



KARINA COSTA BUSATO

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO
TURNOVER PROTEICO NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM TOURINHOS ANGUS E
NELORE**

LAVRAS - MG

2015

KARINA COSTA BUSATO

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO *TURNOVER*
PROTEICO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE TOURINHOS ANGUS
E NELORE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Mario Luiz Chizzotti

LAVRAS - MG

2015

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

Busato, Karina Costa.

Expressão de genes relacionados ao *turnover* proteico no
músculo esquelético de tourinhos Angus e Nelore / Karina Costa
Busato. – Lavras : UFLA, 2015.

66 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Mario Luiz Chizzotti.

Bibliografia.

1. *Bos indicus*. 2. *Bos taurus*. 3. IGF-1. 4. Miostatina. 5. mRNA.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

KARINA COSTA BUSATO

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO *TURNOVER*
PROTEICO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE TOURINHOS ANGUS
E NELORE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 24 de junho de 2015.

Dr. Márcio Machado Ladeira	UFLA
Dr. Mateus Pies Gionbelli	UFLA
Dr. Eriton Egídio Lisboa Valente	UNIOESTE
Dr. Marcio de Souza Duarte	UFV

Dr. Mario Luiz Chizzotti
Orientador

**LAVRAS - MG
2015**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a toda a minha família, principalmente meus pais, Karin Costa Busato e Victório Arnal Busato, pela confiança depositada em mim, e pelo apoio e carinho incondicionais durante mais essa etapa da minha vida, e aos meus irmãos Victor e Bruno Costa Busato, pelo companheirismo e incentivo.

À minha irmã de coração, Aline de Castro Rodrigues, amiga de todas as horas, por toda ajuda, paciência e companheirismo, e ao grande e verdadeiro amigo Paulo César Dias, por todo carinho nos momentos mais difíceis!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade concedida para realização do doutorado, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de estudos, tanto no país, quanto no exterior.

Ao professor Dr. Mario Luiz Chizzotti pela orientação, amizade e pelos ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho, e para o meu crescimento profissional, e ao professor Dr. Marcio de Souza Duarte, pela paciência e conhecimentos compartilhados, e por se dispor a participar como membro na banca examinadora.

Aos grandes amigos que fiz: Rafael Torres, Rafael Gomes, Natália Freitas, Rayana Brito, Bruno Garcia, Matheus Galvão, Silas Domingues, Daniel Cunha, Barbara de Andrade, Patricia Maria, Amanda Vasconcelos e Tharcilla Alvarenga, Priscilla Dutra e Dalton Mendes, pela preciosa ajuda no transcorrer dos experimentos.

Aos professores Antonio Chalfun Jr e Luciano Paiva, que gentilmente me permitiram utilizar seus laboratórios, e a todos os funcionários do departamento de Zootecnia.

A todos, o meu mais sincero muito obrigada!

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a expressão de genes envolvidos na regulação do *turnover* proteico no músculo *Longissimus dorsi* (LD) de tourinhos Angus (A) e Nelore (N), e estabelecer a correlação da expressão gênica com características de desempenho. Treze genes e fatores de transcrição pertencentes às vias do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e da miostatina (MSTN) foram estudados. Foram utilizados 13 animais de cada raça, com peso vivo médio inicial de $381,2 \pm 11,8$ kg, em delineamento fatorial 2×2 (duas raças e dois níveis de alimentação) inteiramente casualizado. A dieta consistia em silagem de milho e concentrado à base de milho e soja, numa relação volumoso:concentrado de 30:70. Os tratamentos foram alimentação *ad libitum* (AL, com nove animais de cada raça) ou restrição (R, 55% do consumo total dos animais AL, medido como % do peso vivo metabólico, com quatro animais de cada raça). O período experimental foi de 82 dias, precedido de um período de adaptação de 28 dias. As características de desempenho avaliadas foram: peso vivo final (PVF), ganho médio diário total, inicial e final (GMDt, GMDi e GMDf, medidos, respectivamente do início ao fim, do início à metade e da metade até o final do experimento); peso da carcaça quente (PCQ); peso do LD, e área de olho de lombo (AOL). Após o abate, foram coletadas amostras do músculo LD entre a 12^a e 13^a costelas, para análise da expressão gênica, pela técnica de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa. Não houve diferença ($P > 0,05$) na expressão de nenhum dos genes estudados entre AAL e NAL, enquanto a restrição alimentar aumentou a expressão dos genes receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1R, $P < 0,001$), muscle ring finger 1 (MuRF1, $P = 0,05$) e mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3, $P = 0,04$) e diminuiu a expressão do gene da proteína ligadora 5 do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP5, $P < 0,01$). A AOL foi negativamente correlacionada com a glicogênio sintase quinase 3β (GSK3 β , $P = 0,01$) com a miostatina (MSTN, $P = 0,02$) e com MuRF1 ($P = 0,05$). O PCQ teve correlação negativa com a GSK3 β ($P = 0,01$), com a MSTN ($P = 0,01$) e tendeu a ser negativamente correlacionado com IGFBP5 ($P = 0,07$), enquanto o peso do LD tendeu a ser negativamente correlacionado com a GSK3 β ($P = 0,08$). Os genes MuRF1, Smad3 e IGFBP5 parecem ter importância no crescimento muscular, sendo necessário novos estudos para investigar seu uso como estratégia para aumentar a massa muscular em bovinos.

Palavras-chave: *Bos indicus*. *Bos Taurus*. IGF-1. Miostatina. mRNA.

ABSTRACT

In this study, we aimed at evaluating the expression of genes related to the regulation of muscle protein turnover in the *Longissimus dorsi* (LD) of Angus (A) and Nellore (N) bulls, in addition to estimating the within breed correlations of gene expression and performance traits. We studied 13 genes and transcription factors related to the IGF-1 and myostatin pathways. Thirteen animals from each breed, with initial average live weight of 381.2 ± 11.8 kg were used in a completely randomized, 2 x 2 factorial design (two breeds and two feeding levels). The diet consisted of corn silage and a corn-soybean meal concentrate, in a roughage to concentrate ratio of 30:70. The treatments consisted of *ad libitum* (AL, with nine animals from each breed) or restriction feeding (R, a 55% restriction of total DMI of AL animals, calculated as the percentage of metabolic BW, with four animals of each breed). The duration of the experimental period was of 82 days, preceded by a 28-day adaptation period. The performance traits evaluated were slaughter body weight (SBW), total, initial and final average daily gain (ADGt, ADGi and ADGf, measured from beginning to end of the trial period, from the beginning of the trial to mid-trial and from mid-trial to the end of the trial, respectively), hot carcass weight, LD weight (LDW) and rib eye area (REA). Subsequent to the slaughter, samples were taken from the LD muscle between the 12th and 13th ribs in order to analyze gene expression by means of quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. There was no difference ($P > 0.05$) in the expression of any of the studied genes between AAL and NAL. Feed restriction increased the expression of the IGF-1 receptor (IGF1R, $P < 0.001$), muscle ring finger 1 (MuRF1, $P = 0.05$) and mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3, $P = 0.04$), while decreasing the expression of IGFBP5 ($P < 0.01$). The REA was negatively correlated to glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β , $P = 0.01$), myostatin (MSTN, $P = 0.02$) and MuRF1 ($P = 0.05$). The HCW was negatively correlated to GSK3 β ($P = 0.01$), MSTN ($P = 0.01$) and tended to a negative correlation to IGFBP5 ($P = 0.07$), while the LDW tended to a negative correlation to GSK3 β ($P = 0.08$). Genes MuRF1, Smad3 and IGFBP5 seem to be important for muscle growth, and may be worthy of further investigation as future strategies for increasing muscle in livestock.

Keywords: *Bos indicus*. *Bos Taurus*. IGF-1. mRNA. Myostatin.

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Table 1.	Ingredients and chemical composition of the diet.....	61
Table 2.	Efficiencies, sequences (5'to 3') and amount of primers used in the real-time PCR.....	62
Table 3.	Expression of genes and transcription factors related to the IGF-1 and MSTN pathways in the Longissimus dorsi muscle of Angus and Nellore bulls	63
Table 4.	Performance traits of Angus and Nellore buls	64
Table 5.	Pearson correlation coefficients among gene expression in Longissimus dorsi muscle and performance traits	65

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP1	Proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E 1
AKT	Proteína quinase B
cDNA	Ácido Dextrribonucléico Complementar
eIF2	Fator de iniciação eucariótico 2
eIF4e	Fator de iniciação eucariótico 4e
FOXO1	Fork head box O1
FOXO3	Fork head box O3
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase 3 β
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP3	Proteína ligadora 3 do fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP5	Proteína ligadora 5 do fator de crescimento semelhante à insulina
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MSTN	Miostatina
MuRF	proteína Muscle Ring Finger 1
p70S6K	Proteína ribossomal S6 quinase
PI3K	fosfoinositol 3 quinase
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-qPCR	Transcrição reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real
Smad 3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
Smad 2	Mothers against decapentaplegic homolog 2

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Anatomia e crescimento pós-natal do músculo esquelético	13
2.2	Turnover proteico	15
2.2.1	Sistema calpaína-calpastatina	18
2.2.2	Ubiquitina e proteassomo	20
2.3	Eixo Somatotrópico	22
2.4	Miostatina	27
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	40
	ARTIGO 1 Expression of genes related to the regulation of muscle protein turnover in Angus and Nellore bulls	40

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Embora bovinos de origem indiana (*Bos taurus indicus* ou zebuínos) e bovinos de origem europeia e africana (*Bos taurus taurus* ou taurino) tenham um ancestral comum, estas duas subespécies evoluíram separadas geograficamente, por centenas de milhares de anos (HANSEN, 2004), durante os quais acumularam diversas variações genéticas, que levaram a fenótipos altamente diferenciados. A seleção genética exercida pelo homem intensificou ainda mais essas diferenças, de modo que a separação entre taurinos e zebuínos é tida como a maior distinção de tipo existente entre bovinos domésticos (PORTO NETO et al., 2013), o que torna essas duas subespécies um modelo biológico ideal para desenvolvimento de estudos comparativos de genômica funcional, para a identificação de genes diferencialmente expressos.

Os animais zebuínos evoluíram sob condições tropicais que incluem elevada carga térmica, flutuação na disponibilidade e na qualidade de alimentos, além da presença de endo e ectoparasitas e das doenças transmitidas por eles. Estas condições levaram ao desenvolvimento de características relacionadas à sobrevivência em detrimento de características de desempenho, como crescimento e precocidade (CHIZZOTTI et al., 2013), justificando a menor exigência nutricional de zebuínos, quando comparados a taurinos.

Um dos fatores implicados no reduzido gasto energético de zebuínos seria uma menor taxa de *turnover* proteico nesses animais (SAINZ et al., 2006). O *turnover* proteico é o equilíbrio entre a síntese e a degradação proteicas e, quando positivo, resulta em acréscimo proteico e crescimento muscular.

A seleção genética para crescimento pode alterar o metabolismo proteico em animais domésticos. Em ovinos e bovinos, selecionados

divergentemente para ganho, diferenças na taxa de *turnover* proteico explicaram a maior parte da variação nos gastos energéticos dos músculos dos animais (ODDY et al., 1995, 1998), enquanto que a seleção de bovinos para alto e baixo potencial de crescimento, acarretou variação no perfil transcricional de genes que codificam componentes do eixo somatotrópico (KEADY et al., 2011).

Duas principais vias de sinalização controlam o crescimento do músculo esquelético: a via do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1/ proteína quinase B (IGF-1/AKT), que age como um regulador positivo, e a via da Miostatina/Smad, que atua como um regulador negativo (SCHIAFFINO et al., 2013).

O IGF1 ativa a AKT, e esta, quando ativada, fosforila uma série de substratos. Um desses substratos é o glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β). A inativação da GSK3 β pela AKT (ROMMEL et al., 2001), é um passo necessário para que ocorra a ligação do iniciador Met-tRNA ao ribossomo, durante a tradução (HINNEBUSCH; LORSCH, 2012).

A AKT também ativa uma proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), (ROMMEL et al., 2001). Uma das funções do mTOR é fosforilar e inibir a proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E 1 (4EBP1), uma proteína repressora da tradução. A inibição da 4EBP1 resulta na liberação do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), (BURNETT et al., 1998), o fator responsável pela ligação do mRNA ao ribossomo (KAWASOME et al., 1998), e conseqüentemente, início da tradução. Além disso, o mTOR estimula a quinase da proteína ribossomal S6 de 70 kDa (P70S6K), uma estimuladora da tradução, que subseqüentemente, ativa a proteína ribossomal S6, promovendo a síntese de proteínas ribossomais. Desta forma, o mTOR regula tanto a biogênese ribossomal quanto a iniciação da tradução (KAWASOME et al., 1998).

Ademais, a AKT controla a degradação proteica no músculo esquelético, fosforilando e inibindo dois fatores de transcrição pertencentes à família Forkhead Box O (FOXO), FOXO1 e FOXO3. A fosforilação impede a translocação nuclear de FOXO1 e FOXO3, que ficam sequestrados no citoplasma, longe dos seus genes-alvo. FOXO1 e FOXO3 ativam a expressão de duas enzimas E3 ligases, específicas do músculo esquelético, atrogina 1 e MuRF1 (STITT et al., 2004) que marcam as proteínas miofibrilares para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo (SANDRI et al., 2004).

