, os
461 machos apresentaram maior peso vivo inicial ($P = 0,03$), GMD ($P = 0,05$) e, conseqüentemente,
462 maior peso ao abate ($P = 0,01$) do que o observado para as fêmeas. Porém, o consumo de matéria
463 seca e a eficiência alimentar não foram afetados pelo sexo dos animais ($P \geq 0,13$). As
464 características de carcaça não foram afetadas pelo sexo ou aplicação de vitamina A ($P \geq 0,08$).
465 (Tabela 3), exceto o peso de carcaça quente, o qual foi maior para os machos ($P = 0,04$).

466 O músculo LT dos animais que receberam vitamina A apresentou maior teor de gordura
467 ($P = 0,05$) do que o músculo dos animais que não foram tratados (Tabela 5).

468 **Tabela 3.** Desempenho e características de carcaça de animais que receberam ou não vitamina A ao nascimento.

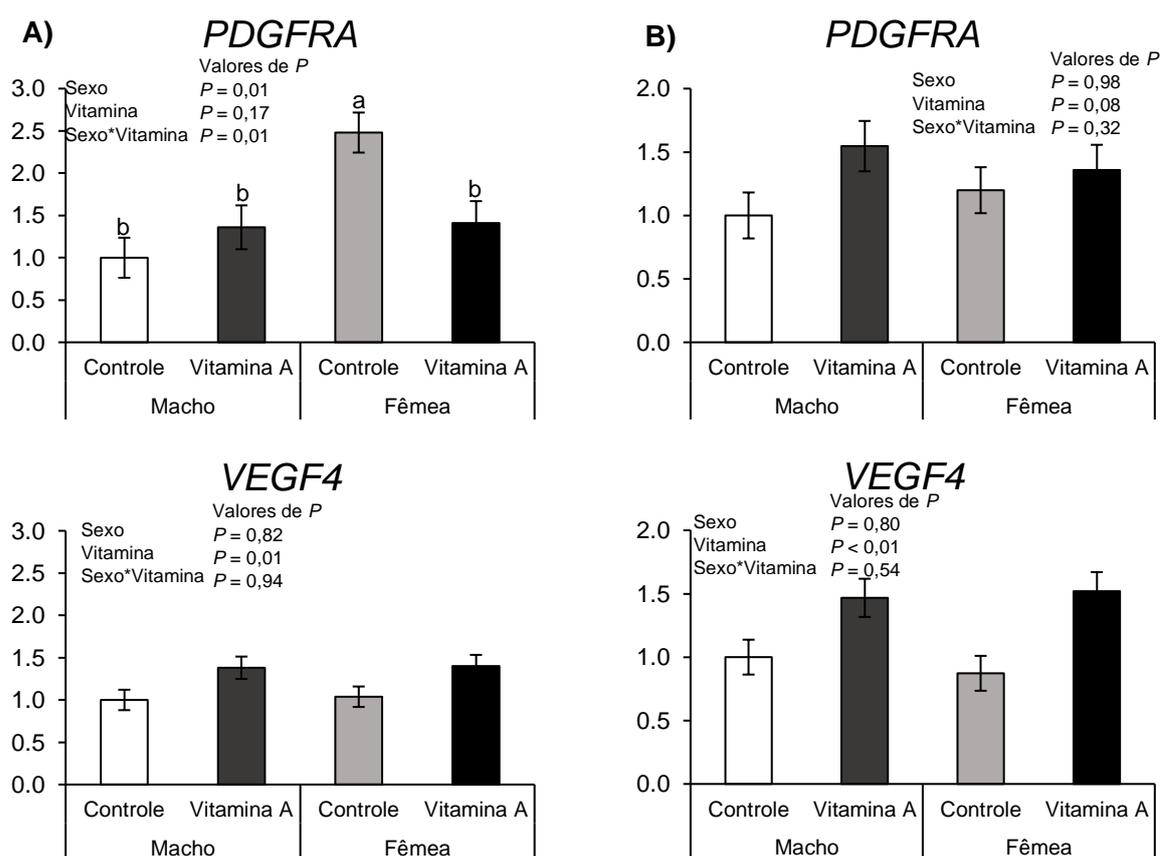
Variáveis	Macho		Fêmea		EPM ¹	Valor de <i>P</i>		
	Controle	Vitamina A	Controle	Vitamina A		Vitamina A (V)	Sexo (S)	V*S
Fase de Cria								
Peso ao nascimento (kg)	29,6	29,4	30,3	27,8	1,41	0,28	0,72	0,42
Peso ao desmame (kg)	247	240	240	236	10,6	0,58	0,56	0,85
Ganho médio diário (kg)	0,802	0,777	0,774	0,768	0,35	0,69	0,76	0,62
Fase de Terminação								
Peso vivo inicial (kg)	307	300	286	280	10,7	0,46	0,03	0,97
Peso vivo final (kg)	401	406	366	375	16,5	0,61	0,01	0,89
Ganho médio diário (kg)	1,026	0,967	0,852	0,868	0,071	0,60	0,05	0,79
Consumo de matéria seca (kg/dia)	9,05	9,10	8,16	8,97	0,505	0,59	0,13	0,65
Eficiência Alimentar (kg/kg)	0,116	0,116	0,108	0,100	0,008	0,97	0,19	0,34
Características de Carcaça								
Peso de carcaça quente (kg)	223	226	208	210	9,31	0,74	0,04	0,98
Rendimento de carcaça (%)	55,9	55,5	55,6	56,1	0,481	0,94	0,75	0,37
Área de olho de lombo (cm ²)	55,1	55,1	54,5	55,4	3,22	0,87	0,95	0,87
Espessura de gordura subcutânea (mm)	12,4	10,3	11,2	12,0	0,939	0,45	0,81	0,12
Gordura intramuscular (%)	2,83	3,55	3,50	3,55	0,192	0,05	0,23	0,23

