

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO  
JEQUITINHONHA E MUCURI**

**LÚCIO FLÁVIO MACEDO MOTA**

**EXPRESSÃO DO GENE LEPTINA, PROTEÔMICA E MODELOS PARA  
ESTIMAÇÃO DO CAR EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE**

**DIAMANTINA – MG  
2014**

**LÚCIO FLÁVIO MACEDO MOTA**

**EXPRESSÃO DO GENE LEPTINA, PROTEÔMICA E MODELOS PARA ESTIMAÇÃO  
DO CAR EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Cristina Moreira Bonafé  
Coorientador: Prof. Aldrin Vieira Pires  
Prof. Heidge Fukumasu

DIAMANTINA – MG  
2014

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

Mota, Lúcio Flávio Macedo.

M917e Expressão do gene leptina, proteômica e modelos para estimação  
2015 do consumo alimentar residual (CAR) em animais da raça Nelore /  
Lúcio Flávio Macedo Mota. – Diamantina: UFVJM, 2015.  
94 p.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Moreira Bonafé

Coorientador: Prof. Dr. Aldrin Vieira Pires

Coorientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal dos Vales do  
Jequitinhonha e Mucuri. Faculdade de Ciências Agrárias. Mestrado -  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2014.

1. Crescimento. 2. Eficiência alimentar. 3. Metabolismo muscular.  
4. Proteômica. 5. Expressão gênica. I. Bonafé, Cristina Moreira. II.  
Pires, Aldrin Vieira. III. Fukumasu, Heidge. IV. Título.

**CDD 636.2085**

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LÚCIO FLÁVIO MACEDO MOTA

**EXPRESSÃO DO GENE LEPTINA, PROTEÔMICA E MODELOS PARA ESTIMAÇÃO DO CAR EM ANIMAIS DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA em 14/11/2014



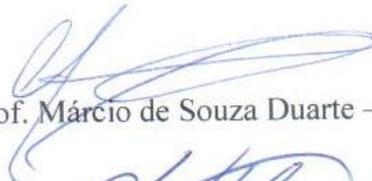
Prof.ª Cristina Moreira Bonafé – UFVJM  
Orientador



Prof. Aldrin Vieira Pires – UFVJM  
Coorientador



Prof.ª Erika Toriyama – UFF



Prof. Márcio de Souza Duarte – UFV



Prof. Severino Delmar Junqueira Villela - UFVJM

DIAMANTINA – MG  
2014

Aos meus pais e familiares que perto ou longe, estiveram sempre presentes, me apoiando e tornando possíveis as minhas conquistas. Obrigado por confiarem e acreditarem em mim. Mesmo passando por momentos difíceis, não desistiram pois sabiam que eu chegaria lá. Sem vocês eu não conseguiria!

Razão maior de minha existência e pelo exemplo de amor, confiança, incentivo e dedicação.

**Dedico**

## AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus pela vida e energia boa que traz paz e conforto, mesmo nos momentos mais difíceis, podendo aprender e conhecer as coisas deste mundo e possibilitar a realização de um grande sonho.

A toda minha família e a minha mãe Antonia da Conceição Macedo, por estar sempre ao meu lado. E a todos que de alguma forma sempre me apoiaram na construção deste sonho. Sou grato a todos, pessoas que ajudaram a formar minha personalidade e me ajudaram a ser uma pessoa melhor, obrigado por confiarem em mim.

Aos professores Aldrin Vieira Pires, Cristina Moreira Bonafé, Heidge Fukumasu e Erika Toryiama, por todo o apoio e principalmente pela confiança depositada em mim. Posso dizer que tive não um e sim vários ORIENTADORES, que estavam sempre preocupados com o desenvolvimento adequado do trabalho e mais ainda com a minha formação como profissional e pessoa melhor. Tenho muito a agradecer a todos pela força e apoio para o trabalho realizado sempre proporcionando oportunidades para que fosse realizado a proposta de trabalhar com a linha de pesquisa que foi proposta, importante participação para a concretização deste projeto.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Heidge Fukumasu pela oportunidade de realizar o trabalho que foi proposto e que sem o devido apoio não poderia ser realizado, por acreditar na pesquisa proposta e na parceria entre os grupos de pesquisa.

A todos da equipe de trabalho que ajudaram nas coletas de dados, pela dedicação e trabalho em equipe que foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho. A Pâmela Almeida Alexandre por sempre me ajudar nas dúvidas que tinha em relação ao experimento, e por ter me recebido para realizar o trabalho em parceria, contribuindo de forma direta para a realização deste.

Aos amigos do Nubiomol e Labtec que me ajudaram nas análises dando dicas, nos momentos do cafezinho, nas conversas sempre produtivas e tirando dúvidas sobre alguns procedimentos, meu sincero agradecimento. Em especial ao Edivaldo pelo apoio nas análises de proteômica e por sempre disponibilizar um tempo para nos ajudar nas análises e ao Walmir por me acompanhar e aconselhar nas análises de expressão gênica e pelas conversas no momento do cafezinho.

A professora Dr<sup>a</sup> Simone Eliza Facioni Guimaraes por me receber e disponibilizar o LABTEC para que fossem feitas as análises de expressão gênica.

A Erika Toriyama, agradeço a disposição para sanar as dúvidas, ensinamentos que foram passados e sem falar na ajuda nas análises do experimento, tendo me auxiliado com importante colaboração para a realização do projeto, pela amizade e pelas conversas.

Ao Adalfredo por ser mediador da proposta de trabalho junto ao grupo de pesquisa da FZEA/USP, que sem a ajuda não poderia ter sido realizado o trabalho referente à dissertação.

Aos colegas do grupo de melhoramento da UFVJM e colegas da pós-graduação pelo convívio, amizade, solidariedade, companheirismo no período do mestrado, nos momentos de trabalho que não foram poucos, mas que foram bons.

Há muito mais a quem agradecer. A todos aqueles que, não foram citados, me apoiaram e por suas presenças afetivas em inesquecíveis momentos, o meu reconhecimento e muito obrigado!

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização e elaboração desta pesquisa e que, portanto, fazem parte desta conquista, o meu agradecimento, respeito e gratidão.

A dissertação resultou de um importante trajeto, com apoio e estímulos de muitos. Os méritos devem ser atribuídos a todos que tornaram possível alcançar tal resultado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq pelo auxílio financeiro do projeto e à CAPES pela bolsa de mestrado.

## RESUMO

Mota, Lúcio Flávio Macedo. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, novembro de 2014. **Expressão do gene Leptina, proteômica e modelos para estimação do CAR em animais da raça Nelore.** Orientadora: Cristina Moreira Bonafé. Coorientadores: Aldrin Vieira Pires e Heidge Fukumasu. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

Objetivou-se avaliar a influência da expressão da leptina e relacionar as concentrações de leptina plasmática com as características de desenvolvimento corporal, mudanças no proteoma do músculo Longissimus dorsi e o impacto o modelo na estimação de equações de predição de consumo de alimentos em bovinos Nelore e no ranking de desempenho alimentar, utilizando diferentes modelos para a estimativa do consumo alimentar residual (CAR). Foi utilizado um total de 97 animais classificados para alto e baixo CAR, medidos para características de ingestão, crescimento, eficiência alimentar, concentração plasmática de leptina e características de carcaça. Foram abatidos 20 animais classificados para alto e baixo CAR e coletadas amostras do músculo Longissimus dorsi, para análise da expressão do gene leptina e proteômica. Os modelos utilizados para estimação do CAR foram o modelo atualmente em uso e modelos que incluíram medidas de ultrassom de músculo e espessura de gordura. As amostras de proteínas extraídas do músculo Longissimus dorsi foram separadas em duas etapas: a primeira etapa de separação das proteínas foi realizada por migração eletroforética em tira de IPG (Immobilized pH Gel) até o ponto isoelétrico; a segunda, realizada pela migração eletroforética das proteínas focalizadas na tira de IPG (primeira dimensão) e em seguida, em gel de acrilamida de acordo com o peso molecular (segunda dimensão). Após as análises dos géis 2-D, os spots diferencialmente expressos nos grupos de CAR foram excisados para análise por dessorção a laser, assistida por matriz MALDI TOF/TOF. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do SAS, as estimativas de correlação fenotípica, utilizando o procedimento CORR e a comparação dos valores de expressão entre as classes de CAR, utilizando o procedimento CONTRAST do procedimento MIXED. Animais classificados para baixo CAR apresentaram maior expressão do gene leptina (2,80) e maior concentração plasmática (11,48) deste gene em bovinos Nelore. Os níveis mais elevados de leptina podem estar envolvidos na redução da ingestão de alimentos em animais classificados para baixo CAR, indicando ser um regulador na diferença de consumo de alimentos pelos animais. Embora os modelos de CAR tenham apresentado diferenças na estimação, as correlações entre cada um dos modelos indicaram que estes não foram diferentes uns dos outros na classificação dos animais para eficiência alimentar. A maior expressão de fibras de contração lenta em bovinos mais eficientes ocorre devido a uma redução preferencial das fibras musculares de contração rápida, como uma adaptação para melhor lidar com a redução da exigência nutricional, por apresentar diferenças no perfil metabólico da contração muscular. No entanto, a variação na eficiência do modelo que inclui os parâmetros de composição corporal é muito importante, sugerindo que a composição corporal pode ser fundamental para explicar a variação no consumo de alimentos e que ele precisa ser incluído no modelo de cálculo do CAR.

**Palavras chave:** crescimento, eficiência alimentar, metabolismo muscular, proteômica, expressão gênica

## ABSTRACT

Mota, Lúcio Flávio Macedo. Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys, November 2014. **Leptin gene expression, proteomics and models to estimate RFI in Nelore breed animals.** Advisor: Cristina Moreira Bonafé. Co-advisors: Aldrin Vieira Pires and Heidge Fukumasu. Dissertation (Master's degree in Animal Sciences).

The objectives were to evaluate the effects of leptin expression and to correlate plasma leptin concentrations with corporal development traits, changes in proteomics of the Longissimus dorsi muscle, and the impact of the model approach in estimating predicting equations for feed intake in Nelore animals and in feed performance ranking using different models for the estimation of residual feed intake (RFI). A total of 97 animals, classified for high and low RFI, measured for intake, growth, feed efficiency, plasma leptin concentration, and carcass traits, was utilized. Twenty animals classified for high and low RFI were slaughtered, and Longissimus dorsi muscle was sampled to analyze leptin gene expression and proteomics. Models utilized for RFI estimation were the current model used, and models which included muscle ultrasound and fat thickness measurement. Protein samples of Longissimus dorsi muscle were separated into two stages: the first stage of proteins separation was performed by electrophoretic migration in IPG (Immobilized pH Gel) strip until the isoelectric point; the second, performed by electrophoretic migration of the proteins in the focused IPG strip (first dimension) and then, in acrylamide gel according to the molecular weight (second dimension). After analysis of 2-D gels, spots differentially expressed in RFI groups were excised for analysis by laser desorption assisted by MALDI TOF / TOF matrix. Statistical analyzes were achieved by using the MIXED procedure of SAS, estimation of phenotypic correlation, using the CORR procedure, and comparison of expression values among RFI classes, using the CONTRAST procedure of the MIXED procedure. Low RFI animals had greater expression of leptin gene (2.80) and greater plasma concentration (11.48) in Nelore animals. Greater levels of leptin can be involved in the reduction of feed intake in low RFI animals, indicating to be a regulator on feed intake. Although RFI models were different in estimating values, correlations among each model indicate that they were not different in classifying animals for feed efficiency. The greater expression of slow-twitch fibers in more efficient cattle is due to preferential reduction of the fast twitch muscle fibers, as an adaptation to better deal with reduced nutritional requirement because it shows differences in the metabolic profile of muscle contraction. Nonetheless, variation in efficiency of the model that includes body composition parameters is important, suggesting that body composition can be critical to explain variations in feed intake and it must be included in the RFI model.

**Key words:** feed efficiency, gene expression, growth, muscle metabolism, proteomics

## LISTA DE TABELAS

### **Artigo 1 - Expressão do gene Leptina e desempenho de bovinos Nelore classificados para alto e baixo consumo alimentar residual (CAR)**

Tabela 1. Características de desempenho de novilhos de corte classificados para Consumo Alimentar Residual (CAR)..... 39

Tabela 2. Características de deposição tecidual de novilhos de corte classificados para Consumo Alimentar Residual (CAR)..... 41

Tabela 3. Expressão e concentração plasmática do gene leptina em bovinos Nelore selecionado para CAR. .... 43

Tabela 4. Correlações fenotípicas de características de desempenho e características de eficiência alimentar em animais classificados para Alto e Baixo CAR. .... 46

### **Artigo 2 - Proteômica de músculo esquelético em bovinos Nelore classificados para Consumo Alimentar Residual**

Tabela 1. Características de eficiência alimentar em bovinos Nelore classificados para classe de Consumo Alimentar Residual (CAR).. .... 61

Tabela 2. Proteínas diferencialmente expressas em músculo esquelético de (espécie do bovino), submetidos às condições controle e tratado, identificadas por MALDI TOF/TOF e software MASCOT..... 64

### **Artigo 3 - Modelos para estimação de consumo alimentar residual (CAR) em bovinos Nelore como medida para eficiência alimentar**

Tabela 1. Coeficientes de estimação de vários modelos de regressão para estimação do consumo alimentar residual (CAR) em bovinos Nelore (n = 97) com base em variáveis de previsão..... 80

Tabela 2. Distância euclidiana resultante da análise dos modelos para estimação do CAR com base nas características de desempenho de bovinos classificados para baixo CAR (diagonal inferior) e alto CAR (diagonal superior).. .... 83

Tabela 3. Correlação fenotípica (diagonal inferior) e correlação de Spearman (acima da diagonal) de características de desempenho e CAR calculado por diferentes modelos de estimação. .... 86

Tabela 4. Correlação fenotípica de características de deposição tecidual e CAR estimados por diferentes modelos.. .....	88
Tabela 5. Características de carcaça mensuradas por ultrassonografia de touros Nelore classificados por diferentes modelos de estimação do CAR.....	90

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

- Figura 1. Efeito da leptina nos adipócitos, no pâncreas e no músculo esquelético ..... 20
- Figura 2. Relação entre a leptina plasmática, o cortisol e a insulina durante a restrição alimentar e a realimentação em ruminantes ..... 21

### Artigo 2 - Proteômica de músculo esquelético em bovinos Nelore classificados para Consumo Alimentar Residual

- Figura 1. Imagens de gel bidimensional de bovinos Nelore classificados para baixo (A) e alto (B) CAR. As setas indicam as proteínas diferencialmente expressas (spots) ( $P < 0,05$ ) usando o software Image Master 7.0. .... 60
- Figura 2. Intensidade de spots identificados em animais classificados para CAR.  $*P < 0,05$ . .... 65

### Artigo 3 - Modelos para estimação de consumo alimentar residual (CAR) em bovinos Nelore como medida para eficiência alimentar

- Figura 1. Dendrograma resultante da análise dos modelos para estimação do CAR com base nas características de desempenho de bovinos classificados para baixo consumo alimentar (A) e alto consumo alimentar (B) ..... 84

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE FIGURAS .....	12
1. Introdução Geral .....	15
2. Revisão de Literatura .....	16
2.1. Consumo Alimentar Residual (CAR) .....	16
2.2. Leptina e a ação hormonal em bovinos de corte .....	18
2.3. Proteômica em bovinos de corte .....	22
2.4. Referencias Bibliográficas.....	25
Artigo 1 - Expressão do gene Leptina e desempenho de bovinos Nelore classificados para alto e baixo consumo alimentar residual (CAR).....	30
Resumo.....	30
Abstract .....	31
Introdução.....	32
Material e métodos .....	32
Animais .....	32
Consumo Alimentar Residual .....	33
Coleta de dados .....	34
Nível Hormonal Plasmático .....	35
Abate e coleta de tecidos .....	35
Extração de RNA, síntese de cDNA e otimização das amplificações .....	36
Análise estatística dos dados .....	36
Análise dos resultados de expressão .....	38
Resultados e discussão .....	39
Conclusões .....	47
Referências.....	48
Artigo 2 - Proteômica de músculo esquelético em bovinos Nelore classificados para Consumo Alimentar Residual.....	51
Resumo.....	51
Abstract .....	52
Introdução.....	53

Material e métodos .....	54
Animais .....	54
Consumo Alimentar Residual .....	54
Abate e coleta de tecidos .....	55
Extração de proteínas .....	55
Electroforese em gel bidimensional .....	56
Imagem e análise dos dados .....	58
Identificação da proteína .....	58
Análise estatística .....	59
Resultados e Discussão .....	59
Conclusão .....	66
Referências .....	66
Artigo 3 - Modelos para estimação de consumo alimentar residual (CAR) em bovinos	
Nelore como medida para eficiência alimentar .....	71
Resumo.....	71
Abstract .....	72
Introdução.....	73
Material e Métodos.....	73
Animais .....	73
Coleta de dados .....	74
Modelo I.....	75
Modelo II.....	76
Modelo III .....	76
Modelo IV .....	76
Modelo V.....	77
Modelo VI.....	77
Análise estatística dos dados .....	78
Resultados e Discussão .....	79
Conclusão .....	91
Referências .....	91

## 1. Introdução Geral

Atualmente a cadeia produtiva da carne bovina vem passando por inúmeras transformações, muitas vezes motivadas pelo crescimento da demanda de países em desenvolvimento e escassez de recursos naturais para ampliação da oferta. Assim, faz-se necessário o uso de tecnologias e métodos que colaborem para aperfeiçoar os sistemas de produção e minimizar os impactos ambientais. Medidas como eficiência alimentar (EA) e conversão alimentar (CA) que são comumente utilizadas para determinar a eficiência do rebanho, apresentam limitações como critério à eficiência na utilização de alimentos, pois são razões diretas entre ganho de peso e consumo de matéria seca.