A Miostatina inibe o crescimento pela fosforilação e translocação nuclear dos fatores de transcrição membro 2 da família Smad (Smad2), e membro 3 da família Smad (Smad3). Embora os alvos transcripcionais de Smad2 e Smad3 ainda sejam desconhecidos, a miostatina parece interferir com a via AKT-mTOR (AMIROUCHE et al., 2009; MORISSETTE et al., 2009; SARTORI et al., 2009; TRENDELENBURG et al., 2009).

Foi observado também, que a proteína ligadora 3 do IGF (IGFBP3) também estimula a fosforilação de Smad2 e Smad3 (FANAYAN et al., 2000), e que o tratamento de culturas celulares com miostatina, provoca um aumento significativo na concentração de mRNA de IGFBP3 (KAMANGA-SOLLO et al., 2003) e quase duplica os níveis de mRNA de IGFBP5 (KAMANGA-SOLLO et al., 2005). Esses resultados levaram à sugestão de que a IGFBP3, a IGFBP5, ou ambas, poderiam estar relacionadas à supressão do crescimento, induzida pela miostatina.

Assim, com o intuito de melhor entender os processos fisiológicos e as vias moleculares associadas ao crescimento do músculo esquelético em bovinos, especialmente aqueles que poderiam diferenciar zebuínos de taurinos, foram estimados os efeitos de raça na expressão de genes, e fatores de transcrição relacionados às vias do IGF-1 (IGF1-R, GSK3 β , eIF4E, P70S6K, IGFBP3, IGFBP5, FOXO1, FOXO3, MuRF1 e atrogina 1), da miostatina (miostatina,

Smad2, Smad3), e as correlações entre expressão gênica e características de desempenho em tourinhos Angus e Nelore em fase de terminação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia e crescimento pós-natal do músculo esquelético

O tecido muscular esquelético é constituído por feixes de células muito longas, cilíndricas e multinucleadas denominadas fibras musculares ou miofibras, que são mantidas unidas por tecido conjuntivo rico em colágeno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Estas células se tornam multinucleadas pela fusão de mioblastos durante o desenvolvimento pré-natal. No interior, e por toda a extensão da fibra muscular, encontram-se as miofibrilas. As miofibrilas são organelas tubulares dispostas em feixes longitudinais que preenchem quase que totalmente o citoplasma das células musculares. Elas são compostas por quatro proteínas principais: miosina, actina, troponina e tropomiosina, que se repetem em um arranjo ordenado, em unidades idênticas, denominadas sarcômeros, conferindo ao músculo esquelético seu padrão estriado (HOSSNER, 2005).

A miosina é a proteína mais abundante na célula muscular, e forma o filamento espesso do sarcômero. A actina é a segunda mais abundante proteína da célula muscular, e forma o filamento delgado do sarcômero. A actina e a miosina são proteínas funcionais, que são responsáveis pela função contrátil do músculo, enquanto que a tropomiosina e a troponina são proteínas estruturais que mantêm as proteínas contráteis em alinhamento adequado, e dão às fibras musculares, elasticidade e extensibilidade (HOSSNER, 2005).

Cada sarcômero encontra-se delimitado por duas linhas Z. A região do sarcômero próxima às linhas Z é composta somente de moléculas de actina e chamada de banda I. A porção central do sarcômero contém a molécula de

miosina e é chamada de banda A. A porção da banda A que contém apenas miosina é chamada zona H. A porção central da zona H é mais escura, e consiste da porção central mais densa da myosina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). À medida que a fibra muscular cresce em comprimento, novos sarcômeros são adicionados às extremidades (WARRISS, 2000).

Duas proteínas com função importante na manutenção da estrutura do sarcômero são a titina, que se estende da linha M até a linha Z, estabilizando as moléculas de miosina (MALINA; BOUCHARD; BAR-OR, 2004), e conectando a molécula de actina às linhas Z, e a desmina, que conecta as miofibrilas umas as outras, fornecendo suporte físico, e unindo-as em uma unidade coesa que permite uma força de contração unificada (HOSSNER, 2005).

O crescimento do músculo esquelético durante o desenvolvimento pré-natal é caracterizado como hiperplasia, ou um aumento no número de células (COSSU; TAJBAKSH; BUCKINGHAM, 1996). Como o número de fibras musculares em bovinos é determinado antes do nascimento, o crescimento muscular pós-natal deve ocorrer por meio do aumento no tamanho das fibras musculares preexistentes, ou seja, hipertrofia (WEGNER et al., 2000).

A hipertrofia muscular resulta do aumento da massa proteica e do número de núcleos da fibra muscular. O aumento da massa proteica é decorrente do aumento da síntese e/ou da diminuição da degradação proteica. Como os núcleos das fibras musculares não são capazes de se dividir, núcleos de células não musculares são necessários para auxiliar na hipertrofia pós-natal (BI; KUANG, 2012; DHAWAN; RANDO, 2005). Estes núcleos são fornecidos pelas células satélites, que são células precursoras miogênicas, no músculo esquelético de adultos, intimamente relacionadas com mioblastos embrionários (GROS et al., 2005)

Dependendo dos sinais recebidos, as células satélites são capazes de se proliferar, se diferenciar em mioblastos e de se fundir umas as outras, para

formar novas miofibras, ou se fundir a miofibras existentes para fornecer DNA adicional, que aumenta a capacidade de síntese proteica das fibras musculares (BI; KUANG, 2012; YIN; PRINCE; RUDNICKI, 2013).

Durante o crescimento pós-natal o número de células satélites diminui drasticamente, porque a diferenciação e a fusão estão ocorrendo mais rapidamente do que a proliferação. Adicionalmente, à medida que o animal se aproxima da maturidade, as células satélites restantes se tornam quiescentes e não se proliferam, ou se diferenciam, a menos que estimuladas para tanto, por exercício ou lesão muscular. Sendo assim, as células satélites não estão mais disponíveis para fornecer núcleos para apoiar a hipertrofia das fibras musculares, o crescimento muscular gradualmente diminui e, finalmente, cessa (DAYTON; WHITE, 2014).

2.2 Turnover proteico

Embora o número e tamanho das células musculares sejam fatores importantes na determinação do crescimento e do tamanho final do músculo esquelético, a taxa de *turnover* proteico ou renovação proteica, também é essencial para o crescimento muscular, uma vez que o volume final de proteína no músculo é resultado do equilíbrio entre a quantidade de proteína sintetizada, e a quantidade de proteína degradada no mesmo (HOSSNER, 2005).

Três mecanismos podem resultar em crescimento muscular: 1) elevada síntese e reduzida degradação proteica; 2) síntese e degradação elevadas (o aumento na síntese é maior do que o aumento na degradação, método menos eficiente) e 3) síntese e degradação reduzidas (a redução da degradação é maior do que a redução na síntese, método mais eficiente). Independente do mecanismo empregado fica claro que a contribuição da síntese é tão importante

quanto a contribuição da degradação, para o acréscimo proteico no músculo (KOOHMARAIE et al., 2002).

Ainda que essa constante sucessão de síntese e degradação de proteínas no organismo, possa parecer um processo energeticamente ineficiente, ela é essencial para a vida. Os aminoácidos gerados pela proteólise muscular são substrato para a gliconeogênese hepática, sendo utilizados em períodos de jejum prolongado, para manter um suprimento de glicose adequado, em particular, para o cérebro, bem como de aminoácidos essenciais para a síntese de proteína continuada. A proteólise também é necessária na eliminação de polipeptídeos que apresentam erros de tradução ou de transcrição, e que poderiam ser prejudiciais para a célula caso não fossem removidos, bem como na degradação de proteínas/isoformas, que são substituídas durante o desenvolvimento ou em resposta a uma demanda fisiológica. Sendo assim, o *turnover* proteico intracelular tem sido mantido através da evolução e seleção, e modelos knockout que eliminam tal processo, são invariavelmente letais para os embriões (GOLL et al., 2008; PICCIRILLO et al., 2014).

O músculo esquelético é composto por três frações de proteínas: as proteínas miofibrilares (representam de 55 – 60% do total, e formam as miofibrilas), as proteínas sarcoplasmáticas (representam de 30 - 35% do total, e contêm a maior parte das enzimas metabólicas), e as proteínas do estroma (representam de 10 - 15% do total, e são compostas por colágeno e proteínas da matriz extracelular (GOLL et al., 2008). Tanto a taxa, quanto os mecanismos envolvidos no *turnover* destas três classes de proteína, diferem entre si. As proteínas do estroma são degradadas por proteases extracelulares, enquanto que as proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares requerem vias proteolíticas intracelulares. Além disso, as proteínas sarcoplasmáticas são renovadas mais rapidamente do que as proteínas miofibrilares ou do estroma, no entanto, o fato de as duas últimas constituírem de 65-75% do total de proteína do músculo,

indica que boa parte dos aminoácidos liberados via *turnover*, se origina da degradação das proteínas miofibrilares e/ou do estroma (NETI et al., 2009).

As proteínas sarcoplasmáticas são degradadas diretamente pelo proteassomo, após a sua ubiquitinação, mas as proteínas miofibrilares não podem ser degradadas pelo proteassomo enquanto estiverem agregadas umas às outras, formando a estrutura miofibrilar. Sendo assim, as proteínas miofibrilares devem, primeiramente, ser dissociadas da miofibrila, sem comprometer, contudo, a capacidade contrátil do músculo, antes de serem degradadas proteoliticamente (GOLL et al., 2008).

Existem quatro grandes sistemas proteolíticos nos músculos. O lisossomal e o proteossômico podem operar degradação exaustiva de proteínas celulares, transformando-as em aminoácidos ou pequenos peptídeos, ao passo que as calpaínas e as caspases, executam uma proteólise limitada, devido à sua especificidade (COSTELLI et al., 2005).

As proteases no sistema lisossomal estão localizadas dentro do lisossomo, de modo que qualquer proteólise neste sistema deve ocorrer no interior dos mesmos. Além do fato de as proteínas miofibrilares serem grandes demais para serem engolfadas pelos lisossomos, as células musculares esqueléticas contém um número reduzido destas organelas, de modo que, parece improvável que as proteases lisossomais estejam envolvidas no *turnover* metabólico de proteínas miofibrilares (GOLL et al., 2008).

A enzima caspase-3 foi capaz de clivar a actina e complexos de actina e miosina *in vitro*, no experimento de Du et al. (2004), sugerindo um possível papel no *turnover* proteico muscular. Entretanto, no mesmo estudo, apesar do bloqueio desta enzima ter reduzido a velocidade da degradação proteica em ratos, apresentando elevadas taxas de proteólise muscular, em decorrência de diabetes, o mesmo bloqueio em ratos controle, não suprimiu a degradação. Consequentemente, os autores concluíram que a estimulação da atividade da

caspase-3, seria uma resposta a uma condição catabólica, ao invés de regular o *turnover* basal de proteínas no músculo.

Assim, dos quatro principais sistemas proteolíticos do músculo esquelético, apenas dois, as calpaínas e o proteassomo, parecem ter um papel importante no *turnover* metabólico de proteínas miofibrilares.

2.2.1 Sistema calpaína-calpastatina

As miofibrilas são estruturas exclusivas do músculo estriado, e representam um caso especial de *turnover*. Como sua função contrátil requer que elas se estendam continuamente de uma extremidade a outra da célula muscular, o *turnover* dessas proteínas deve acontecer sem interromper essa estrutura contínua. Dessa maneira, as proteínas miofibrilares devem ser dissociadas da estrutura da miofibrila antes de serem degradadas (GOLL et al., 2008). Um conjunto de fatos sugere que as calpaínas sejam as enzimas envolvidas nessa dissociação:

- a) As calpaínas agem sobre um número limitado de substratos proteicos, e não os degradam até aminoácidos. Ao invés disso, elas fazem poucas clivagens seletivas, levando a formação de grandes fragmentos (GOLL et al., 2008);
- b) As calpaínas são capazes de clivar proteínas que estão envolvidas na manutenção da estrutura da miofibrila, como titina, desmina, troponina, tropomiosina, nebulina, bem como outras proteínas musculares menores. A miosina é degradada lentamente e a actina não é afetada pelas calpaínas (HOSSNER, 2005);

- c) O músculo esquelético contém quantidades significativas das duas calpaínas ubíquas (μ -calpaína e m-calpaína), bem como de seu inibidor específico, a calpastatina (GOLL et al., 2008);
- d) As calpaínas tendem a se concentrar na banda I e na linha Z (KUMAMOTO et al., 1992). Elas são ativadas por cálcio e o tratamento de miofibrilas purificadas com cálcio, provoca uma perda rápida e completa da linha Z (BUSCH, 1972).
- e) O músculo esquelético contém uma pequena quantidade de miofilamentos que podem ser removidos das miofibrilas, por agitação suave em solução contendo ATP, os chamados miofilamentos facilmente removíveis (ERMs). Esses ERMs são desprovidos de α -actinina, desmina, titina, e nebulina, mas contêm miosina e actina, como seria previsto caso eles houvessem sido removidos da superfície da miofibrila pelas calpaínas. Além disso, a incubação de fibras musculares com leupeptina, um composto que inibe a atividade das calpaínas, diminui a produção de ERM, ao passo que a incubação com cálcio aumenta a produção de ERM, sugerindo envolvimento da atividade proteolítica das calpaínas, no processo de liberação dos ERM (VAN DER WESTHUYZEN; MATSUMOTO; ETLINGER, 1981).

Assim, o papel das calpaínas no *turnover* das proteínas miofibrilares parece estar restrito à liberação de actina e miosina das miofibrilas. Esta ação proteolítica limitada das calpaínas levou à especulação de que os fragmentos de peptídeos resultantes da clivagem dessas enzimas se tornariam substratos para o proteassomo. De fato, a ativação das calpaínas em miotubos aumenta a atividade do proteassomo (KEMP et al., 2013; SMITH; DODD, 2007).