469 ¹ Erro padrão das médias. O valor apresentado na tabela é o maior valor de EPM encontrado entre as médias dos tratamentos.

470 4.2. Expressão gênica

471

472 Os genes angiogênicos analisados tiveram sua expressão alterada pelos tratamentos
 473 (Figura 1), onde o músculo de fêmeas controle apresentou maior expressão relativa do
 474 *PDGFRA*, quando comparado aos demais tratamentos, 40 dias após o nascimento ($P = 0,01$).
 475 Já no período de desmama, houve tendência da vitamina A aumentar a expressão deste gene (P
 476 $= 0,08$). Em relação ao gene *VEGF4*, o uso de vitamina A fez com que sua expressão fosse
 477 elevada 40 dias após o nascimento ($P = 0,01$) e ao desmame ($P < 0,01$).



478 **Figura 1.** Expressão relativa 40 dias pós-nascimento (A) e ao desmame (B) dos genes *PDGFRA*
 479 e *VEGF4* e ao desmame no músculo *longissimus thoracis* de bovinos que receberam ou não
 480 vitamina A ao nascimento, Erro padrão das médias (EPM) = 0,248 (*PDGFRA* – 40 dias pós-
 481 natal), 0,126 (*VEGF4* – 40 dias pós-natal), 0,190 (*PDGFRA* – desmame), 0,144 (*VEGF4* –
 482 desmame).

483 Em relação aos genes adipogênicos, o uso de vitamina A elevou a expressão de *ZNF423*
 484 ao desmame ($P = 0,02$) e após o abate ($P = 0,03$) (Tabela 4). Além disso, as fêmeas apresentaram
 485 maior expressão do *ZNF423* aos 40 dias após o nascimento ($P = 0,01$). Adicionalmente, as
 486 fêmeas apresentaram maior expressão de *PPARG* aos 40 dias após o nascimento ($P = 0,01$) e
 487 ao desmame ($P = 0,03$).

488 **Tabela 4.** Expressão relativa dos genes de animais que receberam ou não vitamina A ao
 489 nascimento.

Genes	Macho		Fêmea		EPM ¹	Valor de <i>P</i>		
	Controle	Vitamina A	Controle	Vitamina A		Vitamina (V)	Sexo (S)	V*S
<i>Período neonatal</i>								
<i>WNT</i>	1,00	1,50	0,94	1,21	0,128	0,01	0,19	0,39
<i>PPARG</i>	1,00	0,96	1,25	1,31	0,093	0,89	0,01	0,61
<i>ZNF423</i>	1,00	1,16	1,48	1,42	0,125	0,69	0,01	0,39
<i>CEBPA</i>	1,00	0,58	0,29	0,22	0,217	0,27	0,24	0,44
<i>SREBF1</i>	1,00	1,23	0,98	1,34	0,146	0,05	0,77	0,65
<i>PPARA</i>	1,00	1,24	1,26	1,30	0,085	0,11	0,07	0,28
<i>ACACA</i>	1,00	1,14	1,16	1,13	0,058	0,34	0,24	0,16
<i>FABP4</i>	1,00c	13,88a	3,53b	4,39b	0,532	<0,01	<0,01	<0,01
<i>SCD1</i>	1,00c	1,59a	1,33ab	1,23bc	0,105	0,03	0,90	<0,01
<i>Desmama</i>								
<i>WNT</i>	1,00	1,49	1,00	1,53	0,171	0,01	0,91	0,90
<i>PPARG</i>	1,00	0,92	1,22	1,35	0,142	0,97	0,03	0,46
<i>ZNF423</i>	1,00	1,39	0,97	1,26	0,131	0,02	0,56	0,70
<i>CEBPA</i>	1,00	0,78	0,72	0,55	0,157	0,23	0,12	0,89
<i>SREBF1</i>	1,00	1,09	0,62	1,09	0,121	0,04	0,14	0,14
<i>PPARA</i>	1,00	1,19	1,17	1,06	0,136	0,79	0,90	0,28
<i>ACACA</i>	1,00	0,78	0,56	0,77	0,109	0,96	0,06	0,06
<i>FABP4</i>	1,00b	3,69a	3,26a	1,51b	0,599	0,44	0,95	<0,01
<i>SCD1</i>	1,00	1,00	0,95	1,39	0,161	0,19	0,32	0,20
<i>Abate</i>								
<i>WNT</i>	1,00a	0,80ab	0,71b	0,92ab	0,101	0,97	0,42	0,05
<i>PPARG</i>	1,00	1,07	1,15	0,78	0,120	0,22	0,57	0,08
<i>ZNF423</i>	1,00	1,30	1,21	1,37	0,104	0,03	0,19	0,50
<i>CEBPA</i>	1,00	1,18	1,49	1,25	0,183	0,87	0,14	0,26
<i>SREBF1</i>	1,00	1,35	1,42	1,39	0,176	0,37	0,21	0,30
<i>PPARA</i>	1,00	1,10	1,18	1,05	0,082	0,85	0,44	0,19
<i>FABP4</i>	1,00	0,96	1,35	0,73	0,169	0,06	0,73	0,10
<i>ACACA</i>	1,00	1,31	1,31	1,14	0,138	0,62	0,62	0,09
<i>SCD1</i>	1,00b	1,29b	1,92a	1,13b	0,209	0,24	0,08	0,01