Entretanto, um avanço ainda maior no melhoramento genético bovino é imprescindível, com a seleção de animais que tenham potencial genético para produzir uma maior quantidade de carne com a mesma quantidade de alimento. Conseqüentemente, as áreas de pastagens, áreas para produção de alimentos conservados (silagens e fenos), a produção de esterco e a emissão de metano e carbono da pecuária seriam mantidas nos índices atuais, mas a produção seria drasticamente aumentada buscando atender à demanda para alimentar o mundo nas próximas décadas.

As medidas de eficiência alimentar ocasionam uma seleção de animais mais eficientes em relação às taxas de crescimento, sem necessariamente reduzir o consumo de matéria seca, além de resultar em animais com maior tamanho à maturidade, elevando o nível de requisitos necessários para a manutenção (Arthur et al., 2004). Neste contexto o consumo alimentar residual (CAR), destaca-se como uma medida alternativa de eficiência alimentar, pois é definido como a diferença entre o consumo observado e o estimado por equação de regressão em função do peso vivo metabólico ( $PV^{0,75}$ ) e ganho de peso (GMD) dos animais. Esta metodologia propõe a seleção de animais com menor consumo e exigências de manutenção, sem alterar o peso adulto ou o ganho de peso (Paulino et al., 2004) e apresenta-se como uma ferramenta interessante para o melhoramento genético, podendo este ser incluído em índices de seleção juntamente com as outras medidas já tradicionalmente utilizadas por apresentar herdabilidade de moderada a alta.

A leptina é um hormônio que está relacionado à regulação do apetite, balanço energético, crescimento, deposição de gordura, características de carcaça e características reprodutivas (Macajova et al., 2004; Negrão e Licínio, 2000). Alguns

estudos indicaram a associação de marcadores moleculares à produção da leptina e às características de precocidade de acabamento e crescimento, principalmente, em bovinos de raças europeias, mantidos em sistema de confinamento (Buchanan et al., 2002; Nkrumah et al., 2004; Nkrumah et al., 2005).

A leptina é designada como sinalizador da quantidade de gordura de reserva estocada no corpo, por enviar sinais para uma rede neural responsável pela homeostase da energia, acarretando mudanças no consumo ou gasto de energia para manter o organismo em equilíbrio (Sansinanea et al., 2001). O mecanismo pelo qual a sensação de saciedade ocorre após o consumo de alimentos ainda não foi totalmente elucidado (Costa, 2002). No entanto, já se sabe que a leptina, tem influência na redução da ingestão alimentar e no aumento do gasto energético através da sua ação no hipotálamo (Almeida, 2002), por isso o efeito da leptina na regulação do consumo de alimentos tem conduzido a hipótese de que o hormônio leptina é o regulador de todo balanço energético em animais normais (Bartha et al., 2005). Assim, a alta deposição de tecido adiposo em animais de criação pode afetar negativamente todo o metabolismo corporal, eficiência de produção, reprodução e qualidade da carne (Macajova et al., 2004).

O estudo da proteômica em bovinos, classificados para alto e baixo consumo alimentar residual, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na determinação das características relacionadas à maior eficiência alimentar e desempenho dos animais, contribuindo com informações gerais do metabolismo, em conjunto com as pesquisas que já vem sendo realizadas para eficiência alimentar em bovinos, pode ser muito enriquecedora para seleção de animais eficientes destinado à produção de carne.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. Consumo Alimentar Residual (CAR)**

A maioria dos programas de melhoramento de bovinos de corte enfatiza a seleção para o aumento de peso corporal a diversas idades (elevando assim a exigência de manutenção dos animais), ganho de peso diário, circunferência escrotal, características de carcaça e melhorias no desempenho reprodutivo (Almeida, 2005). Estudos recentes que avaliam a seleção de animais com potencial genético para produção de carne com

uma menor ingestão de alimento enfatizando o aumento da eficiência produtiva em bovinos, maximizando a lucratividade.

Segundo Archer et al. (2002), indivíduos com mesmo peso vivo consomem quantidades muito diferentes de alimento para alcançarem o mesmo desempenho produtivo. O CAR (Consumo Alimentar Residual), vem sendo incorporado ao sistema de seleção de alguns países, pela variação considerável no consumo de alimentos, acima ou abaixo do esperado, baseado na estrutura corporal do animal (Sainz et al., 2006).

O CAR é estabelecido pela diferença entre o consumo real e o consumo de alimento que um animal deveria apresentar baseado em seu peso vivo médio, seu ganho de peso e algum parâmetro de composição corporal, se disponível. Animais mais eficientes apresentam CAR negativo (consumo observado menor que o predito para o ganho observado), enquanto que animais menos eficientes apresentam CAR positivo (consumo observado maior que o predito para o ganho observado), por sua vez os animais que apresentam CAR médio, ou zero, são aqueles que apresentaram o consumo observado igual ao predito (Bonilha, 2011; Magnani, 2011).

Animais mais eficientes para o CAR necessitam de menos nutrientes para sua manutenção e taxa de crescimento e, conseqüentemente, ingerem menos alimento que o estimado para o seu peso vivo e ganho de peso em comparação aos outros (Santana 2009).

Alguns estudos (Archer et al., 2002; Basarab et al., 2003) sugerem que o CAR está relacionado à composição do ganho. De acordo com Gomes (2009), existe uma possível tendência de animais menos eficientes possuírem maior percentagem de gordura corporal. A seleção para baixo CAR não altera a característica de tamanho adulto, mas afeta positivamente a exigência de manutenção dos animais.

Os programas de melhoramento genético de bovinos de corte que levam em conta o CAR, deixaram de enfatizar apenas a seleção para o aumento dos “outputs” tais como: o peso adulto, que proporciona um maior peso em todas as idades; ganho de peso diário; musculatura; qualidade de carcaça, entre outros (Lanna et al., 2004), e passam a dar ênfase para a diminuição dos custos com alimentação através da identificação de animais mais eficientes.

As diferenças na eficiência alimentar entre animais são devidas às variações no consumo de energia metabolizável e maiores ou menores custos energéticos com manutenção, incremento calórico e atividade física (Basarab et al., 2003). Quando há um

aumento no CAR, uma maior proporção da ingestão de energia metabolizável será direcionada para a produção de calor e uma menor proporção para a retenção de energia (Almeida, 2005).

O CAR, ao contrário da conversão alimentar, é independente dos padrões de crescimento e maturidade. Portanto, pode ser uma mensuração mais precisa e sensível da utilização dos alimentos, já que é baseado em consumo de energia e exigências energéticas. Estudos não reportaram diferenças significativas entre animais de alto e baixo CAR no consumo de dietas diferentes daquelas utilizadas para a identificação das classes de CAR (Arthur et al., 2001; Basarab et al., 2003; Meyer et al., 2008), sugerindo que a precisão da informação e aplicabilidade podem ser consideradas altas.

A utilização do CAR sendo uma característica que permite aos produtores identificar animais mais eficientes, sem que ocorra influência em seleção concomitante para animais de maior peso corporal a idade adulta (Lanna e Almeida, 2004), proporciona a seleção de animais com maior eficiência alimentar sem que ocorram perdas em produtividade.

Segundo Almeida (2005), existir uma alta correlação genética entre características relacionadas com o consumo no pós-desmame e na maturidade, indicando que os processos biológicos que regulam o consumo e eficiência em idades mais jovens e mais avançadas, são similares. A alta correlação genética entre CAR no pós-desmame e na idade adulta sugere utilizar a seleção para aprimorar a eficiência de animais em crescimento e vacas adultas, simultaneamente, baseadas em medidas coletadas no pós-desmame.

## **2.2. Leptina e a ação hormonal em bovinos de corte**

A leptina é o hormônio produto do gene da obesidade, que atua no sistema nervoso central e nos tecidos periféricos modulando o apetite e o metabolismo energético (Ahima e Flier, 2000). Em ruminantes, como em outras espécies, a leptina é secretada por adipócitos, se tornando um dos melhores marcadores fisiológicos da condição corporal, ingestão alimentar e gasto energético (Chelikani et al., 2003). Os níveis de leptina circulante podem variar de acordo com a concentração e distribuição da gordura e são diferentes entre as raças (Delavaud et al., 2002).

A leptina tem sido apontada como um importante fator na regulação do metabolismo energético, do comportamento no consumo de alimentos e reprodução em muitas espécies de animais (Williams, 2002). Contudo, cada vez mais pesquisas têm revelado que a leptina não é somente importante na regulação de alimentos ingeridos e no balanço energético, como também exerce função como hormônio metabólico e neuroendócrino (Macajova et al., 2004).

O efeito da leptina na regulação do consumo de alimentos tem conduzido à hipótese de que o hormônio leptina é o regulador de todo balanço energético em animais normais (Chilliard et al., 2005). A expressão do gene e a posterior secreção da leptina estão correlacionadas com a massa de gordura corporal e são imensamente afetados por alterações na ingestão dos alimentos (Zieba et al., 2005).

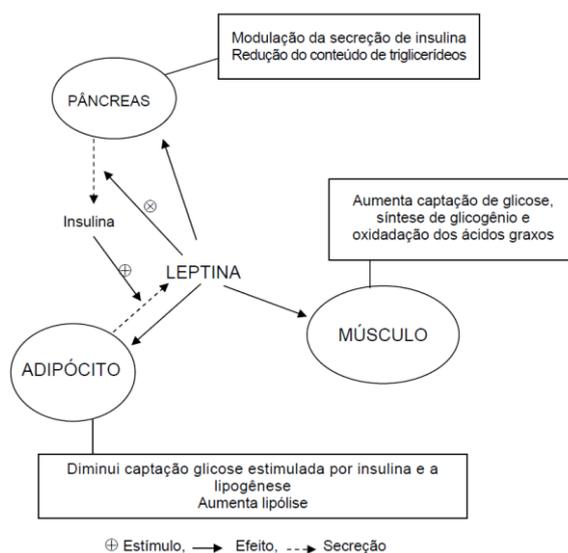
Em animais que apresentam peso corporal normal, a leptina está mais associada com a massa de gordura absoluta do que com o índice de massa corpórea ou percentagem de gordura corporal. A leptina é designada como sinalizador da quantidade de gordura de reserva estocada no corpo, que por sua vez envia sinais para uma rede neural responsável pela homeostase da energia, acarretando mudanças no consumo ou gasto de energia para manter o organismo em equilíbrio (Sansinanea et al., 2001). O mecanismo pelo qual a sensação de saciedade ocorre após o consumo de alimentos, ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, já se sabe que a leptina, tem influência na redução da ingestão alimentar e no aumento do gasto energético através da sua ação no hipotálamo (Bartha et al., 2005). A alta deposição de tecido adiposo em animais de criação pode afetar negativamente todo o metabolismo corporal, eficiência de produção, reprodução e qualidade da carne (Macajova et al., 2004).

A leptina apresenta correlação positiva com a gordura subcutânea. Apesar dessa hipótese ser sustentada pela relação positiva entre a leptina plasmática e a massa adiposa total, existe grande variação individual nos níveis plasmáticos desse hormônio, mesmo entre animais com a mesma composição corporal, sugerindo que outros fatores podem modular a secreção de leptina.

A leptina possui ação no sistema nervoso central, onde foram identificados receptores nas regiões hipotalâmicas envolvidas na regulação do comportamento alimentar, reprodução e crescimento, onde estão co-expressos com neuropeptídeos reguladores da expressão de leptina, tais como o neuropeptídeo Y (NPY) e propiomelanocortina (POMC). Também foram identificados receptores nas células

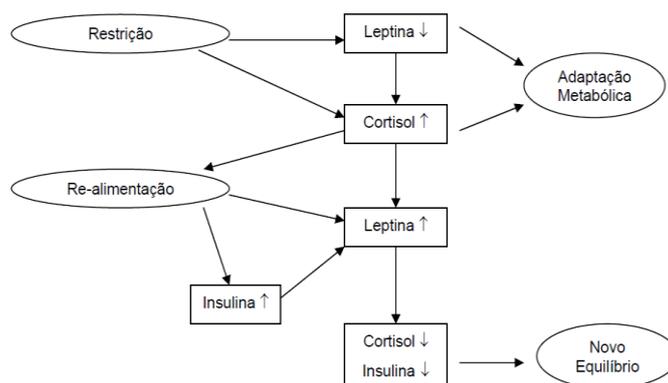
gonadotrópicas da hipófise anterior (Jin et al., 2000), células da granulosa, da teca, e células intersticiais do ovário e endométrio (Kitawaki et al., 2000).

Os estudos realizados com humanos e com linhagens de ratos obesos (ob/ob) ou diabéticos (db/db) têm demonstrado o envolvimento da leptina no controle do apetite e na modulação da secreção da insulina pelo pâncreas. Numa ação autócrina, a leptina exerce um efeito inibitório sobre a captação de glicose estimulada pela insulina, reduz a lipogênese e estimula a lipólise no tecido adiposo. De maneira endócrina, a leptina estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio pelas células do tecido muscular, além de acelerar a taxa de oxidação de ácidos graxos neste tecido (Figura 1) (Ceddia et al., 1998).



**Figura 1.** Efeito da leptina nos adipócitos, no pâncreas e no músculo esquelético. (Adaptado de Ceddia et al., 1998).

Analisando os resultados dos estudos de expressão gênica *in vivo* e *in vitro* combinados com os efeitos observados na restrição alimentar e na realimentação, Chilliard et al. (2001) sugeriram que a leptina além de evitar a deposição excessiva de gordura corporal, parece ter um papel importante durante a adaptação dos animais à restrição alimentar. O rápido decréscimo nos níveis plasmáticos da leptina em animais sob restrição alimentar pode ser um sinal para estimular a ingestão na situação de realimentação e aumentar a secreção de glicocorticóides, diminuir a atividade da tireóide, o gasto energético e a síntese protéica, além de bloquear a reprodução (Figura 2).



**Figura 2.** Relação entre a leptina plasmática, o cortisol e a insulina durante a restrição alimentar e a realimentação em ruminantes. (Chilliard et al., 2001).