Estudos demonstram que a atividade de calpastatina é mais elevada em raças zebuínas do que em raças taurinas (FERRAZ, 2009; SHACKELFORD et al., 1991; WHIPPLE et al., 1990). Embora no animal vivo, uma maior atividade da calpastatina possa ser energeticamente favorável, já que poderia representar um animal mais eficiente, de crescimento mais rápido, mais musculoso, ou que simplesmente mantém melhor sua massa muscular, devido a uma menor taxa de *turnover* (GOLL et al., 1998), a consequência indesejável da redução da atividade das calpaínas é um declínio na proteólise das miofibrilas durante o período *post mortem*. Como a maioria da proteólise *post mortem* é resultado da atividade da μ -calpaína (GEESINK et al., 2006; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006), e a proteólise das miofibrilas é importante para o amaciamento da carne, os elevados índices de calpastatina nos animais zebuínos têm sido atribuídos à maior rigidez da carne dos mesmos (SHACKELFORD et al., 1991; WHIPPLE et al., 1990).

2.2.2 Ubiquitina e proteassomo

O proteassomo é um sistema proteolítico dependente de ATP, que é essencial para eucariotas. É composto por um complexo catalítico central denominado 20S e por complexos regulatórios 19S (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

O complexo 20S é uma estrutura oca, em forma de barril, que contém os sítios ativos proteolíticos em seu interior. Cada extremidade do barril é tampada por um complexo 19S, que é responsável pelo reconhecimento, desdobramento e inserção dos substratos proteicos no interior da câmara proteolítica. A energia necessária para as funções de abertura de canal e desdobramento de substrato é fornecida por ATPases presentes no complexo 19S (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

A degradação proteica via proteassomo envolve duas etapas consecutivas: a marcação do substrato a ser degradado pela ligação covalente de múltiplas moléculas de ubiquitina (ubiquitinação), seguida da degradação da proteína marcada e liberação da ubiquitina, para que ela possa ser reutilizada (GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002).

A ubiquitinação é realizada por meio de uma série de passos enzimáticos. O primeiro é catalisado por uma enzima chamada E1, que ativa a molécula ubiquitina, numa reação dependente de ATP, para produzir um complexo E1-ubiquitina de alta energia. A ubiquitina ativada é transferida então, para uma de muitas enzimas, denominadas E2 ou proteínas transportadoras de ubiquitina. O complexo E2 interage por sua vez com uma das muitas enzimas denominadas E3 ou ubiquitina ligases. A ubiquitina é transferida para a enzima E3, e o conjugado E3-ubiquitina seleciona uma proteína a ser degradada, transferindo a ubiquitina para a proteína selecionada. O complexo E2-E3-ubiquitina-proteína é então reconhecido pelo proteassomo (GOLL et al., 2008).

Para ser reconhecida pelo proteassomo, a proteína-alvo deve ser marcada com uma cauda, contendo, pelo menos, quatro moléculas de ubiquitina. As moléculas de ubiquitina subsequentes são adicionadas utilizando a mesma série de enzimas E1, E2, E3, que a primeira ubiquitina. Como as E3 ubiquitina-ligases são responsáveis pela seleção e reconhecimento das proteínas a serem degradadas, existem mais de 500 ubiquitina-ligases no genoma humano. Eles servem como os fatores de reconhecimento específicos do sistema (GOLL et al., 2008).

Os produtos da degradação do proteassomo são peptídeos variando de 3 a 23 aminoácidos, que são finalmente hidrolisados a aminoácidos livres por diferentes di e tripeptidases celulares. Estima-se que o proteassomo seja responsável pela degradação de 80 a 90% de todas as proteínas de uma célula,

por conseguinte, muitos estudos têm implicado o proteassomo no *turnover* proteico muscular (GOLL et al., 2008).

Duas proteínas com atividade de E3 ligase, específicas para degradação de proteínas musculares, denominadas Atrogina 1 e MurF1 (proteína muscle ring finger 1), foram descobertas em 2001 (BODINE et al., 2001).

A MuRF1 é capaz de se ligar à molécula de titina nas regiões da linha Z e da linha M. A Titina é uma das proteínas que é substrato das calpaínas, e cuja degradação a nível de linha Z e linha M, seria necessária para dissociação de filamentos de actina e miosina da superfície das miofibrilas. A localização da MuRF1 nestas regiões da titina a posicionaria para ubiquitinação imediata, e degradação proteassomal de qualquer polipeptídeo de titina, se fosse liberado pelas calpaínas (GOLL et al., 2008). Outros substratos da MuRF1 são proteínas contidas nos filamentos espessos da miofibrila (COHEN et al., 2009). O mecanismo pelo qual a atrogina 1 causa perda muscular é menos definido, mas ela é capaz de se ligar ao fator de transcrição MyoD, relacionado ao crescimento, bem como ao fator de iniciação da tradução eIF3-f, que por sua vez, reduz a síntese de proteína (LAGIRAND-CANTALOUBE et al., 2008). Ela também é capaz de ubiquitinar a cadeia pesada e a cadeia leve da miosina, estando então relacionada à degradação de proteínas sarcoméricas (LOKIREDDY et al., 2011a).

2.3 Eixo Somatotrópico

O eixo somatotrópico é um grupo de hormônios que funciona em conjunto para regular o crescimento e o desenvolvimento do organismo. Os hormônios do eixo incluem o hormônio do crescimento (GH), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), e as proteínas ligadoras do IGF-1

(IGFBP). O GH estimula a produção de IGF-1 e IGFBP pelo fígado e outros tecidos do corpo (BREIER, 1999).

O IGF-1 medeia os efeitos anabólicos do GH no músculo, mas ainda há muita controvérsia acerca da contribuição relativa do IGF-1 de origem sistêmica, do IGF-1 de origem muscular, ou mesmo se o GH teria ações diretas sobre o crescimento muscular (KLOVER; HENNIGHAUSEN, 2007; OHLSSON et al., 2009).

A maior parte do IGF-1 na circulação encontra-se ligada às IGFBP. Existem seis IGFBP (IGFBP 1-6), (BOISCLAIR et al., 2001) que atuam no transporte, prolongação da meia vida, interação com receptores celulares e potencialização ou inibição da ação do IGF-1 a nível dos tecidos (KOSTECKA; BLAHOVEC, 2002). Essa regulação da ação do IGF-1 se dá por meio do controle da biodisponibilidade do mesmo, para ligação com seu receptor, o IGF-1R. As IGFBP podem tanto indisponibilizar o IGF para ligação com o IGF-1R, ao se ligarem a ele na circulação, quanto aumentar a quantidade de IGF-1 livre, ao liberarem o mesmo (DENLEY et al., 2005). O músculo esquelético produz IGFBP 2,3,4,5 e 6 (FLORINI; EWTON; COOLICAN, 1996). A forma predominante no músculo é a IGFBP5, enquanto que no plasma é a IGFBP3 (JAMES et al., 1993). Além do mecanismo de ação dependente de IGF, acredita-se que a IGFBP3 e a IGFBP5 apresentem atividades biológicas no tecido muscular, que sejam IGF-independentes, e que estas proteínas estejam envolvidas na via da miostatina, discutida posteriormente (FANAYAN et al., 2000; KAMANGA-SOLLO et al., 2003, 2005).

Em ratos, a transcrição do mRNA da IGFBP5 aumentou no músculo, após denervação (BAYOL; LOUGHNA; BROWNSON, 2000). Exercício diminuiu a expressão de IGFBP5 para um terço do valor de animais controle, enquanto que descarga muscular, por suspensão do membro posterior, dobrou esse valor (AWEDE et al., 1999). Camundongos transgênicos, sobre-

expressando IGFBP3, apresentaram significante redução do peso ao nascer e crescimento pós-natal (MODRIC et al., 2001), ao passo que a supra-expressão de IGFBP5, resultou em inibição do crescimento corporal como um todo, bem como retardo no desenvolvimento muscular (SALIH et al., 2004).

Em bovinos, diferenças na expressão gênica de IGFBP3 e 5 foram observadas entre touros de raças leiteiras e de corte, sendo que a expressão de IGFBP3 foi 1,6 vezes menor e a IGFBP5 1,34 vezes maior em animais leiteiros (SADKOWSKI et al., 2009). A expressão de IGFBP3 também foi maior em animais Angus do que em animais Belgium Blue, mas não houve efeito de raça para a expressão de IGFBP5 (KEADY et al., 2011), enquanto que animais selecionados para alto consumo alimentar residual (CAR), apresentaram maior expressão de IGFBP5, que animais selecionados para baixo CAR (WELCH et al., 2013).

Uma vez dissociado das IGFBP, o IGF-1 se liga a seu receptor, o IGF-1R, que possui atividade tirosina quinase (VELLOSO, 2008), e sinaliza ativando múltiplas vias de sinalização, mas, a da PI3K/AKT (PI3K, fosfoinositol 3 quinase, AKT, proteína quinase B), é uma das vias mais importantes na regulação da síntese de proteínas no músculo esquelético (SCHIAFFINO et al., 2013), sendo responsável também, por mediar o efeito inibitório do IGF-1 sobre a degradação proteica (SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004). A via PI3K/AKT encontra-se ilustrada na Figura 1.

Quando ativada, a AKT fosforila é inativa a glicogênio sintase quinase 3β (GSK3 β), que por sua vez fosforila é inativa ao fator de iniciação eucariótico 2B (eIF2B), (ROMMEL et al., 2001). A inativação da GSK3 β permite que o eIF2B catalise a ativação de outro fator de iniciação, o eIF2, que é o responsável pela ligação do iniciador Met-tRNA, ao ribossomo, no início da tradução (HINNEBUSCH; LORSCH, 2012).

A AKT também ativa uma proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), (ROMMEL et al., 2001). Uma das funções do mTOR é fosforilar e inibir a proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E 1 (4EBP1), (BURNETT et al., 1998), uma proteína repressora da tradução. A inibição da 4EBP1 resulta na liberação do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), o fator responsável pela ligação do mRNA ao ribossomo, e conseqüentemente, início da tradução (KAWASOME et al., 1998). Além disso, o mTOR estimula a quinase da proteína ribossomal S6 de 70 kDa (P70S6K), (BURNETT et al., 1998), uma estimuladora da tradução, que, subsequentemente, ativa a quinase da proteína ribossomal S6. A proteína ribossomal S6 promove a síntese seletiva de proteínas envolvidas na tradução, como os ribossomos. Desta forma, o mTOR regula tanto a biogênese ribossomal quanto a iniciação da tradução (KAWASOME et al., 1998)

Com relação ao controle da degradação proteica no músculo esquelético, a via PI3K/AKT age fosforilando, e inibindo dois fatores de transcrição pertencentes à família Forkhead Box O (FOXO), FOXO1 e FOXO3. A fosforilação impede a translocação nuclear de FOXO1 e FOXO3, que ficam sequestrados no citoplasma, longe dos seus genes-alvo (SANDRI et al., 2004). FOXO1 e FOXO3 regulam expressão de duas E3 ligases específicas do músculo esquelético, atrogina 1 e MuRF1 (SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004) que marcam as proteínas miofibrilares, para degradação pelo sistema ubiquitina-proteassomo. FOXO1 não é suficiente para induzir a transcrição de MuRF1 e atrogina 1, mas sua inibição é necessária para que o IGF-1 exerça sua ação anti-atrótica (STITT et al., 2004), ao passo que FOXO3 é capaz de se ligar ao promotor da atrogina 1 e ativar sua transcrição (SANDRI et al., 2004).

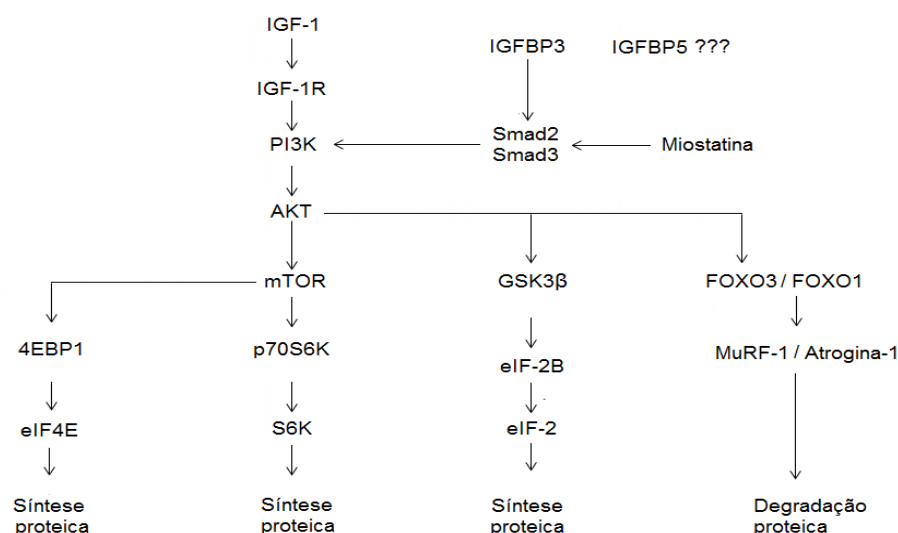


Figura 1 Vias de síntese e degradação proteicas

Fonte: Adaptado de Ge, Zang e Jiang (2013).