490 ¹ Erro padrão das médias. O valor apresentado na tabela é o maior valor de EPM encontrado entre as
 491 médias dos tratamentos.

492 Quando analisadas as expressões dos genes lipogênicos (Tabela 4), os animais que
 493 receberam vitamina A apresentaram maior expressão do *SREBF1* 40 dias após o nascimento (P
 494 = 0,05) e ao desmame (P = 0,04). Além disso, o *FABP4* foi mais expresso aos 40 dias após o
 495 nascimento com o uso de vitamina A (P < 0,01), porém, após o abate esses animais tenderam a
 496 apresentar menor expressão desse gene (P = 0,06). Em relação ao sexo, o músculo das fêmeas

497 tendeu a apresentar maior expressão do *PPARA* comparado ao músculo dos machos no início
498 da vida dos animais ($P = 0,07$).

499 Foi detectada também uma interação vitamina A \times sexo sobre a expressão do gene *SCDI*
500 aos 40 dias após o nascimento e após o abate (Tabela 4). Após o nascimento, os machos que
501 receberam vitamina A apresentaram maior expressão da *SCDI* em comparação aos demais
502 tratamentos ($P < 0,01$). Em contrapartida, após o abate, as fêmeas do grupo controle que
503 apresentaram maior expressão desse gene ($P = 0,01$). Já na desmama, houve interação entre a
504 administração de vitamina A e o sexo dos animais sobre a expressão do gene *FABP4*, cuja
505 expressão foi maior nos machos com vitamina A e nas fêmeas do grupo controle ($P < 0,01$).

506 Por fim, a expressão do gene *WNT*, gene importante na miogênese, foi maior para os
507 animais que receberam vitamina A aos 40 dias pós-nascimento e ao desmame ($P = 0,01$) (Tabela
508 4). Além disso, houve interação vitamina A \times sexo após o abate, que resultou em maior
509 expressão do *WNT* nos machos controle, em comparação com as fêmeas controle, não havendo
510 diferenças entre os demais tratamentos ($P = 0,05$).

511 5. Discussão

512

513 A administração de vitamina A injetável ao nascimento não impactou o desempenho
514 dos animais em nenhuma das fases experimentais, o que já se esperava, uma vez que o
515 tratamento foi feito no início da vida dos bezerros e a dieta fornecida era idêntica entre os
516 diferentes grupos tratados. Diferentemente, Harris *et al.* (2018) reportaram maior ganho diário
517 entre o nascimento e a desmama de animais que receberam duas doses de vitamina A, uma ao
518 nascimento e outra com 30 dias de vida e que foram criados sob as mesmas condições
519 ambientais e nutricionais. Por sua vez, as diferenças encontradas na terminação entre os sexos
520 estão em consonância com a literatura, devido às diferenças entre as curvas de crescimento,
521 deposição tissular e acabamento de machos e fêmeas (MCINTYRE *et al.*, 2009). Além disso,
522 como a imunocastração dos animais foi feita apenas após o desmame, os machos sofreram ação
523 dos hormônios anabólicos que influenciam a deposição do tecido muscular durante determinado
524 período de tempo, mesmo após a aplicação do material imunocastrador, o que pode ter
525 corroborado para melhor desempenho dos machos em relação as fêmeas (ADAMS, 2005).

526 O Vegfa é um fator de transcrição que está correlacionado com o processo angiogênico
527 e estudos indicam que tecidos que apresentam alta expressão desse fator são tecidos altamente
528 vascularizados. No tecido adiposo há uma relação íntima entre a alta vascularização e a
529 hiperplasia deste. Gangaraju *et al.*, 2008 relataram que o processo de diferenciação e maturação
530 dos adipócitos é precedido pelo crescimento de vasos sanguíneos. Tal crescimento é
531 influenciado pelo Vegfa, como mostraram Han *et al.* (2011) em trabalho em que a inibição do
532 *VEGF4* resultou em menor angiogênese o que, conseqüentemente, prejudicou a adipogênese.
533 Ainda, os mesmos autores indicaram que o contato de células progenitoras adiposas com os
534 vasos sanguíneos é uma etapa essencial durante a adipogênese, reforçando a ideia de que a
535 vascularização, representada pela alta expressão de *VEGF4* favorece a adipogênese, além de
536 melhorar a sensibilidade dos adipócitos à insulina.