Os níveis plasmáticos de leptina podem ser regulados por meio de efeitos sobre os mecanismos de transcrição do seu gene e, ou de síntese da proteína. As proteínas de ligação intensificadoras/CAAT estão relacionadas com a regulação da transcrição do gene. Outros fatores como os glicocorticoides, a insulina, a adenilato ciclase (AMPC) e os receptores  $\beta$ -adrenérgicos também estão associados com a regulação da expressão da leptina. Acredita-se que a insulina tem efeito tanto sobre a expressão quanto sobre a secreção da leptina. Parece que a insulina e a leptina fazem parte de uma alça de retroalimentação, enquanto a insulina estimula a secreção da leptina a leptina circulante inibe a produção de insulina (Catunda et al., 2014).

A expressão multifocal do receptor da leptina implica que a relação leptina/nutrição envolve complexas interações em vários níveis. A produção de leptina em ovinos está relacionada com a massa de tecido adiposo, que após sua produção, o hormônio atinge a circulação, o fluido cérebro-espinhal e depois os sítios hipotalâmicos, onde vai realizar sua ação (Blache et al., 2000). A resposta à ação desse hormônio parece envolver alguns nutrientes e hormônios metabólicos, assim como a insulina. Tem sido bastante estudada a relação entre leptina e metabolismo da glicose, uma vez que é identificada uma relação entre leptina e insulina. A leptina interfere nos mecanismos de sinalização intracelular à insulina, por meio de mecanismos identificados como cross-talk, porém não está clara a inter-relação entre esses hormônios. Nas células  $\beta$  do pâncreas, alguns autores constataram que a leptina é capaz de inibir a expressão de insulina. Por sua vez, em resposta à alimentação, as concentrações de leptina aumentam com a elevação da insulina, e, no jejum, diminuem após a redução da insulina.

A ativação dos receptores para leptina no sistema nervoso central inibe o consumo alimentar, ativa o gasto energético e afeta alguns processos metabólicos, agindo como um sinalizador do tecido adiposo, participando no controle do balanço energético (Havel, 2004).

O hormônio secretado pelos adipócitos possui como função, auxiliar os animais a se adaptarem a períodos de subnutrição. A rápida diminuição na concentração deste hormônio em situações de subalimentação pode ser um sinal para estimular a secreção de glicocorticoides, diminuir a atividade tireoidiana, os gastos de energia, a sensibilidade à insulina e a síntese de proteínas além de bloquear a atividade reprodutiva (Gui et al., 2003). Portanto, baixas concentrações de leptina atuam no sistema nervoso central de maneira a estimular o consumo de alimentos, o armazenamento e a dissipação de energia além de coordenar o metabolismo durante períodos de subnutrição.

Pela técnica de radioimunensaio utilizando kit multi-species, estudos foram realizados para monitorar a leptina plasmática em ruminantes, sendo que esta foi positivamente associada com a espessura de gordura no músculo Longissimus, com o grau de marmorização em bovinos de corte (Geary et al., 2003) e com a gordura corporal da carcaça de novilhos na fase de crescimento (Ehrhardt et al., 2000). Em bovinos da raça Japonesa Black no período de 10 a 27 meses de idade, Kawakita et al. (2001) verificaram que a leptina plasmática aumenta significativamente com a idade e que a espessura de gordura na carcaça na ocasião do abate foi positivamente associada com a taxa de aumento da leptina no plasma, principalmente entre 11 e 14 meses de idade. No entanto, o coeficiente de correlação entre estes parâmetros foi relativamente baixo, indicando que os níveis plasmáticos de leptina não devem ser utilizados para prever o acúmulo de gordura na carcaça de bovinos Japonesa Black. Delavaud et al. (2002) observaram em vacas holandesas que os níveis da leptina plasmática e o tamanho dos adipócitos apresentaram uma relação curvilínea e que 4 horas após a alimentação a concentração da leptina no plasma apresenta correlação positiva com o nível nutricional.

### **2.3. Proteômica em bovinos de corte**

Os processos que regulam a ingestão alimentar, e conseqüentemente as medidas de eficiência alimentar, são dependentes de diversos processos biológicos somados a

efeitos ambientais. Existe a necessidade de identificar como o consumo de alimentos por parte dos animais é destinado para diversos processos biológicos, assim torna-se necessário que as medidas de eficiência alimentar sejam mais bem estudadas. Adicionalmente, é importante verificar se essas medidas, ao serem escolhidas como critérios de seleção genética, não trariam nenhum tipo de consequência negativa para o sistema produtivo, tanto consequências biológicas como econômicas para que, assim, pudessem ser incluídas nos programas de melhoramento genético de bovinos de corte ou leite, para melhorar a rentabilidade dos sistemas de produção.

Os principais mecanismos fisiológicos que influenciam a variação no CAR estão relacionados às exigências de manutenção, transporte de íons, resposta ao estresse, metabolismo dos tecidos e incremento calórico (Basarab et al., 2003; Richardson et al., 2004). O transporte iônico e o turnover proteico teoricamente teriam grande influência na eficiência alimentar, isso porque esses processos estão relacionados com os requerimentos de manutenção dos bovinos (Barendse et al., 2007; Moore et al., 2009; Sherman et al., 2009).

O estudo das proteínas do músculo tem sido alvo dos pesquisadores em muitas espécies de animais, especialmente em bovinos e suínos. Apesar de mais numerosos, ainda há carência de informações devido ao grande número de proteínas presentes no tecido e à grande complexidade inerente às análises. A utilização da proteômica para a comparação quantitativa e qualitativa dos proteomas para identificar mecanismos celulares envolvidos em processos biológicos apresenta importância para detecção dos fatores que favorecem diferenças na eficiência alimentar de bovinos. Além disso, tal abordagem permite um estudo de suas estruturas proteicas, localização, modificação, interação, atividade e funções.

Na análise global das proteínas expressas pelo genoma de um organismo ou tecido específico, vêm sendo aplicadas técnicas de proteômica, que têm como objetivo isolar e identificar proteínas, estudar suas propriedades, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações protéicas e mecanismos regulatórios (Bendixen et al., 2011). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas, mas uma imagem dinâmica com dados da expressão de proteínas sob condições definidas e sua distribuição na célula. Os complexos de proteínas são o primeiro nível de organização do proteoma celular (Kuhner et al., 2009). A proteômica fornece uma ligação entre proteínas e seus

genes codificadores e, portanto, uma ligação entre a fisiologia celular e a genética. Isso se mostra relevante, já que inúmeros projetos genoma, que vêm sequenciando genes de organismos inteiros, geram uma grande quantidade de informações que, independentemente, não traduzem o funcionamento real das complexas redes reguladoras e o metabolismo da célula (em estado normal ou patológico) (Santos et al., 2004).

O estudo do proteoma é bastante complexo e desafiador devido à grande heterogeneidade quantitativa e bioquímica das proteínas (Lametsch, 2011). As proteínas podem ser muito ou pouco abundantes, podem estar fracionadas e localizadas em diferentes compartimentos. Podem estar associadas a outras proteínas, formando um grande complexo de proteínas, em membranas ou são enzimas localizadas no citoplasma (Hollung et al., 2007). Neste contexto, uma metodologia proteômica ideal seria aquela capaz de gerar uma elevada produção de dados com detecção de vários produtos de proteínas, além de apresentar alta sensibilidade, reprodutibilidade e ser quantificável, para fornecer assim, informações detalhadas sobre as modificações das proteínas detectadas individualmente.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o estudo da proteômica. Porém, nenhuma delas é capaz de representar completamente todas as proteínas de determinado extrato ou tecido. Sua eficiência depende das características do material, do objetivo do estudo e de fatores como o elevado número de proteínas e o nível de expressão, que podem complicar a identificação das proteínas (Lippolis e Reinhardt, 2008). Por isso, a escolha da técnica depende do conjunto de proteínas a serem investigadas, pois centenas a milhares de proteínas podem ser analisadas em um experimento, mas ainda assim, ser uma pequena parte do proteoma inteiro (Hollung et al., 2007).

Em contraste ao genoma, o proteoma está continuamente mudando de acordo com os fatores que o influenciam na síntese ou na degradação de proteínas, podendo ser visto como uma análise instantânea dentro de um sistema em constante mudança. A análise de proteomas pode analisar centenas de proteínas em um único experimento permitindo demonstrar como células podem responder dinamicamente às mudanças fisiológicas em resposta às alterações de ambiente. Na essência, a proteômica permite que um investigador veja o quadro completo das funções celulares em vez de uma ação particular de uma proteína (Lippolis e Reinhardt, 2008).

## 2.4. Referencias Bibliográficas

AHIMA, R.S; FLIER, J.S. Leptin. **Annual Review of Physiology**. v. 62, p. 413-437, 2000.

ALMEIDA, R.; LANNA, D.P.D; LEME, P.R. Consumo alimentar residual: um novo parâmetro para avaliar a eficiência alimentar de bovinos de corte. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41., Campo Grande. **Anais...**Campo Grande: SBZ, 2004.

ALMEIDA, R. **Consumo e eficiência alimentar de bovinos em crescimento**. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

ARCHER, J. A. REVERTER, A.; HERD, R. M.; JOHNSTON, D. J.; ARTHUR, P. F. Genetic variation in feed intake and efficiency of mature beef cows and relationships with postweaning measurements. In: **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Montpellier. Proceedings... Montpellier: 7 WCGALP, v.1, p.1-4, 2002.

ARTHUR, P. F.; RENAND, G.; KRAUS, D. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science**, Rome, v. 68, p. 131 – 139, 2001.

ARTHUR, P. F.; ARCHER, J. A.; HERD, R. M. Feed intake and efficiency in beef cattle: overview of recent Australian research and challenges for the future. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v.44, p.361-369,2004.

BARTHA, T.; SAYED-AHMED, A; RUDAS, P. Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 29, p. 193-202, 2005.

BASARAB, J. A.;MCCARTNEY, D.; OKINE, E. K.; BARON, V. S. Relationships between progeny residual feed intake and dam productivity traits. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v.87, p. 489-502, 2007.

BLACHE, D.; TELLAM, R. L.; CHAGAS, L. M.; BLACKBERRY, M. A.; VERCOE, P. E.; MARTIN, G. B. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and

cerebrospinal fluid in sheep. **Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 165, p. 625-637, 2000.

BONILHA, E. F. M. **Composição corporal de bovinos Nelore selecionados para peso e classificados para consumo alimentar residual**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Zootecnia APTA/SAA. Nova Odessa – SP, 2011.

BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. Association of missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection**, Paris, v. 34, p.106-16, 2002.

CATUNDA, A.G.V.; LIMA, F.R.G.; LIMA, I.C.S.; MACHADO, A.A.C.; GADELHA, C.R.F.; PEREIRA, E.S.; MARTINS, G.A.; CAMPOS, A.C.N. O papel da leptina na reprodução dos ruminantes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.38, n.1, p.3-9, 2014.

CEDDIA, R.P.; WILLIAMS JR., W.N.; LIMA, F. B.; CARPIMELLI, A. R.; CURI, R. Pivotal role of leptin in insulin effects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.31, p.715-22, 1998.

CHELIKANI, P.K.; GLIMM, D.R.; KENNELLY, J.J. Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **Journal of Dairy Science**. v. 86, n 7, p. 2369-2372, 2003.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants. Nutritional and physiological regulations in relation of energy metabolism: a review. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 3-22, 2005.

DELAVAUD, C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; BOCQUIER, F.; KANN, G.; CHILLIARD, Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1317-1328, 2002.

EHRHARDT, R.A.; SLEPETIS, R.M.; SIEGAL-WILLOTT, J.; VAN AMBURGH, M.E.; BELL, A.W.; BOISLAIR, Y.R. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 166, p. 519-528, 2000.

GEARY, T.W.; MCFADIN, E. L.; MACNEIL, M. D.; GRINGS, E. E.; SHORT, R. E.; FUNSTON, R. N.; KEISLER, D. H. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1-8, 2003.

GOMES, R. C. **Metabolismo proteico, composição corporal, características de carcaça e qualidade de carne de novilhos Nelore (Bos indicus) em função de seu consumo alimentar residual**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

GUI, Y.; SILHA, J.V.; MISHRA, S.; MURPHY, L.J. Changes in adipokine expression during food deprivation in the mouse and the relationship to fasting-induced insulin resistance. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 81, p. 979– 85, 2003.

HAVEL, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, New York, v. 53 (Suppl 1), p. 143–151, 2004.

JIN, L.; ZHANG, S.; BURGUERA, B. G.; COUCE, M. E.; OSAMURA, R. Y.; KULIG, E.; LLOYD, R. V. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. **Endocrinology**, v. 141, p. 333–339, 2000.

KAWAKITA, Y.; ABE, H.; HODATE, K.; IGUCHI, A.; KOBAYASHI, M.; MORI, T.; KASAI, K.; TANAI, Y.; KAMBE, Y.; MASHIYAMA, H.; ASADA, T.; MIYASHIGE, T. The relation between plasma leptin concentrations and carcass lipid contents in Japanese Black steers. **Livestock Production Science**, v. 73, p. 25-34, 2001.

KITAWAKI, J.; KOSHIBA, H.; ISHIHARA, H.; KUSUKI, I.; TSUKAMOTO, K.; HONJO, H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Stanford, v. 85, p. 1946–1950, 2000.

MÁCAJOVÁ, M., LAMOSOVÁ, D., ZEMAN, M. Role of leptin in farm animals: a review. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p. 157-166, 2004.

MAGNANI, Elaine. **Caracterização do consumo alimentar residual e relações com desempenho e metabolismo de fêmeas Nelore**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Zootecnia. APTA/SAA. Nova Odessa - SP, 2011.

MEYER, A. M.; KERLEY, M. S.; KALLENBACH, R. L. The effect of residual feed intake classification on forage intake by grazing beef cows. **Journal Animal Science**, v.86, p.2670-2679, 2008.

MONTANHOLI, Y. R. Genetic improvement in beef cattle for feed efficiency: increasing our understanding of the biological Basis. **Proceedings...Beef Improvement Federation**, 39 Annual Research Symposium & Annual meeting Fort 25. Collins, Colorado. Department of Animal & Poultry Science, Guelph, 2007.

NEGRÃO, A. B.; LICINO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.44 n.3, p.205-14, 2000.

NKRUMAH, J. D.; LI, C.; BASARAB, J. B.; GUERCIO, S.; MENG, Y.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. **Canadian Journal of Animal Science**, v.84, p.211-19, 2004.

NKRUMAH, J. D.; LI, C.; YU, J.; HANSEN, C.; KEISLER, D. H.; MOORE, S. S. Polymorphism in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior and measures of carcass merit. **Journal of Animal Science**, v.83, p.20-8, 2005.

SAINZ, R.D., CRUZ, G.D.; MONTEIRO, R.B. Carcass composition and visceral organs are similar at harvest in low- and high-residual feed intake groups of Angus-Hereford steers, Proceedings. Western Section: **American Society of Animal Science**, 2006.

SANTANA, Miguel Henrique de Almeida. **Relação do consumo alimentar residual e conversão alimentar com características de carcaça, perfil metabólico e sanguíneo de touros da raça Nelore**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SANTOS, P.M., TEIXEIRA, M.C., SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Métodos em Biotecnologia - Proteômica Quantitativa**. Boletim de Biotecnologia 7, 2004.

SANSINANE, A. S.; CERONE, S. I.; ZONCO, I. GARCÍA, C.; AUZA, N. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. **Nutrition Research**. v.21, p.1045-1052, 2001.

WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M. R. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 53, p.1-11, 2002.

ZIEBA, D.A; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G.M. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 29, p. 166-85, 2005.