Legenda: IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina 1; IGF-1R, receptor do IGF-1; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; AKT, proteína quinase B; mTOR, alvo da rapamicina em mamíferos; p70S6K, quinase da proteína ribossomal S6 de 70 kDa; S6K, quinase da proteína ribossomal S6; 4EBP1, proteína ligadora do fator de iniciação eucariótico 4E 1; eIF4E, fator de iniciação eucariótico 4E; GSK3β, glicogênio sintase quinase 3β; eIF-2B, fator de iniciação eucariótico 2B; FOXO1, proteína forkhead Box 1; FOXO3, proteína forkhead box 3, MuRF-1, proteína muscle ring finger 1; Smad2, membro 2 da família Smad; Smad3, membro 3 da família Smad; IGFBP3, proteína ligadora 3 do fator de crescimento semelhante à insulina; IGFBP5, proteína ligadora 3 do fator de crescimento semelhante à insulina.

A inibição da atividade da GSK3β induziu intensa hipertrofia em miotubos (ROMMEL et al., 2001), enquanto que ativação da AKT, por duas semanas, em camundongos adultos, foi suficiente para induzir alteração do tamanho do músculo esquelético, por aumento da área de secção transversal de fibras musculares individuais, causada por um aumento da síntese proteica via mTOR / P70S6K (LAI et al., 2004).

A ativação da calpaína reduziu a fosforilação de AKT e mTOR em 35 e 50%, respectivamente, e aumentou a ativação de GSK3 β em 40%, sugerindo que a ativação da calpaína, poderia potencialmente, diminuir a taxa de síntese proteica, por redução do aparato de tradução disponível para síntese de proteína. Estes dados sugerem que as calpaínas têm um papel duplo no metabolismo proteico, ativando a proteólise dependente do proteassomo, e inibindo a via da AKT de síntese proteica. Os autores também hipotetizaram que a redução na fosforilação da AKT, poderia promover a transcrição de MuRF1 e atrogina 1 (SMITH; DODD, 2007).

Vários estudos obtiveram alteração no perfil transcricional de genes que codificam componentes do eixo somatotrópico no músculo. A expressão do IGF-1R foi maior em Angus do que em animais Belgium Blue (KEADY et al., 2011) ao passo que novilhas com baixo CAR apresentaram suprarregulação do IGF-1R (1,7 vezes) e do GHR (2,0 vezes), quando comparadas com novilhas alto CAR (KELLY et al., 2013). Touros Limousin apresentaram maior expressão de GHR (2,55 vezes) e menor de GSK3 β (2,19 vezes) que touros Holandeses (SADKOWSKI et al., 2009), e tourinhos Angus apresentaram maior expressão de IGF-1 (42%), eIF4E e menor de GHR (28%) que tourinhos Nelore (FERRAZ, 2009).

2.4 Miostatina

A segunda maior via de sinalização que controla o crescimento do músculo esquelético, envolve a miostatina, uma proteína pertencente a família do fator de crescimento transformante β (TGF- β) (LEE, 2004). A miostatina é expressa em células muito cedo, no desenvolvimento embrionário, e no adulto é encontrada nas células satélites e fibra muscular (HOSSNER, 2005). Ela é produzida no músculo e no tecido adiposo (em menor extensão), e liberada na

circulação, onde se liga a receptores de superfície, levando a redução da massa muscular (CAESTECKER, 2004).

Mutações que causam a inativação do gene da miostatina levam ao fenótipo denominado dupla-musculatura, que é resultado da perda da inibição do processo de proliferação das células embrionárias, de modo que os animais nascem com um número aumentado de fibras musculares (GROBET et al., 1997; KAMBADUR et al., 1997).

Em roedores adultos, a superexpressão de miostatina resultou em menor massa, área da secção transversal e conteúdo de proteína do músculo (AMIROUCHE et al., 2009), ao passo que sua inibição promoveu crescimento da fibra muscular, sendo esse crescimento, independente do recrutamento de células satélites, e parcialmente dependente de mTOR (SARTORI et al., 2009).

A Miostatina sinaliza por meio da ligação com o receptor de ativina tipo IIB (ActRIIB), o qual fosforila e ativa receptores de ativina tipo I, as quinases semelhantes a receptores de ativinas 4 e 5 (ALK4 e ALK5), o que por sua vez resulta na fosforilação e ativação de dois fatores de transcrição Smad2 e Smad3 (REBBAPRAGADA et al., 2003). Os fatores Smad ativados, formam um complexo com o fator Smad4, que transloca-se para o núcleo, ativando a transcrição de genes alvo por meio da interação com o DNA, e outros fatores nucleares (DERYNCK; ZHANG; FENG, 1998), mas os alvos dos complexos Smad2/Smad4 e Smad3/Smad4, ainda não são conhecidos.

Smad2 e Smad3 apresentam efeito aditivo e parecem mediar a inibição da AKT induzida pela miostatina (SARTORI et al., 2009; TRENDELENBURG et al., 2009), embora a inibição da AKT independente de Smad3, também tenha sido relatada (YANG et al., 2007).

O tratamento de culturas celulares com miostatina acarretou diminuição da síntese proteica, reduzidos níveis de AKT fosforilada, aumento na degradação de proteínas sarcoméricas pelo sistema ubiquitina-proteassomo, suprarregulação

de atrogina 1 e MuRF1, além de acúmulo de FOXO1 (LOKIREDDY et al., 2011a, 2011b; MCFARLANE et al., 2006) e FOXO3 (LOKIREDDY et al., 2011a, 2011b) ativados.

A inibição de Smad3 bloqueou a expressão de FOXO1 e atrogina 1 dependente de miostatina, mas não a expressão de MuRF1 e FOXO3, sugerindo que a miostatina requer Smad3 ativado para regular FOXO1 e atrogina 1, e que o mesmo seria dispensável na regulação de FOXO3 e MuRF1, ou, que FOXO3 possa ser importante para regulação de MuRF1 pela miostatina (LOKIREDDY et al., 2011a, 2011b), ou ainda, que Smad2 poderia estar relacionado à supraexpressão de MuRF1, já que a miostatina, ao sinalizar via ActRII, ativa ambos os Smads (SARTORI et al., 2009). No entanto, embora o tratamento de culturas celulares com miostatina, tenha levado ao acúmulo de FOXO3 ativado e elevado a expressão de MuRF1, a degradação das proteínas sarcoméricas ocorreu predominantemente via FOXO1-atrogina 1 (LOKIREDDY et al., 2011a, 2011b).

Alguns estudos encontraram que a miostatina não estimulou a degradação, mas sim, inibiu a síntese proteica, agindo como um regulador negativo da via AKT-mTOR. (AMIROUCHE et al., 2009; SARTORI et al., 2009). Além disso, como a atrogina 1 pode ubiquitinar o fator de iniciação da tradução eIF3f, a miostatina poderia também promover redução de proteínas sarcoméricas pela degradação de componentes do sistema de tradução, o que também reduziria a síntese proteica (LOKIREDDY et al., 2011b).

Foi observado também que a IGFBP3 pode estimular a fosforilação de Smad2 e Smad3 (FANAYAN et al., 2000), e que o tratamento de culturas celulares com miostatina, provoca um aumento significativo na concentração de mRNA de IGFBP5 (KAMANGA-SOLLO et al., 2005), além de aumentar a concentração da proteína IGFBP3, e quase duplicar os níveis de mRNA da mesma (KAMANGA-SOLLO et al., 2003).

Imunoneutralização da IGFBP3, IGFBP5, ou ambas, reduz a habilidade da miostatina em inibir a proliferação celular, ao passo que, a imunoneutralização de ambas em culturas tratadas com miostatina, restaura as taxas de proliferação para valores próximos aos observados em culturas controle não tratadas com miostatina. O efeito da imunoneutralização também parece ser aditivo, sugerindo que a IGFBP3 e IGFBP5 funcionem via diferentes mecanismos (KAMANGA-SOLLO et al., 2005). Adicionalmente, foi demonstrado que estas proteínas podem se deslocar para o núcleo (XI et al., 2007; XU et al., 2004), e que o tratamento com TGF- β leva a um aumento significativo na proporção de núcleos positivos para IGFBP3 (XI et al., 2007).

Esses resultados reforçam a ideia de que IGFBP3 e IGFBP5 possuem atividades IGF-independentes, sugerem que a IGFBP3, a IGFBP5, ou ambas, estejam relacionadas à supressão da proliferação celular induzida pela miostatina *in vitro*. (DAYTON; WHITE, 2008), e ainda, que a interação entre as vias do IGF-1 e da miostatina, poderia ocorrer em mais de um ponto.

Corroborando com o supracitado, o tratamento de culturas celulares com IGF-1, induz a expressão de miostatina pela via PI3K/AKT, sugerindo um mecanismo de *feedback* entre as duas vias (YANG et al., 2007). Adicionalmente, o IGF-1 é capaz de bloquear a fosforilação de smad3 induzida por TGF- β , mas não Smad2, também pela via PI3K/AKT (SONG et al., 2003). FOXO1 também é capaz de induzir a expressão de miostatina (ALLEN; UNTERMAN, 2007).

REFERÊNCIAS

ALLEN, D. L.; UNTERMAN, T. G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 292, n. 1, p. 188-199, Jan. 2007.

AMIROUCHE, A. et al. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 150, n. 1, p. 286-294, Jan. 2009.

AWEDE, B. et al. Regulation of IGF-I, IGFBP-4 and IGFBP-5 gene expression by loading in mouse skeletal muscle. **FEBS Letters**, Amsterdam v. 461, n. 3, p. 263-267, Nov. 1999.

BAYOL S.; LOUGHNA, P. T.; BROWNSON C. Phenotypic expression of IGF binding protein transcripts in muscle, in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 273, n. 1, p. 282-286, June 2000.

BI, P.; KUANG, S. Meat science and muscle biology symposium: stem cell niche and postnatal muscle growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 3, p. 924-935, Mar. 2012.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, New York, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, Nov. 2001.

BOISCLAIR, Y. R. et al. The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 170, n. 1, p. 63-70, July 2001.

BREIER, B. H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 17, n. 2/3, p. 209-218, Oct. 1999.

BURNETT, P. E. et al. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70S6 kinase and 4E-BP1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, Washington, v. 95, n. 4, p. 1432-1437, Feb. 1998.

BUSCH, W. A. et al. Ca²⁺-specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 52, n. 2, p. 367-381, Feb. 1972.

CAESTECKER, M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 1-11, Feb. 2004.

CHIZZOTTI, M. L. et al. Energetic efficiency of zebu cattle. In: REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA PARA LA PRODUCCIÓN ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA, 11.; SEMINARIO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EL TRÓPICO, 9., 2013, Villahermosa. **Anais...** Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2013. p. 173-185.

COHEN, S. et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 185, n. 6, p. 1083-1095, June 2009.

COSSU, G.; TAJBAKHS, S.; BUCKINGHAM, M. How is myogenesis initiated in the embryo. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 218-223, June 1996.

COSTELLI, P. et al. Ca²⁺-dependent proteolysis in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Amsterdam, v. 37, n. 10, p. 2134-2146, Oct. 2005.

DAYTON, W. R.; WHITE, M. E. Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 217-225, Apr. 2008. Supplement.

DAYTON, W. R.; WHITE, M. E. Role of satellite cells in anabolic steroid-induced muscle growth in feedlot steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 1, p. 30-38, Jan. 2014.

DENLEY, A. et al. Molecular interactions of the IGF system. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 16, n. 4/5, p. 421-439, Aug./Oct. 2005.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y.; FENG, X. H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. **Cell**, Cambridge, v. 95, n. 6, p. 737-740, Dec. 1998.

DHAWAN, J.; RANDO, T. A. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 15, n. 12, p. 666-673, Dec. 2005.

DU, J. et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 113, n. 1, p. 115-123, Jan. 2004.

FANAYAN, S. et al. Growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-3 in T47D breast cancer cells requires transforming growth factor-beta (TGF-beta) and the type II TGF-beta receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 50, p. 39146-39151, Dec. 2000.

FERRAZ, A. L. J. **Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças nelore e Aberdeen Angus e sua relação com o desenvolvimento muscular e maciez da carne**. 2009. 113 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2009.

FLORINI, J. R.; EWTON, D. Z.; COOLICAN, S. A. Growth hormone and insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 17, n. 5, p. 481-517, Oct. 1996.

GEESINK, G. H. et al. μ -Calpain is essential for postmortem proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2834-2840, Oct. 2006.

GE, X.; ZHANG, Y.; JIANG, H. Signaling pathways mediating the effects of insulin-like growth factor-I in bovine muscle satellite cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 372, n. 1/2, p. 23-29, June 2013.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiological Reviews**, Washington, v. 82, n. 2, p. 373- 428, Apr. 2002.

GOLL, D. E. et al. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 14, p. 19-35, Apr. 2008. Supplement.

GOLL, D. E. et al. The calpain system and skeletal muscle growth. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 78, n. 4, p. 503-512, Dec. 1998.

GROBET, L. et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, New York, v. 17, n. 1, p. 71-74, Sept. 1997.

GROS J. et al. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. **Nature**, London, v. 435, n. 7044, p. 954- 958, June 2005.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, p. 349-360, July 2004.

HINNEBUSCH, A. G.; LORSCH, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 4, n. 10, p. 1-25, Oct. 2012.

HOSSNER, K. L. Development of muscle, skeletal system and adipose tissue. In: _____. **Hormonal regulation of farm animal growth**. Cambridge: CABI, 2005. chap. 4, p. 55-93.

JAMES, P. L. et al. A highly conserved insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-5) is expressed during myoblast differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 30, p. 22305-22312, Oct. 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido muscular. In: _____. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap. 10, p. 177-198.