537 Estas células progenitoras induzidas pela vascularização e conseqüentemente pelo
538 *VEGF4* são conhecidas por expressarem *PDGFRA* (LI *et al.*, 2020). Estudos indicam que a
539 vitamina A, através do ácido retinóico, estimula tanto a expressão de *VEGF4* quanto a de
540 *PDGFRA* (WANG;FU;LIANG;WANG; *et al.*, 2017). Assim, os resultados aqui encontrados de
541 maior expressão de *VEGF4*, 40 dias pós-nascimento e ao desmame nos animais tratados com
542 vitamina A, e a tendência de maior expressão de *PDGFRA* resultaram em maior angiogênese,
543 o que favoreceu a deposição de gordura intramuscular.

544 Os genes *ZNF423*, *PPARG* e *CEBPA* são marcadores do processo hiperplásico do tecido
545 adiposo. A administração de vitamina A no período neonatal é conhecida por estimular a
546 expressão do *ZFP423* (HARRIS *et al.*, 2018). Em consequência dessa maior expressão, é sabido
547 que há estímulo do *ZFP423* sobre a expressão do *PPARG*, o qual por sua vez estimula a
548 expressão do *CEBPA* em uma cascata de autorregulação, que é interrompida quando se inicia
549 o processo de diferenciação dos pré-adipócitos (WEI *et al.*, 2013). No presente trabalho, a
550 vitamina A foi capaz de modular a expressão do *ZNF423*, mas não alterou a expressão de
551 *PPARG* e *CEBPA*. A falta de efeito na expressão de *PPARG* e *CEBPA* pode ser atribuída à alta
552 expressão do *WNT* em células de pré-adipócitos, que assim bloqueia a adipogênese, mantendo
553 os precursores de adipócitos no estágio de pré-adipócitos. Todavia, este efeito não foi o
554 suficiente para inibir o recrutamento de células precursoras para a síntese de tecido adiposo
555 intramuscular em bezerros machos. Mas pode ser a explicação para a ausência de efeitos do uso
556 da vitamina A em fêmeas.

557 Com o decorrer do processo de maturação dos adipócitos, diversos genes
558 reconhecidamente expressos nesse tipo celular começam a ser expressos. Tais genes codificam
559 proteínas que tem funções específicas na lipogênese, sejam elas de transporte, absorção ou
560 síntese de ácidos graxos. Nesse contexto, *SREBF1* tem importância nesse processo, uma vez
561 que tem o potencial de aumentar a expressão de genes presentes nos adipócitos, tais como
562 *FABP4*, *ACACA* e *SCD1* (LADEIRA *et al.*, 2018). A administração de vitamina A ao
563 nascimento afetou positivamente a expressão de *SREBF1* no período neonatal e esse efeito
564 perdurou até a desmama. Com o *SREBF1* altamente expresso, houve estímulo para a expressão
565 de *FABP4* e *SCD1* 40 dias pós-nascimento, indicando que a adipogênese foi maior nestes
566 animais. Além disso, a maior expressão de *FABP4* no tecido adiposo de bezerros pode ser
567 considerado um indicador do número de adipócitos intramusculares destes animais (DEL PINO
568 *et al.*, 2017), mesmo esse gene codificando um transportador lipídico que tem baixa expressão
569 nos estágios iniciais da adipogênese e tem sua expressão aumentada ao longo do processo de
570 diferenciação (HAUSMAN *et al.*, 2014). Associado a isso, a expressão mais acentuada da
571 *FABP4* durante os estágios iniciais da vida dos animais do presente estudo, combinada com
572 uma redução da expressão desse mesmo gene ao abate nas fêmeas e a manutenção da alta
573 expressão nos machos, indica uma deposição de gordura mais precoce nas fêmeas que
574 receberam vitamina A.

575

576 **6. Conclusão**

577

578 A administração de vitamina A em uma única dose ao nascimento foi capaz de aumentar
579 a deposição de gordura intramuscular no músculo *longissimus thoracis* de novilhos, o qual
580 apresentou expressão aumentada de genes relacionados aos processos angiogênicos,
581 adipogênico, principalmente *ZNF423*, e lipogênico. Com isso, a estratégia de administração
582 neonatal de vitamina A em bezerros de corte se configura como alternativa para a melhoria da
583 carne desses animais ao abate, principalmente devido aos ganhos na deposição de gordura
584 intramuscular das carcaças.

585 7. Referências bibliográficas

586

587 ABHINAND, C. S.; RAJU, R.; SOUMYA, S. J.; ARYA, P. S. *et al.* VEGF-A/VEGFR2
588 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. **Journal of cell communication**
589 **and signaling**, 10, n. 4, p. 347-354, 2016.

590

591 ADAMS, T. E. Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate
592 testis function and enhance the productivity of domestic animals. **Anim Reprod Sci**, 88, n. 1-
593 2, p. 127-139, Aug 2005.

594

595 ANDERSON, O. S.; SANT, K. E.; DOLINOY, D. C. Nutrition and epigenetics: an interplay of
596 dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. **J Nutr Biochem**, 23, n.
597 8, p. 853-859, Aug 2012.