## **Artigo 1 - Expressão do gene Leptina e desempenho de bovinos Nelore classificados para alto e baixo consumo alimentar residual (CAR)**

### **Resumo**

Objetivou-se avaliar a expressão do gene Leptina em bovinos classificados para alto e baixo CAR no músculo Longissimus dorsi e relacionar as diferenças da leptina plasmática com as características de desempenho e desenvolvimento corporal em bovinos da raça Nelore. Foram utilizados 97 animais classificados para alto e baixo CAR, avaliados para características de ingestão, crescimento, eficiência alimentar, concentração plasmática de leptina e características de carcaça. Foram abatidos 20 animais classificados para alto e baixo CAR e coletadas amostras do músculo Longissimus dorsi, para análise da expressão do gene leptina. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do SAS, as estimativas de correlação fenotípica, utilizando o procedimento CORR e a comparação dos valores de expressão entre as classes de CAR, utilizando o procedimento CONTRAST do MIXED. As concentrações plasmáticas da leptina influenciaram a redução das características de eficiência alimentar e apresentaram correlação positiva significativa ( $r=0,22$ ) apenas com o ganho em espessura de gordura na garupa dentre as características de deposição tecidual. Animais classificados para baixo CAR apresentaram maior expressão do gene leptina (2,80) e maior concentração plasmática do gene leptina (11,48) em bovinos Nelore. O aumento dos níveis de expressão gênica da leptina também foi acompanhado pelo aumento da concentração de leptina no plasma.

**Palavras-chave:** bovino de corte, concentração plasmática, deposição tecidual, eficiência alimentar, expressão gênica

## **Article 1 - Leptin gene expression and performance in high and low residual feed intake (RFI) Nellore animals**

### **Abstract**

The objective was to evaluate the expression of the leptin gene in cattle ranked for high and low RFI in the Longissimus dorsi muscle and correlated the differences in plasma leptin with the performance traits and body development in Nellore cattle. A total of 97 animals, classified for high and low RFI, measured for intake, growth, feed efficiency, plasma leptin concentration, and carcass traits, was utilized. Twenty animals classified for high and low RFI were slaughtered, and Longissimus dorsi muscle was sampled to analyze leptin gene expression. Statistical analyzes were achieved by using the MIXED procedure of SAS, estimation of phenotypic correlation, using the CORR procedure, and comparison of expression values among RFI classes, using the CONTRAST procedure of the MIXED procedure. Plasma concentrations of leptin influenced the reduction of feed efficiency characteristics and had a significant positive correlation ( $r=0.22$ ) with only rump fat thickness gain among tissue deposition characteristics. Low RFI animals had greater expression of leptin gene (2.80) and greater plasma concentration (11.48) in Nellore animals. The increase in the gene expression levels of leptin were also accompanied by increased leptin concentration in plasma.

**Key words:** beef cattle, feed efficiency, genic expression, plasma concentration, tissue deposition

## **Introdução**

O CAR é definido como a diferença entre a ingestão observada e a estimada, sendo a estimada calculada por equações de regressão da própria ingestão, em função do tamanho corporal e da velocidade de crescimento (Arthur et al., 2001). O consumo alimentar residual (CAR) surgiu como ferramenta potencial para verificar diferenças na eficiência alimentar entre animais. Esta medida reflete na variação do processo metabólico básico mais do que nas variações devido às diferenças no nível de produção (Montanholi et al., 2007).

A leptina tem sido apontada como importante fator na regulação do metabolismo energético, comportamento no consumo de alimentos e reprodução em muitas espécies de animais ruminantes ou não (Williams, 2002). Contudo, pesquisas têm revelado que a leptina não é somente importante na regulação de alimentos ingeridos e no balanço energético, mas também exerce função como hormônio metabólico e neuroendócrino (Macajova et al., 2004).

Análises quantitativas da expressão do gene leptina (LEP) têm sido realizadas em amostras de tecidos de ruminantes com objetivo de conhecer as relações entre sua expressão e o ganho de peso ou aumento da fertilidade (Yonekura et al., 2002; Ren, et al., 2002; Chelikani et al., 2003; Chilliard et al., 2005), tendo observado que variações nos níveis de mRNA de leptina em tecido adiposo e em glândula mamária de ruminantes, decorrem de diferenças genéticas, fisiológicas e de fatores ambientais e nutricionais (Chilliard et al., 2005).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar a expressão do gene Leptina em bovinos classificados para alto e baixo CAR no *Lingissimus dorsi* e relacionar as diferenças da leptina plasmática com as características de desempenho e desenvolvimento corporal em bovinos Nelore.

## **Material e métodos**

### **Animais**

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA / USP), Pirassununga, SP, Brasil e no Laboratório de Biotecnologia (LabTec) no Departamento de Zootecnia da UFV, Viçosa,

MG. Foram utilizados 97 animais machos da raça Nelore (*Bos indicus*), com média de 404,19±30,49 kg de peso vivo no início do experimento e 584 (±30) dias de idade, classificados para alto e baixo consumo alimentar residual (CAR).

Os animais foram mantidos em confinamento durante o período experimental de 126 dias, alocados em baias individuais (n=50 animais) e coletivas, equipadas com sistema de portão eletrônico do tipo calan gate (n=47 animais), contendo bebedouro e cocho para cada animal. Antes da avaliação do CAR, os animais passaram por adaptação às instalações e à dieta, por um período de 10 dias. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com dieta total, com acesso ad libitum à dieta e água.

### Consumo Alimentar Residual

O consumo alimentar residual (CAR) foi obtido com base na seguinte equação de regressão múltipla e corrigido para deposição de tecidual:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 GMD + \beta_2 PVM^{0,75} + \varepsilon \text{ (Koch, et al., 1963)}$$

onde: “ $\beta_0 + \beta_1 PVM^{0,75} + \beta_2 GMD$ ” representa o consumo de MS esperado,  $PC^{0,75}$  o peso corporal metabólico médio durante o experimento e GMD a média de ganho de peso diário. Dessa forma,  $\varepsilon$  representa o CAR (consumo de MS real menos o consumo de MS esperado).

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 GMD + \beta_2 PVM^{0,75} + \beta_3 GORD + \varepsilon_1$$

em que: IMS – ingestão de matéria seca diária por animal;  $\beta_0$  – intercepto;  $\beta_1$  – coeficiente linear da regressão para IMS;  $\beta_2$  – coeficiente linear da regressão para  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_3$  – coeficiente linear da regressão para GORD;  $\varepsilon_1$  – resíduos que expressa a medida da eficiência do CAR corrigido para deposição tecidual.

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com seus valores de CAR individuais. Animais com valores superiores à média, mais 0,5 desvios padrão (DP), foram classificados como novilhos de alto CAR e animais com valores abaixo da média menos 0,5 DP, foram classificados como o grupo de baixo CAR.

Para avaliação do consumo de matéria seca, foi feita a diferença entre o alimento fornecido e as sobras. Foi realizado o ajuste da sobra do consumo para que correspondesse a 5% do total de alimento oferecido diariamente, de forma a garantir alimentação ad libitum para todos os animais.

## Coleta de dados

Os animais foram pesados em jejum alimentar e hídrico durante o período de avaliação e assim obtido o peso corporal médio (PCM). O ganho de peso médio diário (GMD) foi calculado com base nas pesagens periódicas dos animais, representado como o coeficiente da regressão linear dos pesos em relação aos dias em teste. Adicionalmente, a ingestão de matéria seca (IMS) para cada animal foi mensurada diariamente por meio da subtração entre a quantidade de alimento fornecido e as sobras alimentares. A partir desses dados de IMS, foram calculadas as medidas de eficiência alimentar: taxa de conversão alimentar (CA), consumo alimentar residual (CAR), ganho de peso residual (GPR) e consumo e ganho residuais (CGR).

A CA foi calculada pela razão da IMS pelo GMD, enquanto que o GPR representa os resíduos ( $\varepsilon_2$ ) da equação de regressão que estimou o ganho de peso diário (GMD), respectivamente. Os modelos para estimação destas características foram:

$$GMD = \beta_0 + \beta_1 IMS + \beta_2 PVM^{0,75} + \varepsilon_2 \text{ (Koch, et al., 1963)}$$

onde: os parâmetros ( $\beta$ ) foram estimados a partir do procedimento PROC MIXED (Statistical Analysis System, versão 9.3). O CGR foi calculado pela fórmula abaixo:

$$CGR = (-1 * CAR) + GPR \text{ (Berry e Crowley, 2012)}$$

Taxa de Crescimento Relativo (TCR):  $100 \left[ \frac{(\log PV_f - \log PV_i)}{(\text{Duração do teste})} \right]$  (Fitzhugh e Taylor, 1971), taxa de Kleiber (TK):  $\frac{GMD}{PV^{0,75}}$  (Kleiber, 1936).

Adicionalmente, os bovinos foram submetidos no início e no final de cada período experimental à avaliação de carcaça por meio de ultrassonografia (Aloka SSD500 com um transdutor de 3,5MHz) por um técnico certificado da Ultrasound Guidelines Council, seguindo a metodologia descrita no guia da Beef Improvement Federation (BIF, 2010).

As medidas avaliadas por ultrassom foram: área do olho do lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea sobre o lombo (EGS) e também espessura de gordura sobre a picanha (EGP). A AOL e a EGS foram mensuradas entre a região da 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas, transversalmente ao músculo Longissimus. A EGP foi mensurada na intersecção dos músculos Gluteus medius e Biceps femoris, localizados entre o íleo e o ísquio. Os valores iniciais foram subtraídos dos finais para cálculo dos ganhos das medidas (AOLg, EGSg e EGPg) durante o experimento.

### **Nível Hormonal Plasmático**

As amostras de sangue foram coletadas aos 90 dias de confinamento e no momento do abate, após 126 dias de confinamento, por meio de punção da veia jugular com auxílio de tubos Vacutainer de 10 mL, contendo heparina sódica como anti-coagulante e a centrifugação foi realizada à temperatura de 4°C, a uma velocidade de 3500 xg, durante quinze minutos. Após a centrifugação, as amostras de plasma foram alicotadas em tubos tipo Eppendorf (1,5 mL), num total de dois tubos por animal/coleta, e estocadas a -20°C até o momento da dosagem hormonal.

Os níveis plasmáticos da leptina foram quantificados a partir de 0,5 mL de plasma de cada animal, utilizando kit de radioimunoensaio (RIA) de leptina multiespécies (XL-85K Linco Research, Inc., St. Charles, MO, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados 100 µL de plasma bovino para determinar o padrão das amostras e 100 µl de plasma bovino para determinar a concentração plasmática da leptina. Os 100 µl foram adicionados a 200 µl de tampão de ensaio, seguido da adição de 100 µl de anticorpo de leptina multi-espécie e incubado overnight a 4°C. Após a incubação, 100 µL de leptina 125-I foram adicionadas aos tubos, agitados e incubados overnight 4° C. No terceiro dia, 1,0 mL de reagente precipitante resfriado (4° C) foi adicionado a todos os tubos, agitados e centrifugados durante 20 min a 3000 xg. O sobrenadante foi decantado e a radioatividade quantificada.

### **Abate e coleta de tecidos**

Ao final do confinamento, após 126 dias de avaliação da eficiência alimentar, foram abatidos 20 animais no Matadouro Experimental da Universidade de São Paulo, após jejum de água e sólidos por 16 h. Os animais foram atordoados e abatidos seguindo a regulamentação técnica dos métodos de atordoamento para abate humanitário. Imediatamente após o abate, foram retiradas amostras de 10 animais classificados para baixo e alto consumo alimentar residual (CAR) totalizando 20 amostras (10 amostras de animais de baixo CAR e 10 amostras de animais de alto CAR). Foram coletadas as amostras do músculo Longissimus dorsi, as quais foram

imediatamente imersas em solução de estabilização de RNA (RNAholder – Bioagency, São Paulo/SP, Brasil), numa relação peso:volume de 1:10, com o objetivo de estabilizar a síntese e a degradação de RNA. As amostras imersas em RNAholder foram identificadas e mantidas overnight a 4°C. Após 24 h de armazenamento, as amostras foram transferidas e conservadas a -20°C até a data de extração do RNA.

### **Extração de RNA, síntese de cDNA e otimização das amplificações**

Para a extração de cada amostra foram utilizados em média 30 mg de tecido. O RNA total das amostras de músculo foram extraídas com Trizol e a concentração de RNA foi estimada no espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Germany). As amostras de RNA foram mantidas a -70°C até as reações de síntese (transcriptase reversa) fossem realizadas.

Após a extração, o RNA total foi então submetido à reação Two-Step para produção do cDNA e subsequente início das amplificações em tempo real. Para a síntese do cDNA utilizou-se o kit Go Script™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, USA) e a concentração estimada no espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Germany). As reações foram feitas em tubos individuais assim como o controle endógeno evitando a possível competitividade em sistemas de PCR multiplex, que pode influenciar na eficiência das amplificações. Para tanto, foi preparado um pré-mix de acordo com as instruções do SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, C.A., EUA). Todas as reações foram feitas em replicatas. O coeficiente de variação para as replicatas foi considerado, não apenas para as otimizações, mas também para as reações de rotina. Se este parâmetro fosse maior que 5%, as replicatas seriam reamplificadas.

Os primers utilizados foram: Leptin bos 5' to 3' F – GGGCACGTCAGCATCTATTA e R – CCTGTCTGCTGTTATGGTCTTA e como normalizador 18S ribossomal 5' to 3' F – CCTGCGGCTTAATTTGACTC e R – AACTAAGAACGGCCATGCAC.

### **Análise estatística dos dados**

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo considerados como tratamentos as duas classes de CAR (alto e baixo). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3). As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos e comparadas pelo teste Tukey-kramer, a 5% de probabilidade.

Os dados foram analisados usando modelos mistos, considerando a classe de CAR como efeito fixo, as análises de EGSg e EGPg em animais classificados para CAR foram realizadas com e sem a inclusão da variável de deposição de gordura dos animais no modelo. Com efeito fixo de classe de consumo alimentar e efeito aleatório de animal:  $y_{ij} = \mu + a_i + b_j + \varepsilon_{ij}$ , em que:  $y_{ij}$  = valor observado da característica na classe CAR  $i$ , no animal  $j$ ;  $\mu$  = média geral;  $a_i$  é o efeito fixo da classe de CAR;  $b_j$  é o efeito aleatório de animal dentro da classe de CAR;  $\varepsilon_{ij}$  é o erro aleatório. Na análise diferenças com  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

A análise de correlação entre as medidas de eficiência, desempenho, ganho de peso, consumo e composição corporal foram realizadas pelo coeficiente de correlação de Pearson, utilizando o procedimento CORR do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3).

Foi utilizada a análise de componentes principais para selecionar variáveis para serem adicionadas no modelo de expressão gênica. Aplicou-se o programa R utilizando o pacote vegan (Oksanen et al., 2013). Tendo em vista o grande número de variáveis medidas em unidades diferentes, foi necessária a padronização das variáveis originais  $X_j$  ( $j = 1, 2, \dots, p$ ) em  $Z_j$ . Após essa transformação, todas as variáveis originais têm a mesma variância unitária e, dessa maneira, a base para extração dos componentes principais se torna a matriz de correlação  $R$ . Neste caso, os coeficientes dos componentes principais são indicadores da magnitude da correlação entre as variáveis padronizadas e os componentes principais, pois a correlação pode ser obtida pela seguinte expressão:

$$r_{CP_i Z_j} = \sqrt{\lambda_i x_{a_{ij}}}$$

em que  $\lambda_i$  = autovalor associado ao  $CP_i$ , que é uma constante;  $a_{ij}$  = coeficiente do  $CP_i$  relacionado à variável  $Z_j$ .

O critério para descarte de variáveis utilizado foi recomendado por Jolliffe (1973) para situações em que se trabalha com dados simulados e reais, com a análise de

componentes principais a partir da matriz de correlação (Paiva et al., 2010). Esse critério estabelece que o número de variáveis descartadas deve ser igual ao número de componentes cuja variância (autovalor) é inferior a 0,7. No descarte de variáveis, a variável que apresenta o maior coeficiente (valor absoluto) no componente principal de menor autovalor (menor variância) deve ser menos importante para explicar a variância total e, portanto, passível de descarte.