KAMANGA-SOLLO, E. et al. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 mediate TGF- β - and myostatin induced suppression of proliferation in porcine embryonic myogenic cell cultures. **Experimental Cell Research**, New York, v. 311, n. 1, p. 167-176, Nov. 2005.

KAMANGA-SOLLO, E. et al. Role of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in TGF- β - and GDF-8 (myostatin)-induced suppression of proliferation in porcine embryonic myogenic cell cultures. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 197, n. 2, p. 225-231, Nov. 2003.

KAMBADUR, R. et al. Mutations in myostatin GDF8 in double-muscled Belgian blue and piedmontese cattle. **Genome Research**, New York, v. 7, n. 9, p. 910-915, Sept. 1997.

KAWASOME, H. et al. Targeted disruption of p70s6k defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, Washington, v. 95, n. 9, p. 5033-5038, Apr. 1998.

KEADY, S. et al. Effect of sire breed and genetic merit for carcass weight on the transcriptional regulation of the somatotropic axis in longissimus dorsi of crossbred steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 12, p. 4007-4016, Dec. 2011.

KELLY, A. K. et al. Expression of key genes of the somatotropic axis in Longissimus dorsi muscle of beef heifers phenotypically divergent for residual feed intake. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 159-167, Jan. 2013.

KEMP, C. M. et al. The effects of Capn1 gene inactivation on skeletal muscle growth, development, and atrophy, and the compensatory role of other proteolytic systems. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 7, p. 3155-3167, July 2013.

KLOVER, P.; HENNIGHAUSEN, L. Postnatal body growth is dependent on the transcription factors signal transducers and activators of transcription 5a/b in muscle: a role for autocrine/paracrine insulin-like growth factor I. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 148, n. 4, p. 1489-1497, Apr. 2007.

KOOHMARAIE, M. et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, Barking, v. 62, n. 3, p. 345-352, Nov. 2002.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 1, p. 34-43, Sept. 2006.

KOSTECKA, Z.; BLAHOVEC, J. Animal insulin-like growth factor binding proteins and their biological functions. **Veterinární Medicína**, Praha, v. 47, n. 2/3, p. 75-84, 2002.

KUMAMOTO, T. et al. Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. **The Anatomical Record**, New York, v. 232, n. 1, p. 60-77, Jan. 1992.

LAGIRAND-CANTALOUBE, J. et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. **The Embo Journal**, Eynsham, v. 27, n. 8, p. 1266-1276, Apr. 2008.

LAI, K.V. et al. Conditional activation of Akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, n. 21, p. 9295-9304, Nov. 2004.

LEE, S. J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 20, p. 61-86, Nov. 2004.

LOKIREDDY, S. et al. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 25, n. 11, p. 1936-1949, Nov. 2011a.

LOKIREDDY, S. et al. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 301, n. 6, p. 1316-1324, Dec. 2011b.

MALINA, R. M.; BOUCHARD, C.; BAR-OR, O. Skeletal muscle tissue. In: _____. **Growth, maturation and physical activity**. 2nd ed. Champaign: Human Kinetics, 2004. chap. 7, p. 137-154.

MCFARLANE, C. et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kB-Independent, foxO1-dependent mechanism. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 209, n. 2, p. 501-514, Nov. 2006.

MODRIC, T. et al. Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor-binding protein-3 overexpression in transgenic mice. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 142, n. 5, p. 1958-1967, May 2001.

MORISSETTE, M. R. et al. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 297, n. 5, p. 1124-1132, Nov. 2009.

NETI, G. et al. Properties of easily releasable myofilaments: are they the first step in myofibrillar protein turnover? **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 296, n. 6, p. 1383-1390, June 2009.

ODDY, V. H. et al. Effect of divergent selection for yearling growth rate on protein metabolism in hind-limb muscle and whole body of Angus cattle. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 225-231, Dec. 1998.

ODDY, V. H. et al. Protein metabolism in lambs from lines divergently selected for weaning weight. **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 124, n. 1, p. 129-137, Feb. 1995.

OHLSSON, C. et al. The role of liver derived insulin-like growth factor-I. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 30, n. 5, p. 494-535, Aug. 2009.

PICCIRILLO, R. et al. Mechanisms of muscle growth e atrophy in mammals and drosophila. **Developmental Dynamics**, New York, v. 243, n. 2, p. 201-215, Feb. 2014.

PORTO-NETO, L. R. et al. Genomic divergence of zebu and taurine cattle identified through high-density SNP genotyping. **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 876-888, Dec. 2013.

REBBAPRAGADA, A. et al. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 23, n. 20, p. 7230-7242, Oct. 2003.

ROMMEL, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI3K/Akt/mTOR and PI3K/Akt/GSK3 pathways. **Nature Cell Biology**, London, v. 3, n. 11, p. 1009-1013, Nov. 2001.

SADKOWSKI, T. et al. Comparison of skeletal muscle transcriptional profiles in dairy and beef breeds bulls. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 50, n. 2, p. 109-123, June 2009.

SAINZ, R. D. et al. Growth patterns of Nellore vs British beef cattle breeds assessed using a dynamic, mechanistic model of cattle growth and composition. In: KEREAB, E. et al. (Ed). **Nutrient digestion and utilization in farm animals: modelling approaches**. Wallingford: CABI, 2006. chap. 16, p. 160-170.

SALIH, D. A. et al. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, Washington, v. 101, n. 12, p. 4314-4319, Mar. 2004.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, Cambridge, v. 117, n. 3, p. 399-412, Apr. 2004.

SARTORI, R. et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 296, n. 6, p. 1248-1257, June 2009.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 280, n. 17, p. 4294-4314, Sept. 2013.

SHACKELFORD, S. D. et al. An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 171-177, Jan. 1991.

SMITH, I. J.; DODD, S. L. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signaling pathway in rat diaphragm muscle. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 561-573, May 2007.

SONG, K. et al. Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor- β by phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt dependent suppression of the activation of Smad3 but Not Smad2. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 40, p. 38342-38351, Oct. 2003.

STITT, T. N. et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 395-403, May 2004.

TRENDELENBURG, A. U. et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6 signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 296, n. 6, p. 1258-1270, June 2009.

VAN DER WESTHUYZEN, D. R.; MATSUMOTO, K.; ETLINGER, J. D. Easily releasable myofilaments from skeletal and cardiac muscles maintained in vitro. Role in myofibrillar assembly and turnover. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, n. 22, p. 11791-11797, Nov. 1981.

VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 154, n. 3, p. 557-568, June 2008.

- WARRISS, P. D. The growth and body composition of animals. In: _____. **Meat science**: an introductory text. New York: CABI, 2000. chap. 2, p. 12-32.
- WEGNER, J. et al. Growth and breed-related changes of muscle fibre characteristics in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 1485-1496, June 2000.
- WELCH, C. M. et al. An examination of the association of serum IGF-I concentration, potential candidate genes, and fiber type composition with variation in residual feed intake in progeny of Red Angus sires divergent for maintenance energy EPD. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 12, p. 5626-5636, Dec. 2013.
- WHIPPLE, G. M. et al. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos Taurus and Bos indicus cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2716-2728, Sept. 1990.
- XI, G. et al. Localization of insulin-like growth factor (IGFBP)-3 in cultured porcine embryonic myogenic cells before and after TGF- β treatment. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 33, n. 4, p. 422-429, Nov. 2007.
- XU, Q. et al. Evidence that IGF Binding Protein-5 functions as a ligand-independent transcriptional regulator in vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, Baltimore, v. 94, n. 5, p. 46-54, Mar. 2004.
- YANG, W. et al. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-3 β pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 6, p. 3799-3808, Feb. 2007.
- YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiological Reviews**, Washington, v. 93, n. 1, p. 23-67, Jan. 2013.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 Expression of genes related to the regulation of muscle protein turnover in Angus and Nelore bulls

Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Animal Science

ABSTRACT

We aimed to evaluate the expression of genes related to the regulation of muscle protein turnover in the *Longissimus dorsi* (LD) of Angus (A) and Nellore (N) bulls, and to estimate the within breed correlations of gene expression and performance traits. Thirteen genes and transcription factors related to the IGF-1 and myostatin pathways were studied. Thirteen animals from each breed, with initial average live weight of 381.2 ± 11.8 kg were used in a completely randomized 2 x 2 factorial design (two breeds and two feeding levels). The diet consisted of corn silage and a corn-soybean meal concentrate in a roughage to concentrate ratio of 30:70. The treatments were *ad libitum* feeding (AL, with nine animals from each breed) or restriction (R, a 55% restriction of total DMI of AL animals, calculated as percentage of metabolic BW, with four animals of each breed). The experimental period lasted for 82 days and it was preceded by a 28-day adaptation period. The performance traits evaluated were slaughter BW (SBW), total ADG (ADG_t, from the beginning to the end of the trial), initial ADG (ADG_i, from the beginning of the trial to mid-trial), final ADG (ADG_f, from mid-trial to the end of the trial), HCW, LD weight (LDW) and rib eye area (REA). After slaughter, samples were taken from the LD muscle between the 12th and 13th ribs for gene expression analysis by quantitative reverse transcription PCR. There was no difference ($P > 0.05$) in the expression of any of the genes studied between AAL and NAL, while feed restriction increased the expression of IGF-1 receptor (IGF1R, $P < 0.001$), muscle ring finger 1 (MuRF1, $P = 0.05$) and mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3, $P = 0.04$), and decreased the expression of IGFBP5 ($P < 0.01$). The REA was negatively correlated to glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β , $P = 0.01$), to myostatin (MSTN, $P = 0.02$) and to MuRF1 ($P = 0.05$). The HCW was negatively correlated to GSK3 β ($P = 0.01$), to MSTN ($P = 0.01$) and tended to be negatively correlated to IGFBP5 ($P = 0.07$), while the LDW tended to be negatively correlated to GSK3 β ($P = 0.08$). The genes MuRF1, Smad3 and IGFBP5 seem to be important for muscle growth, and may be worthy of further investigation as future strategies for increasing muscle in livestock.

Key-words: *Bos indicus*, *Bos Taurus*, IGF-1, mRNA, myostatin.

INTRODUCTION

Muscle protein turnover (MPT) is the balance between protein synthesis and protein degradation within the muscle fibers, and when positive, results in protein accretion and muscle growth (Schiaffino et al., 2013). In addition, MPT rates in the later stages of the production cycle before slaughter have also been regarded as an important factor affecting meat tenderization process post mortem (Lawrence and Fowler, 2002; Andersen et al., 2005; Therkildsen et al., 2005). Thus, elucidating the factors that regulate MPT would allow for advantageous manipulation of this process, leading to significant improvements in both, production efficiency and meat quality.

Two major signaling pathways control MPT *in vivo*, the IGF-1/protein kinase B (IGF-1/AKT) pathway, acting as a positive regulator, and the myostatin pathway, acting as a negative regulator (Schiaffino et al., 2013). Genetic variation also influences MPT rates, and differences in protein turnover may explain part of the inherent differences in efficiency and growth of different genotypes (Oddy et al., 1995, 1998). This could be the case for Angus and Nellore cattle, as in fact, zebuine cattle have lower rates of protein turnover than taurine (Sainz et al., 2006). In addition, nutritional status has a major impact on the rate of MPT, and in cattle and porcine, feed restriction seems to up-regulate the expression of genes related to protein turnover (da Costa 2004; Byrne et al., 2005).

Our hypothesis is that feed restriction or genotype might affect mRNA levels of genes involved in protein synthesis and degradation. Therefore, the objective of the present study was to measure the expression of genes and transcription factors related to the IGF-1 and myostatin pathways, in Angus and Nellore bulls during the finishing phase and to estimate the correlation between gene expression and carcass traits.

MATERIAL AND METHODS

All animal procedures were approved by the Universidade Federal de Lavras Animal Care and Use Committee, protocol number 048/12 and followed established standards for humane care and use.

Animals, diet and slaughter

The study was performed at the Beef Cattle facility and the Plant Molecular Physiology Laboratory, both located at the Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. A total of 13 Aberdeen Angus and 13 Nellore young bulls with an average initial body weight of 381.2 ± 11.8 kg were used in a completely randomized factorial experiment with two breeds and two feeding levels.

The diet consisted of corn silage and a corn-soybean meal concentrate in a roughage to concentrate ratio of 30:70 (Table 1). All animals received the same diet, twice a day (0730 and 1530 h) varying only the amount offered: *ad libitum* (AL) or restriction (R, a 55% restriction of total DM intake of AL animals, calculated as percentage of metabolic BW). Nine bulls from each breed were allocated to the AL treatment, while the remaining ones were allocated to the R treatment. Intake of AL animals was measured daily, so that adjustments on the intake of R treatment could be done once a week. All animals were weighed every 28d, after 16h of fasting.

The herd was housed in individual pens of 6.0 m² each, adjacent to each other, with individual feed and a common water trough for every two pens. A 28 d adaptation period was used to adapt animals to diets and facilities, and the experimental period lasted for 82 d, after which all animals were slaughtered by cerebral concussion and exsanguination, followed by hide removal and evisceration.

Samples for gene expression were collected from the Longissimus dorsi (LD) muscle between the 12th and 13th ribs of each animal, immediately after slaughter. All instruments used for the tissue collection were sterile. The muscle samples were washed with a 0.9% NaCl physiological solution, wrapped in aluminum foil, frozen and transported in liquid nitrogen and stored at -80°C .

The performance traits evaluated were slaughter BW (SBW), HCW, rib eye area (REA), LD weight (LDW, expressed as percentage of HCW), total ADG (ADGt, from the beginning to the end of the trial), initial ADG (ADGi, from the beginning of the trial to mid-trial), final ADG (ADGf, from mid-trial to the end of the trial). The REA was measured as the cross-section of the LD between the 12th and 13th ribs. The CS was traced directly onto acetate paper and the REA was determined as the sum of all 1cm²-squares of a reticulated grid found inside the CS perimeter.