598

599 AOAC. **Official methods of analysis**. Arlington, Va: The Association, 1990.

600

601 ARREGUIN, A.; RIBOT, J.; MUSINOVIC, H.; VON LINTIG, J. *et al.* Dietary vitamin A
602 impacts DNA methylation patterns of adipogenesis-related genes in suckling rats. **Arch**
603 **Biochem Biophys**, 650, p. 75-84, Jul 15 2018.

604

605 BAR-EL DADON, S.; REIFEN, R. Vitamin A and the epigenome. **Crit Rev Food Sci Nutr**,
606 57, n. 11, p. 2404-2411, Jul 24 2017.

607

608 BASTIEN, J.; ROCHETTE-EGLY, C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of
609 retinoid-target genes. **Gene**, 328, p. 1-16, 2004/03/17/ 2004.

610

611 BERRY, D. C.; SOLTANIAN, H.; NOY, N. Repression of cellular retinoic acid-binding
612 protein II during adipocyte differentiation. **J Biol Chem**, 285, n. 20, p. 15324-15332, May 14
613 2010.

614

615 BERRY, R.; RODEHEFFER, M. S. Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo.
616 **Nat Cell Biol**, 15, n. 3, p. 302-308, Mar 2013.

617

618 CAO, Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases.
619 **Nat Rev Drug Discov**, 9, n. 2, p. 107-115, Feb 2010.

620

621 CAO, Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism,
622 and insulin sensitivity. **Cell Metab**, 18, n. 4, p. 478-489, Oct 1 2013.

623

624 CIANZIO, D. S.; TOPEL, D. G.; WHITEHURST, G. B.; BEITZ, D. C. *et al.* Adipose Tissue
625 Growth and Cellularity: Changes in Bovine Adipocyte Size and Number. **Journal of Animal**
626 **Science**, 60, n. 4, p. 970-976, 1985.

- 627
628 COELHO, T. C. **Avaliação de genes de referência em diferentes tecidos de bovinos de corte.**
629 2018. (Master's thesis) -, Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.
- 630
631 CONSERVA, M. R.; ANELLI, L.; ZAGARIA, A.; SPECCHIA, G. *et al.* The Pleiotropic Role
632 of Retinoic Acid/Retinoic Acid Receptors Signaling: From Vitamin A Metabolism to Gene
633 Rearrangements in Acute Promyelocytic Leukemia. **Int J Mol Sci**, 20, n. 12, Jun 14 2019.
- 634
635 CORONEL, J.; PINOS, I.; AMENGUAL, J. beta-carotene in Obesity Research: Technical
636 Considerations and Current Status of the Field. **Nutrients**, 11, n. 4, Apr 13 2019.
- 637
638 D'AMBROSIO, D. N.; CLUGSTON, R. D.; BLANER, W. S. Vitamin A metabolism: an
639 update. **Nutrients**, 3, n. 1, p. 63-103, 2011.
- 640
641 DAWSON, M. I.; XIA, Z. The retinoid X receptors and their ligands. **Biochimica et**
642 **Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1821, n. 1, p. 21-56,
643 2012/01/01/ 2012.
- 644
645 DEL PINO, L. M.; ARANA, A.; ALFONSO, L.; MENDIZABAL, J. A. *et al.* Adiposity and
646 adipogenic gene expression in four different muscles in beef cattle. **PLoS One**, 12, n. 6, p.
647 e0179604, 2017.
- 648
649 DODSON, M. V.; HAUSMAN, G. J.; GUAN, L.; DU, M. *et al.* Lipid metabolism, adipocyte
650 depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic
651 research. **Int J Biol Sci**, 6, n. 7, p. 691-699, Nov 22 2010.
- 652
653 DU, M.; FORD, S. P.; ZHU, M. J. Optimizing livestock production efficiency through maternal
654 nutritional management and fetal developmental programming. **Animal Frontiers**, 7, n. 3, p.
655 5-11, 2017.
- 656
657 DU, M.; TONG, J.; ZHAO, J.; UNDERWOOD, K. R. *et al.* Fetal programming of skeletal
658 muscle development in ruminant animals. **J Anim Sci**, 88, n. 13 Suppl, p. E51-60, Apr 2010.
- 659
660 DU, M.; YIN, J.; ZHU, M. J. Cellular signaling pathways regulating the initial stage of
661 adipogenesis and marbling of skeletal muscle. **Meat Sci**, 86, n. 1, p. 103-109, Sep 2010.
- 662
663 DUARTE, M. S.; PAULINO, P. V.; DAS, A. K.; WEI, S. *et al.* Enhancement of adipogenesis
664 and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. **Journal of Animal**
665 **Science**, 91, p. 2938-2946, 2013.
- 666
667 ELIAS, I.; FRANCKHAUSER, S.; FERRE, T.; VILA, L. *et al.* Adipose tissue overexpression
668 of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin
669 resistance. **Diabetes**, 61, n. 7, p. 1801-1813, Jul 2012.