As variáveis passíveis de descarte são respectivamente em ordem de menor importância para explicar a variação total: ingestão de matéria seca (IMS), peso médio (PM), peso aos 210 dias (P210), peso ao final do confinamento (PVF), ganho médio diário pela regressão (GMDreg), eficiência alimentar (EA), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar total (EAT), ganho em espessura de gordura subcutânea (EGSg), concentração plasmática da leptina (Conclep). Com base nesses resultados as seguintes variáveis: peso aos 240 dias (P240), peso no início do confinamento (PVI), peso metabólico (PMet), consumo alimentar residual (CAR) e ganho em espessura de gordura na garupa (EGPg), foram utilizadas para corrigir efeitos no modelos de expressão gênica.

### **Análise dos resultados de expressão**

As reações de qRT-PCR foram realizadas pelo termo ciclador ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), considerando os melhores primers às melhores condições de amplificação de cDNA. As estatísticas foram analisadas pelo SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3), com algoritmo QPCR\_MIXED (Steibel, 2009), utilizando o comando PROC MIXED para analisar dados de qRT-PCR. Para cada gene alvo, a comparação dos valores de expressão entre os grupos genéticos foi feita por CONTRAST do procedimento MIXED utilizando o teste t de Student (Steibel et al., 2009) e teste Tukey-kramer a 5% de probabilidade.

Os dados de qRT-PCR foram analisados utilizando modelo misto com a inclusão de covariáveis por apresentar melhor critério de ajuste do modelo BIC (critério de informação Bayesiano), descrito  $y_{ikl} = PRG_{ik} + A_{(i)l} + D_{ik} + \beta(x_i - \bar{x}) + \varepsilon_{ikl}$  onde:  $y_{ikl}$  é o nível de expressão do gene k do animal l da classe de consumo alimentar i;  $PRG_{ik}$  é o efeito da interação entre a classe de consumo alimentar i e gene k,  $A_{(i)l}$  é o

efeito aleatório do animal  $l$  dentro da classe de consumo alimentar;  $D_{ik}$  é o efeito aleatório amostra-específico (comum ao gene),  $D_{ik} \sim N(0, \sigma^2)$ ,  $\beta(x_i - \bar{x})$  covariáveis selecionadas pela análise de componentes principais para ajustar os dados.

## Resultados e discussão

Com relação ao peso corporal, não foi observada diferença no início ou no final do experimento, bem como para GMD (ganho médio diário) no período de avaliação entre bovinos classificados para baixo e alto CAR (Tabela 1). Tal observação sugere que animais classificados para classes de CAR divergentes, não apresentam diferenças para características de ganho de peso, indicando independência do consumo de alimentos para o peso e ganho de peso na mesma idade de avaliação.

**Tabela 1.** Características de desempenho de novilhos de corte classificados para Consumo Alimentar Residual (CAR).

Característica	Classificação CAR		EPM <sup>1</sup>	Pr >  t  <sup>2</sup>	SD <sup>3</sup>
	Eficiente (Baixo CAR)	Ineficiente (Alto CAR)			
PVI (kg)	405	408	8,56	0,51	30,49
PVF (kg)	530	533	5,43	0,62	41,48
GMD (kg/dia)	1,80	1,81	0,11	0,98	0,39
IMS (kg)	9,60	12,01	0,30	0,0001	1,54
IMSpv (%)	2,13	2,60	0,05	0,0001	0,29
EA	0,19	0,14	0,01	0,0001	0,029
EAT	0,86	0,77	0,02	0,0001	0,14
CA	5,38	6,88	0,23	0,0001	1,01
CAR kg MS/dia	-1,20	1,33	0,13	0,0001	1,16
CGR	1,10	-1,40	0,16	0,0001	1,37
GPR kg ganho/dia	0,15	-0,25	0,07	0,0001	0,31
TK	0,020	0,019	0,0009	0,98	0,004
TCR	0,133	0,129	0,006	0,98	0,025

PVI – peso no início do confinamento, PVF – peso ao final do confinamento, GMD – ganho médio diário, IMS – ingestão de matéria seca, IMSpv – ingestão de matéria seca por peso vivo, EA - eficiência alimentar, EAT – eficiência alimentar total, CA – conversão alimentar, CAR – consumo alimentar residual; CGR = consumo e ganho residual; GPR - Ganho de Peso Residual; TCR = taxa de crescimento relativo; TK = taxa de Kleiber.

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>Probabilidade do erro; <sup>3</sup>Desvio Padrão.

Os animais classificados para baixo CAR apresentaram melhor eficiência no aproveitamento dos alimentos, ocasionado pela menor necessidade de nutrientes para sua exigência de manutenção e taxa de crescimento, resultando na menor ingestão de alimentos, influenciando nas diferenças observadas para ingestão de matéria seca (IMS e IMS<sub>pv</sub>) baseado no tamanho e taxa de ganho do animal.

A conversão alimentar (CA) apresentou diferença ( $P < 0,0001$ ) entre as classes de animais classificados para CAR. Os animais da categoria de Baixo CAR (5,38 kg MS/kg ganho) apresentaram CA 21,8 % menor do que animais na categoria de alto CAR (6,88 kg MS/kg ganho). Animais mais eficientes para o CAR apresentaram maior eficiência alimentar (EA) e eficiência alimentar total (EAT). Os valores de CA, EA e EAT foram favoráveis para animais classificados para baixo CAR, devido estas medidas de eficiência alimentar serem razões entre o consumo de matéria seca e o ganho de peso.

O CAR por definir a habilidade dos animais aproveitarem melhor as fontes de alimentos para características de ganho de peso corporal, pela variação na ingestão de energia metabolizável e nos custos energéticos com manutenção e incremento calórico, já que animais de CAR negativo consomem menos alimento que o estimado para o seu peso corporal e ganho de peso, proporcionando valores mais favoráveis para as características de eficiência alimentar (Tabela 1). Segundo Basarab et al. (2003) ao contrário da conversão alimentar, a seleção para CAR elege animais de menor ingestão e menores exigências para manutenção, sem mudanças no peso adulto ou no ganho de peso, resultados semelhantes aos do presente estudo, uma vez que não se observaram diferenças para as características de desempenho entre as classes de CAR.

Os animais de baixo CAR apresentaram menores valores para conversão alimentar concordando com o resultado encontrado por Berry e Crowley (2012), avaliando parâmetros fenotípicos e genéticos para diferentes medidas de eficiência alimentar em diferentes raças de bovinos de corte, relataram que animais mais eficientes tiveram menor conversão alimentar (Tabela 1).

Animais classificados para baixo CAR apresentaram maiores valores para CGR e GPR indicando que estes animais consumiram menos alimentos e apresentaram taxa de crescimento igual aos animais que consumiram mais alimentos como observado para os valores de TK e TCR, resultados parecidos foram observados por Kellyn et al. (2009). Entretanto, Berry e Crowley (2012) observaram que animais que apresentaram

maior eficiência alimentar tiveram um crescimento mais rápido (TK e TCR) que animais menos eficientes, e que houve tendência na melhoria da eficiência alimentar independente de qual característica de eficiência alimentar fosse utilizada CAR, CGR ou GPR.

Animais classificados para CAR não apresentaram diferenças para AOL durante o período de avaliação (Tabela 2). Os resultados deste trabalho concordam com os encontrados por Nukumah et al. (2007) que não observaram diferenças em bovinos classificados para CAR, entretanto não estão de acordo com Richardson et al. (2001) que verificaram diferenças entre animais CAR positivos e negativos para AOL, sendo que aqueles mais eficientes (CAR negativo) apresentaram menor espessura de gordura subcutânea, sugerindo que bovinos em crescimento mais eficiente, apresentam um ganho maior em proteína do que em gordura.

**Tabela 2.** Características de deposição tecidual de novilhos de corte classificados para Consumo Alimentar Residual (CAR).

Característica	Classificação CAR		EPM <sup>1</sup>	Pr >  t  <sup>2</sup>	SD <sup>3</sup>
	Eficiente (Baixo CAR)	Ineficiente (Alto CAR)			
AOLi (cm <sup>2</sup> )	66,44	66,09	1,44	0,80	5,15
AOLf (cm <sup>2</sup> )	82,42	83,07	1,73	0,71	6,27
AOLg (cm <sup>2</sup> )	16,45	16,97	2,05	0,79	7,22
EGSi (mm)	1,02	1,49	0,28	0,18	1,07
EGSf (mm)	3,92	5,55	0,43	0,001	1,77
EGSg (mm)	3,14	4,06	0,45	0,028	1,61
EGPi (mm)	2,56	3,56	0,50	0,03	1,73
EGPf (mm)	6,05	7,96	0,58	0,001	2,31
EGPg (mm)	3,49	4,4	0,47	0,049	1,74
EGSg <sub>corp</sub> (mm)	3,42	3,45	0,40	0,96	1,66
EGPg <sub>corp</sub> (mm)	3,83	4,16	0,41	0,39	1,45

AOLi – área de olho de lombo (cm<sup>2</sup>) no início do confinamento, AOLgf – área de olho de lombo (cm<sup>2</sup>) no final do confinamento, AOLg – ganho em área de olho de lombo (cm<sup>2</sup>), EGSi – espessura de gordura na 13ª costela (mm) no início do confinamento, EGSf – espessura de gordura na 13ª costela (mm) no final do confinamento, EGSg – ganho em espessura de gordura na 13ª costela (mm), EGPi – espessura de gordura na garupa (mm) no início do confinamento, EGPf – espessura de gordura na garupa (mm) no final do confinamento, EGPg – ganho em espessura de gordura na garupa (mm), EGSg<sub>corp</sub> – ganho em espessura de gordura na 13ª costela (mm) corrigida pela composição corporal, EGPg<sub>corp</sub> – ganho em espessura de gordura na garupa (mm) corrigida pela composição corporal.

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>Probabilidade do erro; <sup>3</sup>Desvio Padrão.

Foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) para o ganho em espessura de gordura subcutânea (EGS<sub>g</sub> e EGP<sub>g</sub>) e variações no ganho de gordura corporal em animais divergentes para CAR (Tabela 2). Estes resultados indicam variabilidade fenotípica para estas características, sugerindo que a classificação de animais para CAR deve ser ajustada para características de deposição corporal, para que a seleção de animais mais eficientes não proporcione redução na deposição de tecido adiposo. Resultados semelhantes foram observados por Basarab et al. (2003) que observaram ser necessário ajustar o CAR para as alterações na composição corporal utilizando ultrassonografia, devido a deposição tecidual estar relacionada com a variação do consumo de alimentos.

Os animais de baixo CAR apresentaram menor deposição de espessura de gordura, esse fator tem sido alvo de preocupação entre os estudiosos, já que poderá levar a uma depreciação da qualidade da carcaça (Tabela 2). A gordura subcutânea tem grande importância para a maciez da carne bovina, por evitar a queda brusca de temperatura, e conseqüentemente, o encurtamento de fibras musculares pelo frio (Zorzi et al., 2013; Duarte et al., 2013), assim, tem sido proposto que o consumo predito seja calculado também em função da espessura de gordura subcutânea (McDonagh et al., 2001).

A estimativa do CAR, levando em consideração a deposição de gordura corporal (média do ganho em espessura de gordura na EGS e EGP), não apresentou diferenças nas características de carcaça avaliadas por ultrassom de animais classificados para baixo e alto CAR, como observado antes do ajuste para composição corporal (Tabela 2). As diferenças observadas nas características de deposição de gordura corporal entre os grupos pode ser devido ao aumento desproporcional da energia necessária para a manutenção, decorrente de alterações no parcionamento energético e ao excesso de energia consumida pelos animais, que foi depositado como tecido adiposo. Quando foi realizado o ajuste, não foram observadas diferenças em deposição de tecido adiposo devido à ingestão de alimentos ter sido ajustada para deposição tecidual, resultados semelhantes foram observados por Kelly et al. (2010); Santana et al. (2012).

A inclusão de variáveis de composição corporal como fator de correção para avaliar a eficiência alimentar, evidenciou que animais classificados para consumo alimentar não apresentaram diferença significativa para deposição de tecido adiposo em animais classificados para alto e baixo CAR (Tabela 2). Arthur et al. (2004) observaram

que a inclusão da composição corporal reduziu as diferenças observadas na espessura de gordura nos animais classificados para CAR.

Devido às relações mais fortes entre o CAR e a composição da carcaça como observado em estudo, a inclusão de características de composição de carcaça para estimar o CAR pode ser útil para reduzir o impacto potencial da seleção para o CAR na qualidade de carcaça (Tabela 2). Esta tendência também foi observada por Arthur et al. (2004); Basarab et al. (2003) em que a inclusão de características de composição de carcaça na estimação do CAR, apresentar um impacto mínimo sobre classificação de animais em crescimento em comparação com o uso de características de desempenho.

Animais classificados para baixo CAR apresentaram maiores concentrações plasmáticas de leptina (9,05) aos 90 dias de idade, consumindo menos alimentos em relação aos animais com alto CAR que apresentaram aproximadamente 25% a mais de ingestão de matéria seca (IMS) e menor concentração plasmática de leptina (7,66) (Tabela 3). A leptina apresentou relações com a regulação da ingestão de alimentos, podendo ser um fator importante na regulação do metabolismo energético. Ao contrário Kelly et al. (2009) não observaram diferenças na concentração da leptina em animais classificados para CAR.

**Tabela 3.** Expressão e concentração plasmática do gene leptina em bovinos Nelore selecionado para CAR.

Característica	Classificação CAR		EPM <sup>1</sup>	Pr >  t  <sup>2</sup>	SD <sup>3</sup>
	Eficiente (Baixo CAR)	Ineficiente (Alto CAR)			
Leptina90 (ng/mL)	9,05	7,66	0,99	0,024	2,52
Leptinaabt (ng/mL)	11,48	9,85	1,47	0,03	3,63
Leptina expressão	31,43	35,27	1,63	0,044	0,15

Leptina90 – concentração de leptina plasmática (ng/μL) aos 90 dias de confinamento; Leptinaabt – concentração de leptina plasmática (ng/μL) no momento do abate; Leptina expressão – expressão do gene leptina no musculo longissimus dorsi.

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>Probabilidade do erro; <sup>3</sup>Desvio Padrão.

Diferenças na concentração da leptina têm sido apontadas como um importante fator na regulação do metabolismo energético, comportamento no consumo de alimentos e reprodução em muitas espécies de animais ruminantes (Williams, 2002). Esta tendência foi observada neste estudo em que animais classificados para baixo CAR apresentaram maior quantidade de leptina circulante (Tabela 3).

Animais classificados para baixo CAR ( $-1,20 \text{ kg dia}^{-1}$ ) apresentaram maior expressão do gene leptina, cerca de 3,84 vezes em comparação aos animais classificados para alto CAR ( $1,33 \text{ kg dia}^{-1}$ ), refletindo no aumento da concentração plasmática dos animais no momento do abate (Tabela 3). Desta forma, animais que apresentaram maior concentração de leptina apresentaram redução na ingestão de alimentos, como observado em animais mais eficientes (baixo CAR) que foram 35,72% mais eficientes em comparação aos animais menos eficientes (alto CAR) em razão de consumirem menos que a quantidade necessária predita para um mesmo ganho de peso.

Concordando com resultados observados por Henry et al. (1999), a leptina administrada em ovelhas apresentou relações com a ingestão de alimentos, em que antes da administração os animais apresentavam consumo semelhante ao grupo controle e após a administração da leptina o consumo de alimento reduziu significativamente para estes animais, em que a leptina inibiu a ingestão de alimentos, mas não afetou nenhum dos parâmetros endócrinos.