Gene expression analysis

The genes studied were: *IGF-1 receptor (IGF1R)*, *eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)*, *ribosomal protein S6 kinase (p70S6K)*, *glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)*, *IGFBP3*, *IGFBP5*, *forkhead box O1 and O3 (FOXO1 and FOXO3)*, *muscle ring finger 1 (MuRF1)* and *atrogin 1*, from the IGF-1 pathway, and *myostatin (MSTN)*, *mothers against decapentaplegic homolog 2 and 3 (Smad2 and Smad3)* from the MSTN pathway.

Sequences published in the GenBank, a National Center for Biotechnology Information (NCBI) platform, were used to design primers for the reference and target genes. The open reading frames (ORF) and conserved domains of the selected sequences were obtained using the ORFinder and Conserved Domain Database tools from NCBI. The primers (Table 2) were designed using the OligoPerfect Designer software (Life Technologies, Grand Island, USA). The PCR primers were commercially synthesized (Life

Technologies, São Paulo, BR) and reconstituted to a final concentration of 10 μmol .

Total RNA was extracted from the LD muscle using RNeasy Total RNA Kit (QIAGEN, Valencia, USA) and to remove any possible contaminating genomic DNA, samples were treated with DNA-free DNase (Ambion, Austin, USA) according to the manufacturer's instructions.

To check the quantity ($\text{ng}/\mu\text{l}$) and quality (A260/280, A260/230) of total RNA, a NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) was used. The integrity of RNA was verified through the presence of bands corresponding to 18S and 28S ribosomal RNAs after electrophoresis in a 1.0% agarose gel, stained with GelRed nucleic acid gel stain (Biotium, Hayward, USA), and visualized with a UVIttec FireReader XS D-77Ls-20M (UVIttec, Cambridge, UK).

Total RNA was then reversed transcribed to cDNA using the High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's instructions, and samples were stored at -20°C .

The amplification efficiency of target and reference genes was obtained using a 10-fold serial dilution of cDNA and generation of a standard curve. All PCR coefficients were between 0.9 and 1.0, and therefore considered acceptable (Table 2). Primer specificity was confirmed by melting curve analysis and by electrophoresis of the quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) products on a 1% agarose gel, resulting in a single band for each primer pair.

The gene expression analysis by RT-qPCR was carried out using SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, Grand Island, USA) in a ABI PRISM 7500 Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems, Foster City, USA) with the following cycling parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min, and 95°C for 15 sec. For each reaction 1.0 μl of cDNA (5 $\text{ng}/\mu\text{l}$) and 5 μl of SYBR Green Master Mix were

used. The amount of primer was optimized for each gene (Table 2) and sterile ultrapure water was added to a final volume of 10 μ l/reaction. Measurements were performed in triplicate. Data were collected and analyzed with the 7500 Fast Software (version 2.1, Applied Biosystems).

Three endogenous genes were tested, *ubiquitin*, *β -actin* and *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, but according to Normfinder program (<http://moma.dk/normfinder-software/normfinder-faq>), the best expression stability was achieved by the combination of *ubiquitin* and *β -actin*, so the geometric mean of the threshold cycle (Ct) values, as suggested by Vandesompele et al. (2002) was used to normalize the expression level of each target gene. The relative expression of target genes was obtained by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

As proposed by Steibel et al., 2009, a mixed linear model was fitted for the analysis of the target genes, using the mixed procedure of SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

$$Y_{ijkl} = BDG_{ijk} + A_{(ij)l} + D_{ijk} + e_{ijkl}$$

Where Y is the Ct obtained from the thermocycler software for gene k in the rth well of the plate (referring to the technical replicate) in a sample obtained from animal l of the breed j (Angus or Nellore) and diet i (AL or R). The factor BDG_{ijk} modeled the interaction of breed i and diet j with each gene k. $A_{(ij)k}$ is the random effect of animal l within the interaction between breed i and diet j, and D_{ijk} is a random sampling specific effect accounting for technical replicates in qPCR.

Significant average differences ($P < 0.05$) between breeds and diets were evaluated by performing a Tukey test after ANOVA using PROC GLM from SAS 9.3. The Pearson correlation coefficients were calculated using the PROC

CORR from SAS 9.3. The correlation analyses were based on individual values and were independent of breed, and only data from AL animals were used. For estimating differences in ADG between treatments at each period (initial and final) the PROC MIXED from SAS 9.3 was applied, in a model including breed and treatment as fixed effects and animal as random effect.

RESULTS AND DISCUSSION

There was a breed and diet interaction for the expression of *IGF1R* (Table 3), in which there was no difference between AAL and NAL, and restricted fed animals had a higher expression than the AL ones, with NR showing the highest levels. Ferraz (2009) also found no differences in the expression of *IGF1R* when comparing Angus and Nellore bulls neither at 15 or 19 mo of age. The higher expression in the restriction treatments could represent a response of skeletal muscle to low plasma levels of IGF-1. Most animals that are restricted fed show increased plasma levels of GH, but the attachment of GH with liver receptors is reduced. The liver is the main organ producing IGF-1. Consequently, during feed restriction, plasma IGF-1 concentration decreases drastically due to lower GH receptor availability (Hornick et al., 2000), and this GH resistance in poorly fed animals seems to represent a mechanism for preferential utilization of mobilized substrates to maintain homeostasis rather than cell growth and proliferation (Breier et al., 2000). In agreement with this, the studies of Costello et al. (2008) and Micke et al. (2011) found that maternal undernutrition during gestation led to increased *IGF1R* mRNA in the muscle of the progeny.

IGF-1 is one of the most important hormones involved in growth processes (Hornick et al., 2000). Its actions are mediated by binding to IGF1R and signaling through the IGF-1/AKT pathway, the major pathway regulating protein synthesis in skeletal muscle (Schiaffino et al., 2013). Once activated,

AKT phosphorylates an array of substrates. One of these substrates is the mammalian target of rapamycin (mTOR; Rommel et al., 2001). Activated mTOR stimulates protein synthesis by phosphorylating and activating p70S6K, which in turn activates other factors involved in translation initiation and elongation (Schiaffino and Mammucari, 2011). mTOR also activates eIF4E, a translational initiation factor that facilitates the binding of mRNA to the ribosome (Kawasome et al., 1998), by inhibiting the eIF4E binding proteins (Schiaffino and Mammucari, 2011).

There was no breed or diet effect in the expression of either *p70S6K* or *eIF4E* (Table 3), but these two genes were positively correlated (Table 5). Contrasting to our results, Ferraz 2009 found a greater expression of *eIF4E* in Angus than in Nellore bulls with 15 mo of age, which could indicate a greater importance of this gene in earlier stages of growth. In addition to that, the activity of eIF4E and p70S6K was decreased in piglets with decreased BW, LDW and muscle fiber cross sectional area (CSA), when compared to control piglets (Liu et al., 2015). So the fact that no differences were found between breed or diet for LDW (Table 4), could be related to the absence of changes in the expression of genes related to protein synthesis observed in this study. Also, there was no difference between ADGi and ADGf for Angus ($P = 0.97$), while ADGf was greater than ADGi for Nellore ($P = 0.01$) and restricted fed animals ($P = 0.006$). So the higher growth rate in the second half of the trial of NAL, NR and AR could have increased the expression of *p70S6K* and *eIF4E* in these animals and, because gene expression was accessed only at slaughter, no difference was detected in relation to AAL.

Another AKT substrate is GSK3 β . AKT phosphorylates and inactivates GSK3 β , releasing its inhibition on eukariotic translation initiation factor 2B (eIF2B), thus, blockade of GSK3 β by AKT promotes translation initiation and protein synthesis (Schiaffino and Mammucari, 2011). Both inactivation and

pharmacological inhibition of GSK3 β induced dramatic hypertrophy in skeletal myotubes (Rommel et al. 2001; Vyas et al. 2002). While no differences were seen in the expression of *GSK3 β* in any of the treatments studied (Table 3), *GSK3 β* was negatively correlated to the HCW and REA, and tended to be negatively correlated to LDW (Table 5), which is in agreement with its effect as a translation repressor. Sadkowski et al. (2009) comparing beef and dairy breeds, found that the expression of *GSK3 β* was significantly down-regulated in the muscle of 12 mo old Limousin as compared to Holstein bulls, indicating a possible role for GSK3 β in the difference in muscularity between the two lines. More recently it has been found that GSK3 β can also positively regulate p70S6K activity (Shin et al., 2011), as well as inactivate eIF4E binding protein 1, thereby increasing eIF4E-dependent protein synthesis (Shin et al., 2014), and in fact, *GSK3 β* was positively correlated to *eIF4E* and tended to be positively correlated to *p70S6K* (Table 5) in this study.

Besides stimulating protein synthesis, AKT can also prevent protein degradation in skeletal muscle, by inhibiting the transcription factors, FOXO1 and FOXO3. FOXO factors shuttle between the nucleus and cytoplasm, and when phosphorylated are sequestered in the cytoplasm, away from their targets (Sandri et al., 2004). They regulate the expression of two muscle specific ubiquitin E3 ligases, atrogen 1 and MuRF1 (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004). E3 ligases are the enzymes responsible for targeting muscle proteins for degradation through the ubiquitin-proteasome, the system responsible for the degradation of 80 to 90% of all proteins in a cell (Goll et al., 2008). FOXO3 can directly bind and activate the *atrogen 1* and *MuRF1* promoters (Raffaello et al., 2010), while FOXO1 can activate *MuRF1* promoter when associated with glucocorticoid receptor (Waddell et al., 2008). Both *atrogen 1* and *MuRF1* are expressed at relative low levels in resting muscles, but transcriptionally increased under a variety of muscle atrophy-inducing conditions (Bodine et al., 2001).

We found no breed or diet effect on the expression of *FOXO1*, *FOXO3* and *atrogen 1*, while the expression of *MuRF1* was greater in restricted fed bulls (Table 3), suggesting greater protein degradation through the ubiquitin-proteasome system in these animals. Since the highest rates of protein degradation occur during periods of most rapid growth and protein deposition (Baracos 2005), and restricted fed animals were gaining weight at the time of tissue collection, this increased protein degradation suggests increased protein turnover, which is in agreement with the studies of da Costa (2004) and Byrne et al. (2005), who found that feed restriction up-regulated the expression of genes related to protein turnover.

Cohen et al. (2009) have found evidence of a direct role of MuRF1 at the initial steps of muscle protein turnover, in the disassembly and degradation of myofibrillar protein components, a role believed so far, to be played only by the calpains (Goll et al., 2008). Thick, but not thin filaments of the myofibrils are affected by MuRF1 (McELhinny et al., 2002; Clarke et al., 2007 and Cohen et al., 2009). McELhinny et al. (2002) also detected MuRF1 in the nuclei of myocytes, and proposed a nuclear function, potentially in the control of muscle gene expression, implicating MuRF1 as having an important role in regulating muscle growth. *MuRF1* was negatively correlated to REA (Table 5), which is in line with its role on protein degradation, positively correlated to *eIF4E* (Table 5), which could indicate a feedback mechanism between protein synthesis and degradation pathways, and tended to be positively correlated to *GSK3 β* (Table 5), which is in agreement with the work of Verhees et al. (2011) who found that GSK3 β could control basal and atrophy-induced expression of *atrogen 1* and *MuRF1*.

MSTN is the second major pathway regulating muscle growth, acting as a negative regulator (Schiaffino et al., 2013). MSTN binding to its receptor results in the activation of Smad2 and Smad3 transcription factors that then

translocate to the nucleus to control the expression of genes regulating muscle growth (Ge et al., 2011). Smad2 and Smad3 have an additive effect and seem to mediate MSTN inhibition of AKT (Sartori et al., 2009; Trendelenburg et al., 2009), resulting in reduced protein synthesis (Amirouche et al., 2009; Sartori et al., 2009) and increased protein degradation (McFarlane et al., 2006). In fact, high levels of MSTN, both *in vivo* and *in vitro* have been associated with decreased activity of AKT, up-regulation of atrogen 1 and MuRF1, as well as FOXO1 and FOXO3 (Lokireddy et al., 2011a and 2011b, McFarlane et al., 2006). There was no difference in the expression of *MSTN* and *Smad2*, while the expression of *Smad3* was up-regulated in restricted fed animals (Table 3). Feed restriction also did not alter the expression of *MSTN* in the LD Muscle of Korean cattle steers (Kang et al., 2015), while overexpression of Smad3 in mice markedly prevented skeletal muscle growth, decreased muscle fiber CSA, as well as inhibited protein synthesis by suppressing AKT/mTOR/p70S6K signaling (Winbanks et al., 2012; Goodman et al., 2013). So, as for *MuRF1*, increased expression of *Smad3* in NR and AR suggests increased protein turnover in these animals. Goodman et al. (2013) also found that Smad3 could stimulate *atrogen 1* promoter activity, and in fact *Smad3* tended to be positively correlated to *atrogen 1* and was positively correlated to *MuRF1* (Table 5).

We also found that *MSTN* was positively correlated to *Smad2* and *Smad3* (Table 5), and that *MSTN* and *Smad2* were positively correlated, while *Smad3* tended to be positively correlated to *GSK3 β* , which is in accordance to the study of Yang et al. (2007), who found that MSTN can activate GSK3 β . And in line with its role as a negative regulator of growth, *MSTN* was negatively correlated to REA and HCW (Table 5).