- 670
671 FUNSTON, R. N.; SUMMERS, A. F. Epigenetics: Setting Up Lifetime Production of Beef
672 Cows by Managing Nutrition. **Annual Review of Animal Biosciences**, 1, n. 1, p. 339-363,
673 2013.
- 674
675 GANGARAJU, R.; TRAKTUEV, D.; ROELL, W.; JOHNSTONE, B. *et al.* IFATS Collection:
676 Adipose Stromal Cell Differentiation Is Reduced by Endothelial Cell Contact and Paracrine
677 Communication: Role of Canonical Wnt Signaling. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, 26, p. 2674-
678 2681, 09/01 2008.
- 679
680 GHABEN, A. L.; SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nat Rev Mol Cell**
681 **Biol**, 20, n. 4, p. 242-258, Apr 2019.
- 682
683 GRANADOS, N.; AMENGUAL, J.; RIBOT, J.; MUSINOVIC, H. *et al.* Vitamin A
684 supplementation in early life affects later response to an obesogenic diet in rats. **Int J Obes**
685 **(Lond)**, 37, n. 9, p. 1169-1176, Sep 2013.
- 686
687 GUPTA, R. K.; ARANY, Z.; SEALE, P.; MEPANI, R. J. *et al.* Transcriptional control of
688 preadipocyte determination by Zfp423. **Nature**, 464, p. 619, 03/03/online 2010.
- 689
690 GUPTA, R. K.; MEPANI, R. J.; KLEINER, S.; LO, J. C. *et al.* Zfp423 expression identifies
691 committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. **Cell**
692 **Metab**, 15, n. 2, p. 230-239, Feb 8 2012.
- 693
694 HALL, M. B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds:
695 comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. **J AOAC**
696 **Int**, 92, n. 1, p. 42-49, Jan-Feb 2009.
- 697
698 HAN, J.; LEE, J.-E.; JIN, J.; LIM, J. S. *et al.* The spatiotemporal development of adipose tissue.
699 **Development**, 138, n. 22, p. 5027, 2011.
- 700
701 HARRIS, C. L.; WANG, B.; DEAVILA, J. M.; BUSBOOM, J. R. *et al.* Vitamin A
702 administration at birth promotes calf growth and intramuscular fat development in Angus beef
703 cattle. **J Anim Sci Biotechnol**, 9, p. 55, 2018.
- 704
705 HAUSMAN, G. J.; BASU, U.; DU, M.; FERNYHOUGH-CULVER, M. *et al.* Intermuscular
706 and intramuscular adipose tissues: Bad vs. good adipose tissues. **Adipocyte**, 3, n. 4, p. 242-255,
707 Oct-Dec 2014.
- 708
709 HAUSMAN, G. J.; DODSON, M. V.; AJUWON, K.; AZAIN, M. *et al.* Board-invited review:
710 the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. **J Anim Sci**, 87, n.
711 4, p. 1218-1246, Apr 2009.
- 712

- 713 HISHIDA, T.; NISHIZUKA, M.; OSADA, S.; IMAGAWA, M. The role of C/EBPdelta in the
714 early stages of adipogenesis. **Biochimie**, 91, n. 5, p. 654-657, May 2009.
- 715
716 HOCQUETTE, J. F.; GONDRET, F.; BAEZA, E.; MEDALE, F. *et al.* Intramuscular fat content
717 in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of
718 putative markers. **Animal**, 4, n. 2, p. 303-319, Feb 2010.
- 719
720 HORE, T. A. Modulating epigenetic memory through vitamins and TET: implications for
721 regenerative medicine and cancer treatment. **Epigenomics**, 9, n. 6, p. 863-871, Jun 2017.
- 722
723 JO, Y. H.; PENG, D. Q.; KIM, W. S.; KIM, S. J. *et al.* The effects of vitamin A supplementation
724 during late-stage pregnancy on longissimus dorsi muscle tissue development, birth traits, and
725 growth performance in postnatal Korean native calves. **Asian-Australas J Anim Sci**, 33, n. 5,
726 p. 742-752, May 2020.
- 727
728 KERSTEN, S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . **Molecular Metabolism**,
729 3, n. 4, p. 354-371, 2014.
- 730
731 KUHN, E.; BINART, N.; LOMBES, M. Brown, white, beige: the color of fat and new
732 therapeutic perspectives for obesity... **Ann Endocrinol (Paris)**, 73 Suppl 1, p. S2-8, Oct 2012.
- 733
734 KUMAR, S.; SANDELL, L. L.; TRAINOR, P. A.; KOENTGEN, F. *et al.* Alcohol and aldehyde
735 dehydrogenases: Retinoid metabolic effects in mouse knockout models. **Biochimica et**
736 **Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1821, n. 1, p. 198-205,
737 2012/01/01/ 2012.
- 738
739 LADEIRA, M. M.; SCHOONMAKER, J. P.; GIONBELLI, M. P.; DIAS, J. C. *et al.*
740 Nutrigenomics and Beef Quality: A Review about Lipogenesis. **Int J Mol Sci**, 17, n. 6, Jun 10
741 2016.
- 742
743 LADEIRA, M. M.; SCHOONMAKER, J. P.; SWANSON, K. C.; DUCKETT, S. K. *et al.*
744 Review: Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. **Animal**, 12, n. s2,
745 p. s282-s294, Dec 2018.
- 746
747 LEE, Y. H.; PETKOVA, A. P.; MOTTILLO, E. P.; GRANNEMAN, J. G. In vivo identification
748 of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat
749 feeding. **Cell Metab**, 15, n. 4, p. 480-491, Apr 4 2012.
- 750
751 LEON, O.; ROTH, M. Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions. **Biol Res**,
752 33, n. 1, p. 21-30, 2000.
- 753
754 LI, X.; FU, X.; YANG, G.; DU, M. Review: Enhancing intramuscular fat development via
755 targeting fibro-adipogenic progenitor cells in meat animals. **Animal**, 14, n. 2, p. 312-321, Feb
756 2020.