Nesse estudo observou-se que devido ao baixo consumo de MS, os animais de baixo CAR apresentaram altas concentrações plasmáticas de leptina, indicando correlação negativa do CAR e CA com a leptina plasmática (Tabela 4). O consumo alimentar residual não apresentou correlação com o peso ou GMD, mas foi correlacionado ( $P < 0,001$ ) com IMS ( $r = 0,73$ ) e CA ( $r = 0,64$ ). A ingestão de matéria seca foi fortemente correlacionada ( $P < 0,001$ ), com GMD ( $r = 0,60$ ) e CGR ( $r = -0,67$ ), e apresentou correlação significativa com o ganho de espessura de gordura corporal. A conversão alimentar foi associada negativamente ( $P < 0,01$ ) com GMD ( $r = -0,72$ ). A análise de correlação indicou associação ( $P < 0,05$ ) entre o ganho de AOL e GMD ( $r = 0,33$ ), e não indicou associação com as características que determinam a eficiência alimentar em bovinos CAR, CA, EA, EAT, GPR e CGR. A deposição muscular está associada positivamente com o GMD devido ao maior ganho de peso dos animais estar relacionado com um aumento da massa muscular. Podendo-se considerar então, que os animais são mais eficientes em ganhar proteína do que gordura.

Os níveis de leptina no plasma (Tabela 4) apresentaram relação com as variáveis de eficiência alimentar (EA, CA, CAR, CGR) indicando que o aumento das concentrações da leptina apresentaram um melhor aproveitamento dos alimentos, indicando que o menor consumo de alimentos pode ter sido consequência da inibição do apetite pelos níveis elevados de leptina. No entanto, Brown et al. (2004) não

observaram correlações fenotípicas entre a concentração sérica de leptina com o crescimento, consumo de ração ou RFI.

A concentração plasmática da leptina apresentou relação com o menor consumo de alimentos e uma melhor eficiência da utilização do alimento sem alterar o GMD em bovinos avaliados para CAR (Tabela 4). Os resultados deste estudo indicaram que as relações entre os níveis de leptina e o consumo alimentar residual podem ser mais fortes do que a relação entre os níveis de leptina e consumo diário de ração.

**Tabela 4.** Correlações fenotípicas de características de desempenho e características de eficiência alimentar em animais classificados para Alto e Baixo CAR.

	PVI	PVF	IMS	IMSpv	EAT	GMD	EA	CA	CAR	GPR	CGR	TK	TCR	AOLg	EGSg	EGPg
Lep	-0,07	-0,08	-0,2	-0,16	0,04	0,08	0,22**	-0,22*	-0,31*	0,01	0,30*	0,01	-0,02	-0,07	0,11	0,22*
PVI		0,75**	0,72**	-0,04	0,13	0,002	-0,28	0,29**	-0,02	-0,32	-0,06	-0,22	-0,29	-0,01	0,08	0,15
PVF			0,72**	0,27*	0,66**	0,69**	0,30**	-0,28*	0,001	0,24*	0,06	0,49**	0,42**	0,14	0,16	0,1
IMS				0,88**	0,31**	0,67**	0,30**	-0,06	0,73**	-0,1	-0,67*	0,45**	0,42**	0,1	0,29**	0,34**
IMSpv					-0,05	0,44**	0,13	0,17	0,86**	-0,25	-0,77**	0,46**	0,46**	0,23	0,33*	0,29*
EAT						0,86**	0,89**	-0,90**	-0,60**	0,90**	0,69**	0,81**	0,79**	0,15	0,001	0,07
GMD							0,74**	-0,72**	0,03	0,70**	0,16	0,96**	0,90**	0,33*	0,14	0,16
EA								-0,97**	-0,60**	0,98**	0,66**	0,75**	0,74**	0,09	-0,04	-0,01
CA									0,64**	-0,97**	-0,75**	-0,70**	-0,70**	-0,08	0,03	0,01
CAR										-0,56**	-0,98**	-0,02	-0,01	0,08	0,34**	0,23
GPR											0,72**	0,69**	0,69**	0,09	-0,17	-0,03
CGR												0,17	0,17	-0,05	-0,33*	-0,21
TK													0,99**	0,32**	0,04	0,09
TCR														0,33*	0,04	0,08
AOLg															0,32**	0,05
EGSg																0,47**

\* P<0,05; \*\* P<0,01, LEP - concentração de Leptina plasmática (ng/mL), PVI – Peso vivo do animal no início do confinamento, PVF – Peso vivo do animal no final do confinamento, IMS – Ingestão de Matéria Seca, IMSpv – ingestão de matéria seca por peso vivo, EAT – Eficiência Alimentar Total, GMD – Ganho Médio Diário, EA – Eficiência alimentar, CA – Conversão Alimentar, CAR – Consumo Alimentar Residual, GPR – Ganho de Peso Residual, CGR – Consumo e Ganho Residual, TK – Taxa de Kleiber, TCR - Taxa de Crescimento Relativo, AOLg – ganho em área de olho de lombo (cm<sup>2</sup>), EGSg – ganho em espessura de gordura subcutânea (mm), EGPg – ganho em espessura de gordura sobre a garupa (mm).

A relação entre a leptina plasmática e o CAR ( $r = -0,31$ ) pode ser devida, segundo Catunda et al. (2004), à leptina proporcionar a diminuição no consumo de alimentos e aumento no gasto energético, pela inibição simultânea do NPY e do antagonista  $\alpha$ MSH do AgRP, e pela estimulação do  $\alpha$ MSH e CART quando esta se liga a neurônios específicos no hipotálamo.

A deposição de gordura apresentou relação ( $P < 0,01$ ) com a ingestão de matéria seca (IMS) (Tabela 4). Pode-se inferir que animais com maior IMS, consomem mais energia, proporcionando maior deposição de gordura corporal como observado na correlação positiva da IMS com  $EGS_g$  e  $EGP_g$ , indicando que em termos energéticos, a deposição de gordura é mais onerosa que a de proteína, uma vez que contém o dobro da energia contida na molécula e a faixa de peso vivo na qual o animal se encontra ou em que é terminado, afeta o consumo de alimentos em termos absolutos, e a eficiência da energia para as funções produtivas como observado nas correlações entre PVI e PVF com a IMS e IMS<sub>pv</sub>.

As correlações fenotípicas da leptina com medidas de ultrassom no presente estudo, estão de acordo com os resultados de Wegner et al. (2001), que observaram que a concentração de leptina plasmática não estava relacionada com medidas de ultrassom em cruzamentos de Wagyu; Geary et al. (2003) não observaram relações fenotípicas significativas de AOL com os níveis de leptina.

## **Conclusões**

Animais classificados para baixo CAR apresentaram maiores concentrações plasmática e expressão da leptina. Animais classificados para baixo consumo alimentar apresentaram redução na ingestão de matéria seca e conversão alimentar, melhorando a eficiência alimentar dos animais e uma maior expressão da leptina em bovinos classificados para baixo CAR. O aumento dos níveis de expressão gênica da leptina também foi acompanhado pelo aumento da concentração de leptina no plasma, entretanto não se observou influencia da leptina sobre características de gordura em animais classificados para alto e baixo CAR.

## Referências

- ARTHUR, P. F.; RENAND, G.; KRAUS, D. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science**, Rome, v.68, n.2-3, p. 131 – 139, 2001.
- ARTHUR, P.F.; ARCHER, J.A.; HERD, R.M. Feed intake and efficiency in beef cattle: Overview of recent Australian research and challenges for the future. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v.44, n.5, p.361–369, 2004.
- BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; AALHUS, J.L.; OKINE, E. K.; SNELLING, W. M.; LYLE, K. L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**. v.83, n.2, p.189-204, 2003.
- BERRY, D.P.; CROWLEY, J.J. Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. **Journal of Animal Science**, v.90, n.1, p.109-115, 2012.
- BIF. **Guidelines for Uniform Beef Improvement Programs**, 9th ed. Athens, GA: Beef Improvement Federation and University of Georgia, 2010. 183p.
- CHELIKANI, P.K.; GLIMM, D.R.; KENNELLY, J.J. Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. **Journal of Dairy Science**. v.86, n.7, p. 2369-2372, 2003.
- CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants. Nutritional and physiological regulations in relation of energy metabolism: a review. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, n.1, p. 3-22, 2005.
- DUARTE, M.S.; PAULINO, P.V.R.; DAS, A.K.; WEI, S.; SERAO, N.V.L.; FU, X.; HARRIS, S.M.; DODSON, M.V.; DU, M. Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. **Journal of Animal Science**. v.91, n.6, p. 2938-2946, 2013.
- GEARY, T.W.; MCFADIN, E.L.; MACNEIL, D.M.; GRINGS, E.E.; SHORT, R.E.; FUNSTON, R.N.; KEISLER, D.H. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. **Journal of Animal Science**. v.81, n.1, p.1–8, 2003.

HENRY, B.A.; ANDREWS, Z.B.; RAO, A.; CLARKE, I.J. Central Leptin Activates Mitochondrial Function and Increases Heat Production in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v.152, n.7, p. 2609–261, 2011.

JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis. II. Real data. **Applied Statistics**, v.22, n.1, p.21-31, 1973.

KELLY, A. K.; MCGEE, M.; CREWS, D. H.; FAHEY JR., A. G.; WYLIE, A. R.; KENNY, D. A. Effect of divergence in residual feed intake on feeding behavior, blood metabolic variables, and body composition traits in growing beef heifers. **Journal of Animal Science**. v.88, n.1, p. 109-123, 2010.

McDONAGH, M. B.; HERD, R. M.; RICHARDSON, E. C.; ODDY, V.H.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F. Meat quality and the calpain system of feedlot steers following a single generation of divergent selection for residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v.41, n.7, p. 1013–1021, 2001.

MACAJOVA, M., LAMOSOVA, D., ZEMAN, M. Role of leptin in farm animals: a review. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, p. 157-166, 2004.

MONTANHOLI, Y. R. Genetic improvement in beef cattle for feed efficiency: increasing our understanding of the biological Basis. **Proceedings... Beef Improvement Federation, 39 Annual Research Symposium & Annual meeting Fort 25. Collins, Colorado. Department of Animal & Poultry Science, Guelph, 2007.**

OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.K.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L. SOKYMOS, P.; HENRY, M.; STEVENS, H.; WAGNER, H. vegan: **Community Ecology Package**. 2013.

PAIVA, A.L.C.; TEIXEIRA, R.B.T.; YAMAKI, M.Y.; MENEZES, G.R.O.; LEITE, C.D.S.; TORRES, R.A. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. **Revista Brasileira Zootecnia**. v.39, n.2, pp. 285-288, 2010.

REN, M.Q.; WEGNER, J.; BELLMANN, O.; BROCKMANN, G.A.; SCHNEIDER, F.; TEUSCHER, F.; ENDER, K. Comparing mRNA levels of genes encoding leptin, leptin

receptor, and lipoprotein lipase between dairy and beef cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n.3, p. 371-381, 2002.

RICHARDSON, E.C.; HERD, R.M.; ODDY, V.H.; THOMPSON, J. M.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F. Body composition and implications for heat production of Angus steers progeny of parents selected for and against residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.41, n.7, p.1065-1072, 2001.

SANTANA, M. H. A.; Rossi, P.; ALMEIDA, R.; CUCCO, D.C. Feed efficiency and its correlations with carcass traits measured by ultrasound in Nellore bulls. **Livestock Science**, v.145, n.1-3, p. 252-257, 2012.

STEIBEL, J.P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P.M.; ROSA, G.J.M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**. v.94, n.2, p. 146-152, 2009.

WEGNER, J.; HUFF, P.; XIE, C. P.; SCHNEIDER, F.; TEUSCHER, F.; MIR, P. S.; MIR, Z.; KAZALA, E. C.; WESELAKE, R. J.; ENDER, K. Relationship of plasma leptin concentration to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle. **Canadian Journal Animal Science**. v.81, n.4, p. 451–457, 2001.

WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M. R. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**. v.23, n.1-2 p.1-11, 2002.

YONEKURA, S.; KITADE, K.; FURUKAWA, G.; TAKAHASHI, K.; KATSUMATA, N.; KATOH, K.; OBARA, Y. Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and CCK receptors in the calf rumen and abomasum. **Domestic Animal Endocrinology**, v.22, n.1, p. 25-35, 2002.

ZORZI, K.; BONILHA, S.F.M.; QUEIROZ, A.C.; BRANCO, R.H.; SOBRINHO, T.L.; DUARTE, M.S. Meat quality of young Nellore bulls with low and high residual feed intake. **Meat Science**. v.93, n.3 , p. 593-599, 2013.

## Artigo 2 - Proteômica de músculo esquelético em bovinos Nelore classificados para Consumo Alimentar Residual

### Resumo

Objetivou-se avaliar mudanças no proteoma do músculo *Longissimus dorsi* em bovinos Nelore classificado para alto e baixo consumo alimentar residual e verificar a influência dessas mudanças no consumo de alimento. Foi utilizado um total de 97 animais classificados para alto e baixo consumo alimentar residual (CAR), medidos para características de eficiência alimentar. Foram abatidos 20 animais classificados para alto e baixo CAR e coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, para análise proteômica. As amostras de proteínas extraídas do músculo *Longissimus dorsi* foram separadas em duas etapas: a primeira foi realizada por migração eletroforética em tira de IPG (Immobilized pH Gel) até o ponto isoelétrico e a segunda por gel de acrilamida de acordo com o peso molecular (segunda dimensão; 2-D). Após as análises dos géis 2-D, os *spots* diferencialmente expressos nos grupos de CAR foram excisados e tripsinizados para análise por dessorção a laser assistida por matriz MALDI TOF/TOF. Foram observados sete *spots* diferencialmente expressos em animais classificados para baixo e alto CAR, indicando que a maior expressão de proteínas relacionadas ao tipo de tecido muscular apresentou adaptação do músculo para a quantidade de alimento que o animal ingere, resultando em diferença na eficiência do aproveitamento do alimento. Os animais classificados para baixo CAR apresentaram diferenças de 3,31 kg MS/dia na ingestão de matéria seca, e maior valores para as variáveis de eficiência alimentar EA 35% e EAT 12% e redução de 21% na conversão alimentar em comparação aos animais classificados para alto CAR. Foram observadas diferenças na expressão da miosina de cadeia leve 1 (MYL1) em que os animais classificados para baixo CAR apresentaram expressão de 3,34 vezes maior quando comparado com bovinos classificados para alto CAR. Fenótipos selecionados para baixo CAR apresentou relação com genes associados com o desenvolvimento da fibra muscular, função muscular e organização do citoesqueleto.

**Palavras-chave:** análise proteômica, bovino de corte, eficiência alimentar, metabolismo muscular, tipos de fibras

## **Article 2 – Proteomics analysis of *Longissimus dorsi* muscle in Nellore animals classified for residual feed intake classes**

### **Abstract**

The objectives were to evaluate changes in *Longissimus dorsi* muscle proteome in high and low RFI Nellore animals. A total of 97 animals, classified for high and low RFI, measured for feed efficiency, was utilized. Twenty animals classified for high and low RFI were slaughtered, and *Longissimus dorsi* muscle was sampled to analyze proteomics. Protein samples were separated into two stages: the first stage of proteins separation was performed by electrophoretic migration in IPG (Immobilized pH Gel) strip until the isoelectric point and the second protein separation, was performed in acrylamide gel according to the molecular weight (second dimension). After analysis of 2-D gels, *spots* differentially expressed in RFI groups were excised for analysis by laser desorption assisted by MALDI TOF / TOF matrix. Differences in intensity of seven *spots* differentially expressed in high and low RFI animals were observed, indicating that the greater expression of proteins related with the muscle tissue type affect the amount of feed the animal consumes, resulting in difference in feed efficiency. Proteins related with light-chain Myosin and Troponin I, and Hemoglobin, which differences in the metabolism of skeletal muscle presented as a major factor that contributes to differences in metabolism. The greater expression of slow-twitch fibers in more efficient cattle is due to preferential reduction of the fast twitch muscle fibers, as an adaptation to better deal with reduced nutritional requirement because it shows differences in the metabolic profile of muscle contraction.