Besides Smad2 and Smad3, IGFBP3 and IGFBP5, have been implicated as mediators of MSTN effects (Kamanga-Sollo et al., 2003, 2005). IGFBP3 can stimulate phosphorylation of Smad2 and Smad3, and can potentiate growth

inhibition caused by transforming growth factor beta1 (TGF- β 1, a factor from the same family as MSTN)(Fanayan et al., 2000). Both IGFBP5 and IGFBP3 can translocate to the nucleus and interact with transcription regulators (Xu et al., 2004; Oufattole et al., 2006), and since TGF- β 1 stimulates IGFBP3 nuclear translocation (Xi et al., 2007), this nuclear localization of IGFBP3 and IGFBP5 may play a role in the growth suppressing actions of TGF- β family in muscle. While no difference was found on the expression of *IGFBP3*, there was a breed and diet interaction on the expression of *IGFBP5* (Table 3). In mice, decreased levels of *IGFBP5* mRNA were associated with muscle hypertrophy (Awede et al., 1999), while *IGFBP5* overexpression resulted in whole-body growth inhibition, with the magnitude of the response being positively correlated with *IGFBP5* mRNA expression (Salih et al., 2004). In agreement with Salih et al. (2004), NR had the lowest *IGFBP5* mRNA levels and the highest increase in growth rate in the second half of the trial, and in fact, *IGFBP5* tended to be negatively correlated to HCW (Table 5).

Corroborating with a possible negative effect of IGFBP5 on growth, Welch et al. (2013) obtained that the expression of *IGFBP5* was greater in high residual feed intake Angus steers (less efficient) than in low residual feed intake ones (more efficient), while Sadkowski et al. (2009) found that *IGFBP3* was up-regulated and *IGFBP5* was down-regulated in the muscle of Limousin bulls in comparison with Holstein, and proposed that the higher *IGFBP3:IGFBP5* ratio in Limousin would facilitate muscle differentiation in this breed.

In conclusion, even though IGF-1 and MSTN pathways have been recognized as major regulators of muscle mass and metabolism, their mechanism of action and interconnections remain to be established. No breed effects were found on the expression of any of the genes studied, while feed restriction increased the expression of *MuRF1*, *Smad3* and *IGF1R*, and decreased the expression of *IGFBP5*. Since the role of IGFBP5 in growth has

not been established yet, and new functions have been found for Smad3 and MuRF1, these genes may be worthy of further investigation in terms of their potential role in regulating energetic efficiency in muscle and as future strategies for increasing muscle in livestock.

LITERATURE CITED

- Amirouche, A., A. Durieux, S. Banzet, N. Koulmann, R. Bonnefoy, C. Mouret, X. Bigard, A. Peinnequin, and D. Freyssenet. 2009. Down-Regulation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Response to Myostatin Overexpression in Skeletal Muscle. *Endocrinology*. 150: 286-294. doi: 10.1210/en.2008-0959.
- Andersen, H. J., N. Oksbjerg, J. F. Young, and M. Therkildsen. 2005. Feeding and meat quality – A future approach. *Meat Sci*. 70:543-554. doi:10.1016/j.meatsci.2004.07.015.
- Awede, B., J. Thissen, P. Gailly, and J. Lebacqz. 1999. Regulation of IGF-I, IGFBP-4 and IGFBP-5 gene expression by loading in mouse skeletal muscle. *FEBS Lett*. 46:263-267.
- Baracos, V. E. 2005. Whole animal and tissue proteolysis. In: D.G. Burrin and H.J. Mersmann, editors, *Biology of Metabolism in Growing Animals*. Elsevier, London, England. p. 69-82.
- Bodine, S.C., E. Latres, S. Baumhueter, V. K. M. Lai, L. Nunez, B. A. Clarke, W. T. Poueymirou, F. J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z. Q. Pan, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, D. J. Glass. 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 294:1704-1708.
- Breier, B.H., M. H. OLIVER, B. W. GALLAHER. 2000. Regulation of Growth and Metabolism During Postnatal Development. In: P. B. Cronjé, E. A. Boomker, P. H. Henning, W. Schultheiss, J. G. van der Walt, editors, *Ruminant Physiology- Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. CAB International, New York, NY. p. 187-204.

- Byrne, K. A., Y. H. Wang, S. A. Lehnert, G. S. Harper, S. M. McWilliam, H. L. Bruce, and A. Reverter. 2005. Gene expression profiling of muscle tissue in Brahman steers during nutritional restriction. *J. Anim. Sci.* 83:1-12.
- Clarke, B.A., D. Drujan, M. S. Willis, L. O. Murphy, R. A. Corpina, E. Burova, S. V. Rakhilin, T. N. Stitt, C. Patterson, E. Latres, and D. J. Glass. 2007. The E3 Ligase MuRF1 Degrades Myosin Heavy Chain Protein in Dexamethasone-Treated Skeletal Muscle. *Cell. Metab.* 6:376-385.
- Cohen, S., J. J. Brault, S. P. Gygi, D. J. Glass, D. M. Valenzuela, C. Gartner, E. Latres, and A. L. Goldberg. 2009. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J. Cell Biol.* 185:1083-1095. doi: 10.1083/jcb.200901052.
- Costello, P.M., A. Rowelerson, N. A. Astaman, F. E. W. Anthony, A. A. Sayer, C. Cooper, M. A. Hanson, and L. R. Green. 2008. Peri-implantation and late gestation maternal undernutrition differentially affect fetal sheep skeletal muscle development. *J. Physiol.* 586:2371-2379. doi: 10.1113/jphysiol.2008.150987.
- da Costa, N., C. McGillivray, Q. Bai, J. D. Wood, G. Evans, and K. C. Chang. 2004. Restriction of Dietary Energy and Protein Induces Molecular Changes in Young Porcine Skeletal Muscles. *J. Nutr.* 134:2191-2199.
- Fanayan, S., S. M. Firth, A. J. Butt, and R. C. Baxter. 2000. Growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-3 in T47D breast cancer cells requires transforming growth factor-beta (TGF-beta) and the type II TGF-beta receptor. *J. Biol. Chem.* 275:39146-39151.
- Ferraz, A. L. J. 2009. Gene expression analysis in the skeletal muscle of Nellore and Aberdeen Angus breeds and its relationship with muscle growth and meat tenderness. PhD Diss. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- Ge, X., C. McFarlane, A. Vajjala, S. Lokireddy, N. Z. Hui, C. K. Tan, N. S. Tan, W. Wahli, M. Sharma, and R. Kambadur. 2011. Smad3 signaling is required for satellite cell function and myogenic differentiation of myoblasts. *Cell Res.* 21:1591-1604. doi: 10.1038/cr.2011.72.
- Goll, D.E.; G. Neti, S. W. Mares, and V. F. Thompson. 2008. Myofibrillar protein turnover: The proteasome and the calpains. *J. Anim. Sci.* 86 (Suppl. 14):E19-E35.
- Goodman, C.A., R. M. McNally, F. M. Hoffmann, and T. A. Hornberger. 2013. Smad3 Induces Atrogin-1, Inhibits mTOR and Protein Synthesis, and Promotes Muscle Atrophy In Vivo. *Mol. Endocrinol.* 27:1946–1957. doi: 10.1210/me.2013-1194.
- Hornick, J.L., C. Van Eenaeme, O. Gérard, I. Dufrasne, and L. Istasse. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19:121-132.
- Kamanga-Sollo, E., M. S. Pampusch, M. E. White, M. R. Hathaway, and W. R. Dayton. 2005. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 mediate TGF- β - and myostatin induced suppression of proliferation in porcine embryonic myogenic cell cultures. *Exp. Cell Res.* 311:167-176.
- Kamanga-Sollo, E., M. S. Pampusch, M. E. White, and W. R. Dayton. 2003. Role of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 in TGF- β - and GDF-8 (myostatin)-induced suppression of proliferation in porcine embryonic myogenic cell cultures. *J. Cell Physiol.* 197:225–231.
- Kang, H.J., N. H. Trang, and M. Baik. 2015. Effects of Dietary Restriction on the Expression of Lipid Metabolism and Growth Hormone Signaling Genes in the Longissimus dorsi Muscle of Korean Cattle Steers. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 28:1187-1193.
- Kawasome, H., P. Papst, S. Webb, G. M. Keller, G. L. Johnson, E. W. Gelfand, and N. Terada. 1998. Targeted disruption of p70s6k defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:5033–5038.

- Lawrence, T. L. J. and V. R. Fowler. 2002. Tissues: Growth and Structure Relative to Product Value for Human Consumption. In: Growth of Farm Animals. CABI Publishing, New York, NY. p 86-101.
- Liu, X., S. Pan, X. Li, Q. Sun, X. Yang, R. Zhao. 2015. Maternal low-protein diet affects myostatin signaling and protein synthesis in skeletal muscle of offspring piglets at weaning stage. *Eur. J. Nutr.* 54:971–979. doi: 10.1007/s00394-014-0773-1.
- Livak, K.J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻[Delta][Delta]CT Method. *Methods*, 25:402-408.
- Lokireddy, S., C. McFarlane, X. Ge, H. Zhang, S. K. Sze, M. Sharma, and R. Kambadur. 2011a. Myostatin Induces Degradation of Sarcomeric Proteins through a Smad3 Signaling Mechanism During Skeletal Muscle Wasting. *Mol. Endocrinol.* 25:1936-1949. doi: 10.1210/me.2011-1124.
- Lokireddy, S., V. Mouly, G. Butler-Browne, P.D. Gluckman, M. Sharma, R. Kambadur, and C. McFarlane. 2011b. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301:C1316-C1324. doi: 10.1152/ajpcell.00114.2011.
- McElhinny, A.S., K. Kakinuma, H. Sorimachi, S. Labeit, and C. C. Gregorio. 2002. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J. Cell Biol.* 157:125–136.
- McFARLANE, C., E. PLUMMER, M. THOMAS, A. HENNEBRY, M. ASHBY, N. LING, H. SMITH, M. SHARMA, and A. KAMBADUR. 2006. Myostatin Induces Cachexia by Activating the Ubiquitin Proteolytic System Through an NF- κ B-Independent, FoxO1-Dependent Mechanism. *J. Cell Physiol.* 209:501–514.
- Micke, G. C., T. M. Sullivan, I. C. McMillen, S. Gentili, V. E. A. Perry. 2011. Protein intake during gestation affects postnatal bovine skeletal muscle growth and relative expression of IGF1, IGF1R, IGF2 and IGF2R. *Mol. Cell Endocrinol.* 332:234–241. doi: 10.1016/j.mce.2010.10.018.

- Oddy V.H., P. A. Speck, H. M. Warren and P. C. Wynn. 1995. Protein metabolism in lambs from lines divergently selected for weaning weight. *J. Agric. Sci.* 124:129–137. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0021859600071331>.
- Oddy, V. H., R. M. Herd, M. B. McDonagh, R. Woodgate, C. A. Quinn, and K. Zirkler. 1998. Effect of divergent selection for yearling growth rate on protein metabolism in hind-limb muscle and whole body of Angus cattle. *Livest. Sci.* 56:225-231. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00153-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00153-5)
- Oufattole, M.; S. W. J. Lin, B. Liu, D. Mascarenhas, P. Cohen, and B. D. Rodgers. 2006. Ribonucleic Acid Polymerase II Binding Subunit 3 (Rpb3), a Potential Nuclear Target of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3. *Endocrinology*. 147:2138-2146.
- Raffaello, A., G. Milan, E. Masiero, S. Carnio, D. Lee, G. Lanfranchi, A. L. Goldberg, and M. Sandri. 2010. JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. *J. Cell. Biol.* 191:101-13. doi: 10.1083/jcb.201001136.
- Rommel C., S. C. Bodine, B. A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass. 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI3K/Akt/mTOR and PI3K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* 3:1009-1013.
- Sadkowski, T., M. Jank, L. Zwierzchowski, J. Oprzadek, J. and T. Motyl. Comparison of skeletal muscle transcriptional profiles in dairy and beef breeds bulls. 2009. *J. Appl. Genet.* 50:109-123. doi: 10.1007/BF03195662.
- Sainz, R. D., L. G. Barioni, P. V. Paulino, S. C. Valadares Filho, and J. W. Oltjen. 2006. Growth patterns of Nellore vs British beef cattle breeds assessed using a dynamic, mechanistic model of cattle growth and composition. In: E. Kebreab, J. Dijkstra, A. Bannink, W. J. J. Gerrits, and J. France, editors, *Nutrient digestion and utilization in farm animals: modelling approaches*. Cabi Publishing, Wallingford, England. p. 160-170.