- 757
758 LIU, Y.; LV, W.; YU, B.; JU, T. *et al.* S-adenosylmethionine-induced adipogenesis is
759 accompanied by suppression of Wnt/beta-catenin and Hedgehog signaling pathways. **Mol Cell**
760 **Biochem**, 382, n. 1-2, p. 59-73, Oct 2013.
- 761
762 MCINTYRE, B. L.; TUDOR, G. D.; READ, D.; SMART, W. *et al.* Effects of growth path, sire
763 type, calving time and sex on growth and carcass characteristics of beef cattle in the agricultural
764 area of Western Australia. **Animal Production Science**, 49, n. 5/6, p. 504-514, 2009.
- 765
766 MEDICI, D.; SHORE, E. M.; LOUNEV, V. Y.; KAPLAN, F. S. *et al.* Conversion of vascular
767 endothelial cells into multipotent stem-like cells. **Nature Medicine**, 16, p. 1400, 11/21/online
768 2010. Article.
- 769
770 MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W. K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential
771 Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. **Int J Mol Sci**, 17, n. 1, Jan 19 2016.
- 772
773 NAFIKOV, R. A.; BEITZ, D. C. Carbohydrate and Lipid Metabolism in Farm Animals. **The**
774 **Journal of Nutrition**, 137, n. 3, p. 702-705, 2007.
- 775
776 NAKAMURA, Y.; HINOI, E.; IEZAKI, T.; TAKADA, S. *et al.* Repression of adipogenesis
777 through promotion of Wnt/beta-catenin signaling by TIS7 up-regulated in adipocytes under
778 hypoxia. **Biochim Biophys Acta**, 1832, n. 8, p. 1117-1128, Aug 2013.
- 779
780 NOY, N. The one-two punch. **Adipocyte**, 2, n. 3, p. 184-187, 2013/07/24 2013.
- 781
782 OLIVEIRA, D. M.; CHALFUN-JUNIOR, A.; CHIZZOTTI, M. L.; BARRETO, H. G. *et al.*
783 Expression of genes involved in lipid metabolism in the muscle of beef cattle fed soybean or
784 rumen-protected fat, with or without monensin supplementation. **J Anim Sci**, 92, n. 12, p. 5426-
785 5436, Dec 2014.
- 786
787 OSORIO, J. S.; MOISA, S. J. Gene Regulation in Ruminants: A Nutritional Perspective. *In:*
788 UCHIUMI, F. (Ed.). **Gene Expression and control**: IntechOpen, 2019.
- 789
790 OWENS, F. N.; GILL, D. R.; SECRIST, D. S.; COLEMAN, S. W. Review of some aspects of
791 growth and development of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, 73, n. 10, p. 3152-3172,
792 1995.
- 793
794 PARK, S. J.; BEAK, S.-H.; JUNG, D. J. S.; KIM, S. Y. *et al.* Genetic, management, and
795 nutritional factors affecting intramuscular fat deposition in beef cattle — A review. **Asian-**
796 **Australas J Anim Sci**, 31, n. 7, p. 1043-1061, 7 2018.
- 797
798 PEREIRA, A. S. C.; BALDI, F.; SAINZ, R. D.; UTEMBERGUE, B. L. *et al.* Growth
799 performance, and carcass and meat quality traits in progeny of Poll Nellore, Angus and
800 Brahman sires under tropical conditions. **Animal Production Science**, 55, n. 10, p. 1295, 2015.