**Key words:** beef cattle, feed efficiency, fiber types, muscle metabolism, proteomic analysis

## Introdução

Com o intuito de aumentar a eficiência da bovinocultura, muitas medidas de eficiência alimentar vêm sendo propostas, sendo o consumo alimentar residual (CAR) uma delas. Animais que são classificados como mais eficientes para o CAR possuem valores negativos para essa medida, representando animais que necessitam de menos nutrientes para sua manutenção e taxa de crescimento e, conseqüentemente, que ingerem menos alimento que o estimado para o seu peso vivo e ganho de peso em comparação a outros animais com características de peso e ganho em peso semelhantes.

As variações do CAR em animais ocorrem por diversos fatores metabólicos (Barendse et al., 2007; Moore et al., 2005; Sherman et al., 2008), os principais mecanismos fisiológicos que influenciam a variação no CAR estão relacionados às exigências de manutenção, transporte de íons, resposta ao estresse, metabolismo dos tecidos e incremento calórico (Basarab et al., 2003; Richardson et al., 2004). O transporte iônico e o turnover proteico teoricamente teriam grande influência na eficiência alimentar, isso porque esses processos estão relacionados com os requerimentos de manutenção dos bovinos.

Dentre as ferramentas moleculares, a proteômica vem sendo utilizada na tentativa de elucidar o papel das proteínas na determinação de características de interesse econômico, visando à compreensão da função dos genes e na caracterização de processos moleculares da célula (Bendixen et al., 2011; Zhao et al., 2010). A ingestão alimentar, assim como as medidas de eficiência alimentar e os mecanismos que proporcionam diferenças na ingestão de alimentos são dependentes de diversos processos biológicos somados a efeitos ambientais.

As proteínas são componentes essenciais em uma diversidade de aspectos metabólicos em todos os seres vivos, desde papéis estruturais para a regulação do metabolismo energético, à tolerância a resposta de certas doenças. Sendo componentes essenciais de caminhos complexos da matriz bioquímica e metabólica que definem qualquer organismo e a sua biologia (Lippolis e Reinhardt, 2008). O estudo do proteoma é, portanto, de extrema importância para compreender os aspectos bioquímicos e fisiológicos da biologia animal e sua relação com aspectos produtivos (Bendixen et al., 2011).

O estudo do proteoma permite obter informação sobre os perfis de expressão das proteínas, quer referentes à sua abundância e localização, ou ainda a modificações químicas ou interações. As técnicas mais utilizadas são as que recorrem à separação das proteínas de acordo com os seus pontos isoelétricos na primeira dimensão e de acordo com seus pesos moleculares por eletroforese bi-dimensional, combinada com a sua posterior identificação através de métodos de espectrometria de massa (Soares et al., 2012). O objetivo deste estudo foi identificar mudanças no proteoma do músculo *longissimus dorsi* em bovinos Nelore classificado para alto e baixo consumo alimentar residual e verificar a influência dessas mudanças no consumo de alimentos.

## **Material e métodos**

### **Animais**

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA / USP), Pirassununga, SP, Brasil; e no Núcleo de Análise de Biomolécula (NuBioMol), CCB/UFV MG. Foram utilizados 97 animais machos da raça Nelore (*Bos indicus*), com média de 404,19±30,49 kg de peso vivo no início do experimento e 584,54±29,84 dias de idade, classificados para alto e baixo consumo alimentar residual (CAR).

Os animais foram mantidos em confinamento durante o período experimental de 126 dias, alocados em baias individuais (n=50 animais) e em baias coletivas equipadas com sistema de portão eletrônico do tipo *calan gate* (n=47 animais), contendo bebedouro e cocho para cada animal. Antes da avaliação do CAR, os animais passaram por um período de adaptação às instalações e à dieta, por 20 dias. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia na forma de dieta total misturada, com acesso *ad libitum* à dieta e água.

### **Consumo Alimentar Residual**

O consumo alimentar residual (CAR) foi obtido com base na seguinte equação de regressão múltipla:

$$\text{MS consumida (kg/d)} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Média PC}^{0,75} + \beta_2 \text{ GMD} + \varepsilon;$$

onde “ $\beta_0 + \beta_1 \text{ Média PC}^{0,75} + \beta_2 \text{ GMD}$ ” representa o consumo de MS esperado,  $\text{PC}^{0,75}$  o peso metabólico médio durante o experimento e GMD a média de ganho de peso diário. Dessa forma,  $\varepsilon$  representa o CAR (consumo de MS real menos o consumo de MS esperado). Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com seus valores de CAR individuais. Animais com valores de CAR superiores à média mais 0,5 desvios padrão (DP), foram classificados como novilhos de alto CAR e animais com valores de CAR abaixo da média menos 0,5 DP, foram classificados como o grupo de baixo CAR.

Para avaliação do consumo voluntário da dieta, foi feita a diferença entre o alimento fornecido e as sobras. Foi realizado o ajuste da sobra do consumo para que correspondesse de 5 a 10% do total de alimento oferecido diariamente, de forma a garantir alimentação *ad libitum* para todos os animais.

### **Abate e coleta de tecidos**

No final, após 126 dias de confinamento, do período de avaliação da eficiência alimentar foram abatidos 20 animais no Matadouro Experimental da Universidade de São Paulo, após jejum de água e sólidos por 16 horas. Os animais foram atordoados e abatidos seguindo a regulamentação técnica dos métodos de atordoamento para abate humanitário. Imediatamente após o abate, foram retiradas 20 amostras, 10 amostras de animais classificados para baixo e 10 para alto consumo alimentar residual (CAR). Foram coletadas as amostras do músculo *Longissimus dorsi*, as quais foram imediatamente imersas em solução de estabilização de RNA (RNAholder – Bioagency, São Paulo/SP, Brasil), numa relação peso:volume de 1:10, com objetivo de estabilizar a síntese e a degradação de RNA. As amostras imersas em RNAholder foram identificadas e mantidas overnight a 4°C. Após 24 h de armazenamento, as amostras foram transferidas e conservadas a -20°C até a data de extração de proteínas.

### **Extração de proteínas**

As amostras de proteínas foram extraídas do músculo *Longissimus dorsi* de acordo com método modificado por Toriyama (2013) em que foram selecionados quatro animais classificados com os maiores e os menores valores no ranking na classificação de

alto e baixo CAR em bovinos Nelore. Aproximadamente 100 mg de músculo foram macerados em cadinho contendo nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Em seguida foi adicionado 1 mL de tampão de extração de proteínas contendo: 7 M ureia; 2 M tiouréia; 4% CHAPS; 3-3 [(cholamidopropyl) dimethylammonio] 1-propanosulfonato, 1% dithiothreitol (DTT), 2% tampão immobilized pH gradiente (IPG) pH 3 a 10; 10 µL benzamidine hydrochloride hydrate e 10 µL phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). A mistura resultante foi transferida para tubos de 2 mL e sonicada 6 vezes, durante 15 segundos cada, e então incubada por 60 minutos à temperatura ambiente (20°C) agitando no vórtex a cada 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 45 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e estocado à -70°C até análise.

A concentração de proteína foi determinada usando o kit de quantificação Plus One 2-D Quant Kit (GE Healthcare Bio-Sciences, USA).

### **Electroforese em gel bidimensional**

A primeira etapa de separação das proteínas foi realizada por migração eletroforética em tira de IPG (Immobilized pH Gel) até o ponto isoeletrico, ou seja, até o valor de pH em que ocorre o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas dos grupamentos iônicos da proteína. Para a separação das proteínas por ponto isoeletrico, as amostras foram solubilizadas em solução de reidratação contendo 7 M uréia, 2 M tiouréia, 1% DTT, 2% CHAPS, 1% IPG buffer pH 3 a 10 e 0,001% de azul de bromophenol. As misturas foram então centrifugadas a 20.000 x g por 15 minutos a 20°C e o sobrenadante usado para reidratação das tiras de IPG (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden).

As tiras de IPG de 24 cm, pH 3 a 10, foram hidratadas em 450 mL desta solução de proteína por 12h em IPGbox (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden) à temperatura ambiente. Foram utilizados 800 µg de proteína em cada tira de IPG para géis analíticos. Cada amostra foi analisada em 3 repetições, totalizando 3 tiras de IPG por tratamento (replicatas técnicas).

As tiras de IPG foram submetidas à focalização isoeletrica utilizando IPGphor 3 (GE Healthcare Bio-Sciences) a 20°C. A programação de corrida ocorreu em 5 etapas: a primeira e a segunda no método *step* com 300 e 500W respectivamente, a terceira e a

quarta no método *grad* com 1000 e 10000W respectivamente e na quinta no método *step* com 10000w.

Após a focalização, as tiras foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em tubos plásticos de equilíbrio até o momento da utilização das tiras.

A segunda etapa de separação das proteínas foi realizada pela migração eletroforética das proteínas focalizadas na tira de IPG, em gel de acrilamida de acordo com o peso molecular, na chamada segunda dimensão. As tiras de IPG focalizadas foram equilibradas em solução para posterior corrida eletroforética. As tiras de IPG permaneceram sob agitação constante por 15 minutos em solução de equilíbrio contendo 6 M de uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 50 mM Tris pH 8.8 e 1% DTT e em seguida, equilibradas por 15 minutos em solução semelhante, exceto que o DTT foi substituído por 4% de iodoacetamida.

O gel de corrida 2D utilizado apresentou 1,0 mm de espessura e malha de 12,5%, contendo acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% persulfato de amônio e TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine).

A corrida da segunda dimensão foi realizada com amperagem constante e voltagem livre a temperatura constante ( $\sim 8^{\circ}\text{C}$ ) para evitar aquecimento. Essa etapa foi realizada em duas fases passo 1 foi utilizado uma amperagem de 80V por 1h e o passo 2 foi utilizado uma amperagem de 500V por 4:30 à 6h. A amperagem baixa no passo 1 permitiu que as proteínas percorressem no gel de acordo com o ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico (pI), representa o valor de pH onde a proteína, apresenta carga elétrica líquida igual a zero. O pI é o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos da proteína.

Após a corrida, foram adicionados aos géis o volume de 300 mL de solução de fixação (10% ácido acético e 40% etanol) e submetidos à agitação leve *overnight*, perfazendo um total de 24 horas.

O procedimento de coloração dos géis foi realizado utilizando o Coomassie Coloidal Blue G-250: 8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% Coomassie Blue G-250, 20% metanol em 500 mL. Os géis permaneceram na solução por 48 horas. Após este período, os géis foram armazenados em 300mL de solução de ácido acético 5% até análise de imagem.

## Imagem e análise dos dados

Os géis 2D foram digitalizados no Programa LabScan (GE Healthcare Bio-Sciences, USA), versão 3.0 a 300 pontos/polegada e a detecção do spot (ponto de proteína) e quantificação foram analisadas pelo Image Master 2D Platinum, software versão 7.0 da GE Healthcare Bio-Sciences, USA.

Os parâmetros de detecção foram: área mínima de 10 pixels, fator plano (*smooth factor*) 2.0 e saliência 100.0. Foi criado um gel de referência a partir de um gel virtual, resultado da combinação de todos os *spots* presentes nas replicatas dos géis. Este gel de referência foi usado para comparação dos *spots* das proteínas correspondentes nos outros géis. Para análise comparativa das imagens, as replicatas foram agrupadas depois que a intensidade dos *spots* fosse comparada individualmente. As mudanças nos padrões dos *spots* entre os diferentes grupos de eficiência alimentar foram individualmente confirmadas. Os dados foram analisados por meio do teste t de Student, a 5% de probabilidade para avaliar a diferença de expressão de cada proteína entre os grupos de eficiência alimentar.

## Identificação da proteína

Os *spots* diferencialmente expressos foram excisados dos géis, a tripsinização foi realizada utilizando o método descrito por Shevchenko et al., (2006). A identificação das proteínas foi realizada por meio de dessorção a laser assistida por matriz / ionização-tempo de voo de espectrometria de massa MALDI-TOF / TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization). A solução da amostra foi aplicado à matriz solução ácida de  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em acetonitrila 50% e 0,1% de TFA) sobre a placa do MALDI-TOF/TOF (chapa de aço MTP Anchor Chip TM 600/384 TF, Bruker Daltonics). Os espectros de MALDI-TOF foram calibrados utilizando sinais de peptídeos suíno tripsina SIGMA e sinais de íons da matriz pelo Bruker Daltonics flexAnalysis Software; a análise no MALDI foi realizada por um sistema de controle de feedback (sistema Ultraflex III MALDI TOF / TOF, Bruker, Alemanha). A análise de MALDI-TOF / TOF foi realizada com o método Refletivo Positivo de Peptídeo. Massas de peptídeos foram pesquisados no banco de dados do NCBI e SwissProt com 0,5 de erro utilizando o programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>) e pesquisa no banco

de dados do MASCOT Peptide Mass Fingerprinting. As variáveis da pesquisa inicial para a análise de MS permitiu uma única clivagem da tripsina, nenhuma restrição sobre a massa protéica, carbamidomethyl (C) para modificações fixas, oxidação (M) para modificações de variáveis, a tolerância para a massa do peptídeo de 0,5 e no espaço de busca taxonômica foi restrito a mamíferos. A identificação da proteína por análise MS/MS (MALDI-TOF/TOF) foi realizada utilizando o método de LIFT. Os íons de péptidos foram pesquisados em comparação ao NCBI e Banco de dados SwissProt com 0,5 de erro utilizando o programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>) e MASCOT MS / MS Ions Search database.

### **Análise estatística**

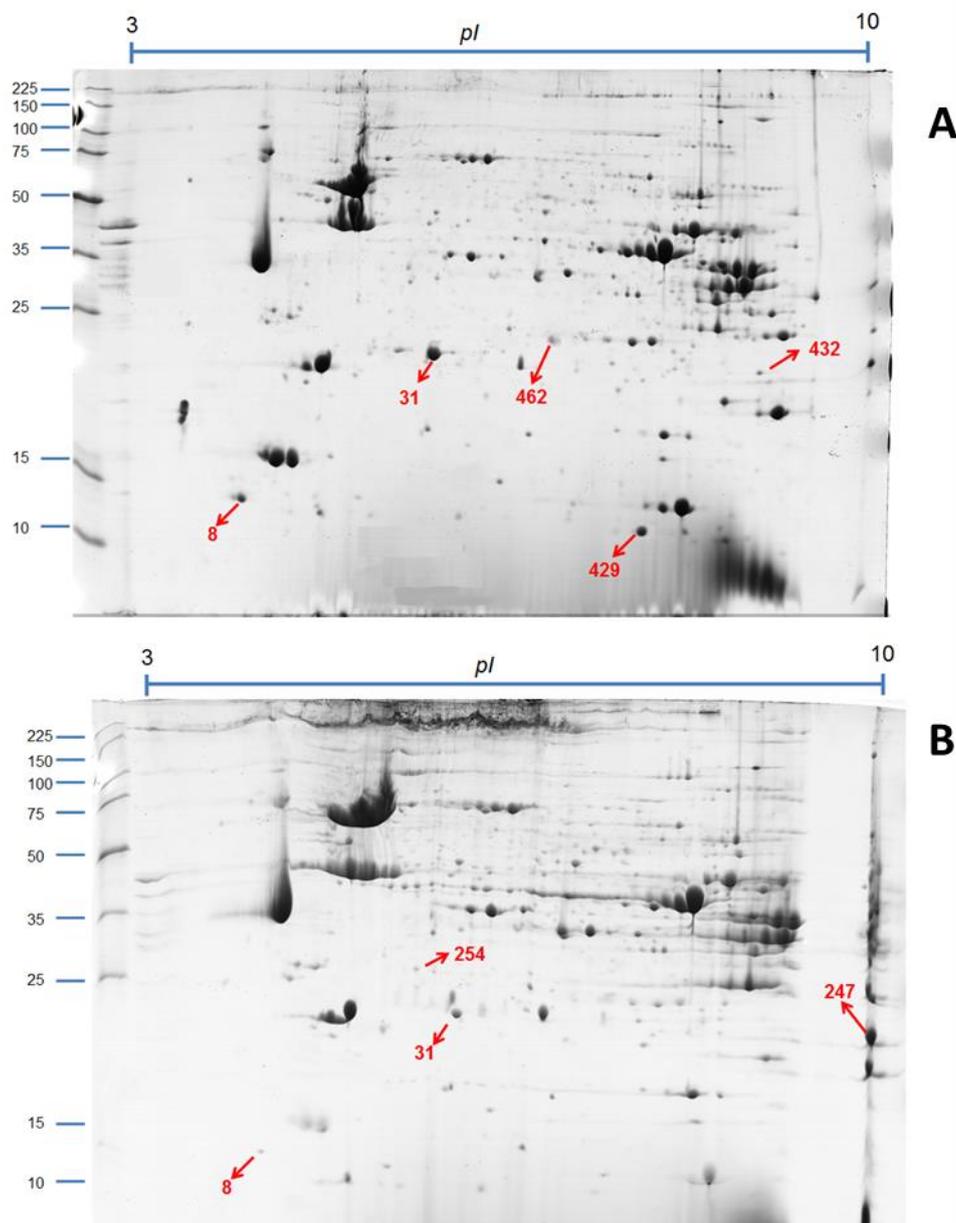
Dados de eficiência alimentar foram analisados utilizando o procedimento Proc Mixed do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3). Com efeito fixo de classe de consumo alimentar e efeito aleatório de animal:  $y_{ij} = \mu + a_i + b_j + \varepsilon_{ij}$ , em que:  $y_{ij}$  = valor observado da característica na classe CAR  $i$ , no animal  $j$ ;  $\mu$  = média geral;  $a_i$  é o efeito fixo da classe de CAR;  $b_j$  é o efeito aleatório de animal dentro da classe de CAR;  $\varepsilon_{ij}$  é o erro aleatório. Na análise diferenças com  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **Resultados e Discussão**