- Salih, D.A., G. Tripathi, C. Holding, T. A. Szestak, M. I. Gonzales, E. J. Carter, L. J. Cobb, J. E. Eisemann, and J. M. PELL. 2004. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:4314-4319.
- Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S. H. Lecker, and A. L. Goldberg. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 117:399-412.
- Sartori, R.; G. Milan, M. Patron, C. Mammucari, B. Blaauw, R. Abraham, M. Sandri. 2009. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296:C1248-C1257. doi: 10.1152/ajpcell.00104.2009
- Schiaffino, S. and C. Mammucari. 2011. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet. Muscle.* 1:1-14. doi:10.1186/2044-5040-1-4
- Schiaffino, S., K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw, and M. Sandri. 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280:4294-314. doi: 10.1111/febs.12253.
- Shin, S., L. Wolgamott, Y. Yu, J. Blenis, and S. O. Yoon. 2011. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:E1204-13. doi: 10.1073/pnas.
- Shin, S., L. Wolgamott, J. Tcherkezian, S. Vallabhapurapu, Y. Yu, P. P. Roux, and S. O. Yoon. 2014. Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene.* 33:1690-9. doi: 10.1038/onc.2013.113.
- Steibel, J. P., R. Poletto, P. M. Coussens, and J. M. G. Rosa. 2009. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics.* 94:146-152. doi:10.1016/j.ygeno.2009.04.008

- Stitt, T. N., D. Drujan, B. A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyva, W. O. Kline, M. Gonzalez, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 14: 395-403.
- Therkildsen, M. Muscle protein degradation in bull calves with compensatory growth. 2005. *Livest. Prod. Sci.* 98:205-218.
- Trendelenburg, A. U., A. Meyer, D. Rohner, J. Boyle, S. Hatakeyama, and D. J. Glass. 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6 signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol*. 296:C1258-C1270. doi: 10.1152/ajpcell.00105.2009.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3:RESEARCH 0034.
- Verhees, K. J. P., A. M. W. J. Schols, M. C. J. M. Kelders, C. M. H. Op den Kamp, J. L. J. van der Velden, and R. C. J. Langen. 2011. Glycogen synthase kinase-3 β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 301:C995-C1007. doi: 10.1152/ajpcell.00520.2010.
- Vyas, D. R., E. E. Spangenburg, T. W. Abraha, T. E. Childs, and F. W. Booth. 2002. GSK-3 β negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. 283:C545-551.
- Waddell, D. S., L. M. Baehr, J. van den Brandt, S. A. Johnsen, H. M. Reichardt, J. D. Furlow, and S. C. Bodine. 2008. The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295:E785-E797. doi: 10.1152/ajpendo.00646.2007.

- Welch, C. M., K. J. Thornton, G. K. Murdoch, K. C. Chapalamadugu, C. S. Schneider, J. K. Ahola, J. B. Hall, W. J. Price, and R. A. Hill. 2013. An examination of the association of serum IGF-I concentration, potential candidate genes, and fiber type composition with variation in residual feed intake in progeny of Red Angus sires divergent for maintenance energy EPD. *J. Anim. Sci.* 91:5626-36. doi: 10.2527/jas.2013-6609.
- Winbanks, C.E., K. L. Weeks, R. E Thomson, P. V. Sepulveda, C. Beyer, H. Qian, J. L. Chen, J. M. Allen, G. I. Lancaster, M. A. Febbraio, C. A. Harrison, J. R. McMullen, J. S. Chamberlain, and P. Gregorevic. 2012. Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *J. Cell Biol.* 197:997-1008. doi: 10.1083/jcb.201109091.
- Yang, W., Y. Zhang, Y. Li, Z. Wu, D. Zhu. 2007. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-3 β pathway and is antagonized by Insulin-like Growth Factor 1. *J. Biol. Chem.* 282:3799-3808.
- Xi, G., M. R. Hathaway, M. E. White, and W. R. Dayton. 2007. Localization of insulin-like growth factor (IGFBP)-3 in cultured porcine embryonic myogenic cells before and after TGF-1 treatment. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33:422-429.
- Xu, Q., S. Li, Y. Zhao, T. J. Maures, P. Yin, and C. Duan. 2004. Evidence that IGF Binding Protein-5 functions as a ligand-independent transcriptional regulator in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 94:e46-e54.

Table 1. Ingredients and chemical composition of the diet

Dietary ingredient, %		Diet Composition, % of DM	
Corn Silage	30.0	DM	57.3
Cracked corn grain	58.0	CP	12.7
Soybean meal	10.0	NDF	32.3
Commercial premix ^a	2.0	NFC	48.3
		Starch	39.2
		EE	2.1
		ME (Mcal/kg DM)	2.54

^a Contained 170 g/kg Ca, 31 g/kg P, 155 g/kg Na, 2 mg/kg Zn, 2 mg; 396 mg/kg Cu, 515 mg/kg Mn, 15 mg/kg Co, 29 mg/kg I, 5.4 mg/kg Se, 111,000 IU Vit. A, 22,000 IU Vit. D3, 265 IU Vit. E.

Table 2. Efficiencies, sequences (5' to 3') and amount of primers used in the real-time PCR

Symbol	Forward (F) and Reverse (R)	Access number	Amplicon, bp	Amount, μ l	R^2	Efficiency
<i>IGF1R</i>	F TGCTGGACACCTACAACATCA R CAGTTCTCTCCTTGTGTCCAC	NM_001244612.1	90	0.3	0.993	95.35
<i>eIF4E</i>	F AAACCACCCCTACTCCGAAT R TGCCCATCTGTTCTGTAAAGG	NM_174310	113	1.0	0.929	99.92
<i>p70S6K</i>	F TTGAACCAAAAATCCGATCC R AGCACCTCTCCCCAGAAA	AY396564.1	101	0.5	0.928	98.16
<i>GSK3β</i>	F GCCCAGAACCACCTCCTTT R TGCTGCCATCTTTGTCTCTG	NM_001101310.1	95	0.3	0.982	99.25
<i>MSTN</i>	F AACAGCGAGCAGAAGGAAAA R TGGCTTCTAGTCTTGAGGATG	GQ184147.1	91	0.3	0.988	97.70
<i>IGFBP3</i>	F ACCCCATCCACACCAAGAT R TTCTGGGTGTCTGTGCTCTG	NM_174556.1	100	0.3	0.987	97.54
<i>IGFBP5</i>	F GCGGTCCTCCTTCTTCTG R GGCACATGGAGAGGGCTTT	NM_001105327.2	100	0.3	0.996	97.77
<i>Smad2</i>	F CCAGAGAGTTGAGACACCAGTTC R TGGAATGGAGTGGGTGTAGTC	NM_001046218.1	103	0.3	0.990	99.44
<i>Smad3</i>	F TCCCGAAAAACACTAACTTCC R TCCATCTTCACTCAGGTAGCC	NM_001205805.1	89	0.3	0.993	98.36
<i>FOXO1</i>	F CCGCAAAGATGGCTTCTACT R TGGTGACGAGAGAAGGTTGA	XM_002691748.3	98	0.32	0.976	98.95
<i>FOXO3</i>	F ATTCCAACGCCAGCACAG R ATAGAGCATGGGGACAGTG	NM_001206083.1	104	0.3	0.989	95.05
<i>MuRF1</i>	F GGGACAGATGAGGAAGAGGA R CCTCATCATCGCCTTACTGG	NM_001046155.1	106	0.3	0.986	96.88
<i>Atrogin1</i>	F CCTTGAAGACCAGCAAAACA R AGACTTGCCGACTCTTTGGA	NM_001046155.1	94	0.3	0.994	97.44
<i>β-actin</i>	F GTCCACCTTCCAGCAGATGT R CAGTCCGCCTAGAAGCATTT	BC142413.1	90	0.1	0.994	93.24
<i>UBQ</i>	F TTCGATTCATTACAGGTC R CGTTCTCGATGGTGTCACTG	Z18245.1	99	1.0	0.998	96.95
<i>GAPDH</i>	F CGACTTCAACAGCGACACTC R TTGTCGTACCAGGAAATGAGC	NM_001034034.1	96	0.1	0.993	93.69

Table 3. Expression of genes and transcription factors related to the IGF-1 and MSTN pathways in the Longissimus dorsi muscle of Angus and Nellore bulls

Gene	Relative Expression				SEM		P-value		
	AAL	NAL	AR	NR	AL	R	Breed	Treatment	BxT
IGF1R	1.00	1.22	1.64	2.74	0.259	0.377	0.03	<.001	<.001
eIF4E	1.00	1.15	1.81	1.23	0.580	0.844	0.73	0.36	0.69
p70S6K	1.40	1.18	2.18	1.00	0.536	0.781	0.16	0.68	0.49
GSK3 β	0.98	1.15	1.21	1.00	0.209	0.303	0.93	0.80	0.55
FOXO1	1.37	1.00	0.92	1.60	0.481	0.700	0.69	0.91	0.53
FOXO3	1.16	1.08	0.90	1.00	0.405	0.589	0.95	0.51	0.90
MuRF1	1.00	1.18	1.33	1.92	0.315	0.459	0.18	0.05	0.14
Atrogin	1.00	1.04	1.25	1.26	0.322	0.468	0.89	0.29	0.75
MSTN	1.28	2.15	1.29	1.00	0.548	0.797	0.69	0.27	0.37
Smad2	1.08	0.96	1.13	1.00	0.214	0.312	0.38	0.72	0.80
Smad3	1.00	1.14	1.49	1.20	0.168	0.244	0.68	0.04	0.07
IGFBP3	1.12	1.00	1.34	1.36	0.360	0.524	0.82	0.29	0.72
IGFBP5	2.12	3.45	1.65	1.00	0.418	0.609	0.97	<.01	0.01

AAL = Angus *ad libitum*; NAL = Nellore *ad libitum*; AR = Angus restriction; NR = Nellore restriction, AL = *Ad libitum*; R = restriction; BxT = breed and treatment interaction; IGF1R = IGF-1 receptor; *eIF4E* = eukaryotic translation initiation factor 4E; *p70S6K* = ribosomal protein S6 kinase; *GSK3 β* = glycogen synthase kinase 3 β , *FOXO1* and *FOXO3* = forkhead box O1 and O3; *MuRF1* = muscle ring finger 1; *atrogin* = *atrogin 1*; *MSTN* = *myostatin*; *Smad2* and *Smad3* = *mothers against decapentaplegic homolog 2* and *3*.

Table 4. Performance traits of Angus and Nellore bulls

	Angus		Nellore		SEM		<i>P- value</i>				
	AL	R	AL	R	AL	R	Breed	Treatment	BxT	BxP	TxP
SBW, kg	544.1	454.0	472.1	418.6	15.11	23.70	0.01	<0.01	0.37	-	-
HCW, kg	315.5	261.0	278.5	247.2	9.04	13.56	0.04	<0.01	0.33	-	-
LDW, %	3.22	3.29	3.39	3.32	0.159	0.225	0.62	0.99	0.74	-	-
ADGt, kg	2.30	1.17	1.73	0.74	0.133	0.176	<0.01	<.0001	0.65	-	-
ADGi, kg	2.70	0.78	1.60	0.29	0.284	0.284	0.02	<.001	0.74	0.04	<0.01
ADGf, kg	2.13	1.50	2.03	1.11	0.282	0.282	0.02	<.001	0.74	0.04	<0.01

AL = *ad libitum*, R = restriction, BxT = breed and treatment interaction, BxP = breed and period interaction, TxP = treatment and period interaction. SBW = slaughter BW, LDW = *Longissimus dorsi* weight, expressed as %HCW, ADGt = total ADG, ADGi = initial ADG, ADGf = final ADG.

Table 5. Pearson correlation coefficients among gene expression in Longissimus dorsi muscle and performance traits

	eIF4E	p70S6K	GSK3 β	FOXO1	FOXO3	MuRF	Atrogin	MSTN	Smad2	Smad3	IGFBP3	IGFBP5	REA	HCW	LDW
IGF1R	0.31	-0.08	-0.06	0.28	0.10	0.27	0.55	-0.13	-0.21	0.40	0.30	-0.39	0.03	-0.02	-0.15
eIF4E	1	0.60**	0.48*	0.21	-0.54	0.68**	0.18	0.29	0.36	0.04	0.62	-0.41	-0.30	-0.23	0.02
p70S6K		1	0.43T	-0.36	-0.44	0.40	0.06	0.31	0.72	-0.21	0.27	-0.22	-0.26	-0.22	0.04
GSK			1	-0.24	-0.45	0.46T	-0.05	0.61**	0.49*	0.45T	0.32	0.12	-0.58**	-0.60**	-0.43T
FOXO1				1	0.02	-0.03	0.12	-0.26	-0.23	-0.01	0.23	-0.31	0.18	0.41	-0.05
FOXO3					1	-0.23	0.17	-0.24	-0.42	0.20	-0.14	0.29	0.24	0.23	0.08
MuRF						1	0.37	0.39	0.38	0.50*	0.52	-0.12	-0.48*	-0.40	-0.04
Atrogin							1	-0.10	0.25	0.42T	0.39	-0.34	0.32	0.35	0.32
MSTN								1	0.48*	0.48*	0.09	0.55*	-0.54*	-0.61**	0.03
Smad2									1	0.20	0.19	0.06	-0.20	-0.14	0.01
Smad3										1	0.20	0.30	-0.26	-0.35	-0.32
IGFBP3											1	-0.43	-0.07	-0.07	-0.08
IGFBP5												1	-0.39	-0.44T	0.01

Number of observations = 18. *P < 0.05, **P < 0.01. T = tendency (P<0.1). Significances are highlighted in bold letters. REA = rib eye area, LDW = LD weight, expressed as %HCW.

ANEXOS

ANEXO A - Protocolo da comissão de ética no uso de animais da Pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de Lavras



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

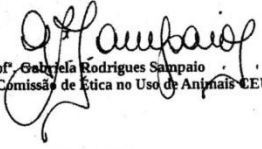
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 048/12, relativo ao projeto intitulado "Efeito de dietas sem volumoso na composição corporal, na eficiência de uso e energia e na emissão de metano em bovinos Nelore e Angus em confinamento", que tem como responsável Mário Luiz Chizzotti está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), tendo sido aprovado na reunião de 27/09/2012.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 048/12, related to the project entitled "Effect of high-grain diets on the body composition, efficiency of energy use and methane emissions of confined Nelore and Angus cattle", under the supervision of Mário Luiz Chizzotti, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), and was approved in September 27, 2012.

Lavras, 27 de setembro de 2012


Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br