- 801
802 PETHICK, D.; HARPER, G.; ODDY, H. Growth, development and nutritional manipulation
803 of marbling in cattle: A review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 44, p. 705-
804 715, 01/01 2004.
- 805
806 PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
807 **Nucleic Acids Res**, 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.
- 808
809 REICHERT, B.; YASMEEN, R.; JEYAKUMAR, S. M.; YANG, F. *et al.* Concerted Action of
810 Aldehyde Dehydrogenases Influences Depot-Specific Fat Formation. **Molecular**
811 **Endocrinology**, 25, n. 5, p. 799-809, 2011.
- 812
813 RODRIGUES, R. T.; CHIZZOTTI, M. L.; VITAL, C. E.; BARACAT-PEREIRA, M. C. *et al.*
814 Differences in Beef Quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus*
815 *indicus*) Cattle through a Proteomic and Phosphoproteomic Approach. **PLoS One**, 12, n. 1, p.
816 e0170294, 2017.
- 817
818 ROLLIN, X.; MÉDALE, F.; GUTIERES, S.; BLANC, D. *et al.* Short- and long-term nutritional
819 modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout
820 (*Oncorhynchus mykiss*). **British Journal of Nutrition**, 89, n. 6, p. 803-810, 2007.
- 821
822 SELHUB, J. Homocysteine Metabolism. **Annual Review of Nutrition**, 19, n. 1, p. 217-246,
823 1999.
- 824
825 SILVA, M. D. P.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o
826 desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36, p. 21-31,
827 2007.
- 828
829 SMITH, S. B.; BLACKMON, T. L.; SAWYER, J. E.; MILLER, R. K. *et al.* Glucose and acetate
830 metabolism in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissues from steers infused with
831 glucose, propionate, or acetate. **J Anim Sci**, 96, n. 3, p. 921-929, Apr 3 2018.
- 832
833 SMITH, S. B.; CROUSE, J. D. Relative Contributions of Acetate, Lactate and Glucose to
834 Lipogenesis in Bovine Intramuscular and Subcutaneous Adipose Tissue. **The Journal of**
835 **Nutrition**, 114, n. 4, p. 792-800, 1984.
- 836
837 SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. G. *et al.* A net carbohydrate
838 and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **J Anim**
839 **Sci**, 70, n. 11, p. 3562-3577, Nov 1992.
- 840
841 SUNG, H. K.; DOH, K. O.; SON, J. E.; PARK, J. G. *et al.* Adipose vascular endothelial growth
842 factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. **Cell Metab**, 17, n. 1, p. 61-72,
843 Jan 8 2013.
- 844

- 845 TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annu Rev Biochem**,
846 81, p. 715-736, 2012.
- 847
848 TANG, W.; ZEVE, D.; SUH, J. M.; BOSNAKOVSKI, D. *et al.* White Fat Progenitor Cells
849 Reside in the Adipose Vasculature. **Science**, 322, n. 5901, p. 583-586, 2008.
- 850
851 TANG, Y.; QIAN, S.-W.; WU, M.-Y.; WANG, J. *et al.* BMP4 mediates the interplay between
852 adipogenesis and angiogenesis during expansion of subcutaneous white adipose tissue. **Journal**
853 **of Molecular Cell Biology**, 8, n. 4, p. 302-312, 2016.
- 854
855 TEODORIDIS, J. M.; STRATHDEE, G.; PLUMB, J. A.; BROWN, R. CpG-island methylation
856 and epigenetic control of resistance to chemotherapy. **Biochemical Society Transactions**, 32,
857 n. 6, p. 916-917, 2004.
- 858
859 THEODOSIOU, M.; LAUDET, V.; SCHUBERT, M. From carrot to clinic: an overview of the
860 retinoic acid signaling pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 67, n. 9, p. 1423-1445,
861 2010/05/01 2010.
- 862
863 UEZUMI, A.; FUKADA, S.-i.; YAMAMOTO, N.; TAKEDA, S. i. *et al.* Mesenchymal
864 progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal
865 muscle. **Nature Cell Biology**, 12, p. 143, 01/17/online 2010. Article.
- 866
867 VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral
868 detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J Dairy Sci**, 74,
869 n. 10, p. 3583-3597, Oct 1991.
- 870
871 WANG, B.; FU, X.; LIANG, X.; DEAVILA, J. M. *et al.* Retinoic acid induces white adipose
872 tissue browning by increasing adipose vascularity and inducing beige adipogenesis of
873 PDGFRalpha(+) adipose progenitors. **Cell Discov**, 3, p. 17036, 2017.
- 874
875 WANG, B.; FU, X.; LIANG, X.; WANG, Z. *et al.* Maternal Retinoids Increase PDGFRalpha(+)
876 Progenitor Population and Beige Adipogenesis in Progeny by Stimulating Vascular
877 Development. **EBioMedicine**, 18, p. 288-299, Apr 2017.
- 878
879 WANG, B.; NIE, W.; FU, X.; DE AVILA, J. M. *et al.* Neonatal vitamin A injection promotes
880 cattle muscle growth and increases oxidative muscle fibers. **J Anim Sci Biotechnol**, 9, p. 82,
881 2018.
- 882
883 WANG, B.; YANG, Q.; HARRIS, C. L.; NELSON, M. L. *et al.* Nutrigenomic regulation of
884 adipose tissue development - role of retinoic acid: A review. **Meat Sci**, 120, p. 100-106, Oct
885 2016.
- 886
887 WEI, S.; ZHANG, L.; ZHOU, X.; DU, M. *et al.* Emerging roles of zinc finger proteins in
888 regulating adipogenesis. **Cell Mol Life Sci**, 70, n. 23, p. 4569-4584, Dec 2013.

- 889
890 WU, S.; ZHANG, J.; LI, F.; DU, W. *et al.* One-Carbon Metabolism Links Nutrition Intake to
891 Embryonic Development via Epigenetic Mechanisms. **Stem Cells Int**, 2019, p. 3894101, 2019.
- 892
893 ZIOUZENKOVA, O.; PLUTZKY, J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses:
894 New insights into coordinated regulation of the PPAR–RXR complex. **FEBS Letters**, 582, n.
895 1, p. 32-38, 2008/01/09/ 2008.
- 896
897