Os resultados do proteoma do músculo *Longissimus dorsi* indicam diferenças do perfil de fibra muscular em resposta a seleção para CAR, em que essa seleção apresenta mudanças na abundância de proteínas, além de isoformas de algumas proteínas. A explicação para as diferenças de fenótipos selecionados para CAR podem ser por fatores, que incluem o turnover proteico, o estresse (Bottje et al, 2006; Bottje e Carstens, 2009;. Grubbs et al, 2013), e potencialmente, outras organelas celulares e a resposta fisiológica.

Foram observadas diferenças na expressão de *spots*, detectados em géis de animais classificados para alto e baixo CAR nas análises de imagem (Figura 1). Os spots detectados foram normalizados expressando a quantidade relativa de cada local como a razão de intensidade individual no gel de referência. De acordo com a diferença entre os animais classificados para alto e baixo CAR um total de 7 *spots* de proteínas foram significativos por análise de variância  $P < 0,05$  e estavam em regiões favoráveis

para serem excisados. Dentre os *spots* de proteínas selecionados, 2 *spots* apresentaram maior expressão nos animais de baixo CAR; três *spots* estavam presentes apenas nos animais classificados para baixo CAR e 2 *spots* estavam presentes apenas nos animais de alto CAR.



**Figura 1.** Imagens de gel bidimensional de bovinos Nelore classificados para baixo (A) e alto (B) CAR, separada através de tiras de IPG pH 3-10 na primeira dimensão (24 centímetros, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) e gel de 12,5% SDS na segunda dimensão. As setas indicam as proteínas diferencialmente expressas (*spots*) ( $P < 0,05$ ) usando o software Image Master 7.0.

Os *spots* apresentaram padrões de expressão diferentes entre os grupos de eficiência alimentar, em que os *spots* 432, 462 e 429 foram identificados apenas nos animais classificados para baixo CAR e os *spots* 254 e 247 em animais classificados para alto CAR.

Diferenças observadas na intensidade de 7 *spots* para animais classificados para baixo e alto CAR, indicaram que a maior expressão destas proteínas afetaram de forma significativa para as diferenças na quantidade de alimento que o animal ingere, resultando em diferentes eficiências no aproveitamento do alimento para as características de crescimento (Figura 1). Os animais classificados para baixo CAR apresentaram diferenças de 3,31 kg MS/dia na ingestão de matéria seca, e maior valores para as variáveis de eficiência alimentar EA 35% e EAT 12% e redução de 21% na conversão alimentar em comparação aos animais classificados para alto CAR (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características de eficiência alimentar em bovinos Nelore classificados para classe de Consumo Alimentar Residual (CAR).

Característica	Classificação CAR		EPM <sup>1</sup>	Pr >  t  <sup>2</sup>	SD <sup>3</sup>
	Eficiente (Baixo CAR)	Ineficiente (Alto CAR)			
EA	0,19	0,14	0,01	0,0021	0,029
EAT	0,86	0,77	0,02	0,0015	0,14
CA	5,38	6,88	0,23	0,01	1,01
CAR kg MS/dia	-1,46	1,85	0,13	0,0001	1,16

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>Probabilidade do erro; <sup>3</sup>Desvio Padrão.

Os resultados da análise de imagem indicaram que houve alteração na intensidade e a identificação de alguns *spots* em função da classe de consumo alimentar residual. Estas diferenças quanto à intensidade da expressão de determinadas proteínas observadas, mesmo que os animais sejam da mesma espécie, podem influenciar diretamente nos fatores biológicos que podem ocasionar variação no CAR.

O spot 8, miosina de cadeia leve, apresentou maior intensidade nos animais classificados para baixo CAR. Em estudo avaliando SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) associados com a eficiência alimentar em bovinos de corte, Serão et al. (2013), observaram que a região do íntron referente ao gene miosina estava localizado numa região previamente associado com o CAR (Tabela 2). Esta proteína atua em

processos biológicos relacionados com a motilidade, com a contração do músculo liso vascular e regulação do citoesqueleto de actina.

Foram observadas diferenças na expressão de proteínas relacionadas com o tipo de tecido muscular em bovinos classificados para alto e baixo CAR, pelo tecido muscular apresentar plasticidade de adaptação em resposta a uma série fatores fisiológicos, que alteram suas características fenotípicas, proporcionando melhor adaptação funcional a diversos estímulos (Tabela 2). Estas adaptações musculares são respostas adaptativas da fibra muscular ao metabolismo oxidativo, onde alguns autores relatam estar relacionada ao aumento no número e tamanho das mitocôndrias, aumento na expressão e na atividade de enzimas do metabolismo energético de vias bioquímicas como glicólise, glicogenólise, ciclo de Krebs, aumento na capacidade de armazenamento de substratos energéticos e na síntese protéica (Bottje & Carstens, 2008; Hocquette, 2010; Schiaffino et. al, 2013) .

No presente estudo foi observado que animais classificados para baixo CAR apresentaram hemoglobina (spot 429) no tecido muscular. Esta proteína pode estar associada com diferenças nas taxas de respiração mitocondrial, pois a hemoglobina apresenta a capacidade de ligar-se a 4 moléculas de oxigênio, favorecendo a fosforilação oxidativa. Do mesmo modo, Kolath et al. (2006) avaliando a relação entre a função mitocondrial e consumo alimentar residual em novilhos Angus, observaram alterações na taxa de respiração mitocondrial, sendo que animais classificados para baixo CAR apresentam maiores valores em comparação com animais classificados para alto CAR. Estes resultados indicam que, o aumento da oferta de oxigênio relaciona-se com adaptações diretamente envolvidas na função mecânica da fibra muscular, tendendo a uma melhora da contração e geração de força, permitindo assim, que as fibras da musculatura esqueléticas se adaptem as diferenças nas exigências de manutenção.

De acordo com os resultados encontrados, o tipo de fibra muscular está relacionado com a intensidade de expressão dos genes relacionados com o ganho e com a composição corporal, podendo influenciar a eficiência aparente da utilização dos nutrientes e indicar diferenças na regulação fisiológica da ingestão, no crescimento, e particionamento energético. (Bottje e Carstens, 2009; Bottje e Kong, 2012).

Foram observadas diferenças de proteínas relacionadas à contração muscular como miosina de cadeia leve em animais de baixo CAR e troponina I em animais de alto CAR (Tabela 2). Segundo alguns autores diferenças no metabolismo do músculo

esquelético contribuem como um dos principais fatores para diferenças no metabolismo energético favorecendo uma melhoria na eficiência alimentar (Bottje e Carstens, 2009; Bottje e Kong, 2012; Bottje et al., 2013).

**Tabela 2.** Proteínas diferencialmente expressas em músculo esquelético de (espécie do bovino), submetidos às condições controle e tratado, identificadas por MALDI TOF/TOF e software MASCOT

spot	Nome da Proteína / (Organismo)	Grupo Expresso	Banco de dados / Entradas	Número de acesso	Score de identificação (MS/MS)	Prob. (1)	Cobertura da sequência (%)	Teórico		Experimental		NPIV (3)	Sequência dos peptídeos	Prob. (2)
								Massa molecular	Ponto isoelétrico	Massa molecular	Ponto isoelétrico			
8	Miosina – Subunidade de cadeia leve 1 (Myosin: Subunit = light chain 1) / ( <i>Bos taurus</i> )	Baixo CAR	NCBIInr / Todas	gi 1096612	258	99%	19	18785	4.72	13114	4.19	1	(K)DQGT <del>Y</del> EDFVEGLR(V)	100%
8	Miosina de cadeia leve 1/3 (Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform OS=Bos taurus GN=MYL1 PE=2 SV=1) / ( <i>Bos taurus</i> )	Baixo CAR	SwissProt / Todas	MYL1_BOVIN	258	100%	16	21033	4.96	13114	4.19	3	(K)EAFLLFDR(T)	94%
													(K)ITLSQVGDVLR(A)	99%
													(K)DQGT <del>Y</del> EDFVEGLR(V)	100%
													(K)VEVVDEERYDIEAK(C)	100%
247	Troponina I (troponin I, slow skeletal muscle) / ( <i>Mus musculus</i> )	Alto CAR	NCBIInr / Todas	gi 10946862	154	100%	19	21878	9.63	21050	9.66	3	(R)GLSLSALQDL <del>C</del> R(E)	100%
													(K)ERPVEVGDWR(K)	90%
													(K)VEVVDEERYDIEAK(C)	100%
247	Troponina I (Troponin I, slow skeletal muscle OS=Homo sapiens GN=TNNI1 PE=1 SV=3) / ( <i>Homo sapiens</i> )	Alto CAR	SwissProt / Todas	TNNI1_HUMAN	194	100%	19	21850	9.61	21050	9.66	3	(R)GLSLSALQDL <del>C</del> R(E)	100%
													(K)ERPVEVGDWR(K)	99%
													(R)FFESFGDLSTADAV <del>M</del> N <del>N</del> PK(V)	100%
429	Beta hemoglobina (hemoglobin beta) / ( <i>Bos taurus</i> )	Baixo CAR	NCBIInr / Todas	gi 294459577	380	100%	32	16026	6.36	11245	7.99	3	(K)LLGNV <del>L</del> VV <del>L</del> AR(N)	100%
													(R)NFGNEFTPVLQADFQK(V)	100%
													(R)FFESFGDLSTADAV <del>M</del> N <del>N</del> PK(V)	100%
429	Subunidade beta da hemoglobina (Hemoglobin subunit beta-A OS=Bos javanicus PE=1 SV=1)	Baixo CAR	SwissProt / Todas	HBBA_BOSJAV	332	100%	30%	16011	6.36	11245	7.99	3	(K)LLGNV <del>L</del> VV <del>L</del> AR(N)	100%
													(K)VVAGVANAL <del>A</del> HR(Y)	95%

Legenda: (1) Probabilidade de identificação para proteína (Scaffold)

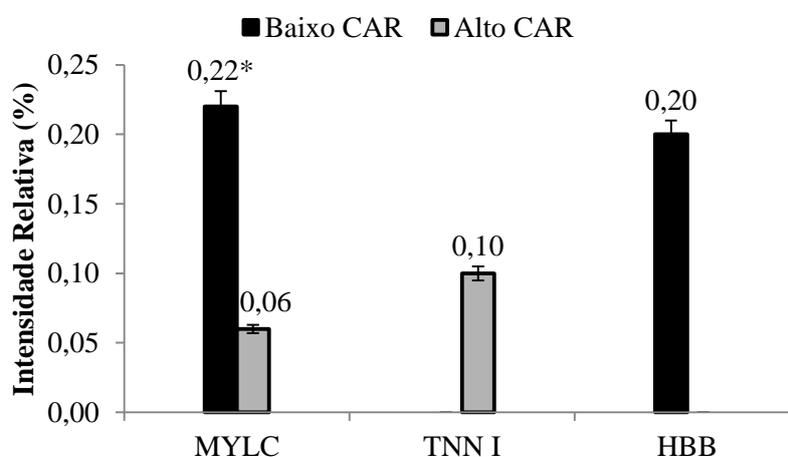
(2) Probabilidade de identificação para peptídeo (Scaffold)

(3) NPIV – Número de peptídeos identificados e validados (Scaffold)

(4) Os resíduos de metionina (em vermelho), nos peptídeos da amostra 429, indicam que os mesmos sofreram modificação (oxidação), informação gerada pelo Scaffold

A troponina I (TNNI1) foi observada apenas nos animais classificados para alto CAR pode ter sido ocasionada por modificações pós-transcricionais pode ter alterado a atividade, a localização, e interações com outras proteínas (Tabela 3). A identificação da TNNI1 está de acordo com os resultados de Campos et al., (2010) que observou que a troponina I no tecido muscular apresenta relação importante na regulação do metabolismo energético e no turnover proteico, devido a degradação da proteína muscular aumentar a taxa e eficiência do crescimento do músculo esquelético nos animais. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Botje et al. (2012), onde genes relacionados com o citoesqueleto (actina, troponina) em resposta ao aumento da oxidação de proteínas em animais selecionados para alto CAR, implica que a energia direcionada para organização do citoesqueleto pode contribuir para diminuir a eficiência alimentar (alto CAR), ou inversamente, que a redução do gasto de energia dirigida para citoesqueleto arquitetura / estrutura e atividade muscular contribui para a alta eficiência alimentar (baixo CAR).

Foram observadas diferenças na expressão da miosina de cadeia leve 1 (MYL1) em bovinos classificados para classes de consumo alimentar, em que os animais classificados para baixo CAR (animais mais eficientes) apresentaram expressão da proteína MYL1 3,34 vezes maior quando comparado com bovinos classificados para alto CAR (Figura 2). Os animais classificados para baixo CAR apresentaram melhores características de eficiência no aproveitamento dos alimentos, ocasionado pela menor necessidade de nutrientes para sua exigência de manutenção.



**Figura 2.** Intensidade de *spots* identificados em animais classificados para CAR.

\* $P < 0,05$ .

Segundo Lehnert et al. (2006), a maior expressão de fibras de contração lenta (MYLC) em bovinos mais eficientes, pode ser ocasionado devido a uma remodelação preferencial das fibras musculares de contração rápida (fibras glicolíticas), para fibras de contração lenta (fibras oxidativas) como uma adaptação para melhor lidar com a redução da exigência nutricional, devido à menor utilização das fibras glicolíticas de contração rápida serem menos utilizadas e por isso serem mais dispensáveis como reserva de proteína.

O fenótipo de maior eficiência observado no estudo apresentou uma maior expressão da MYLC, componente de fibras musculares oxidativas lentas. (Figura 2). Essa mudança no perfil de padrão muscular, reflete uma atrofia adaptativa, resultando em um músculo que contém menos fibras de contração rápida com uma menor eficiência energética para um tipo de fibra com melhor eficiência na utilização energética (Hocquette, 2010).

## **Conclusão**

Diferenças na expressão de proteínas miosina de cadeia leve e troponina I relacionadas com as características musculares por designar alterações no perfil metabólico da contração muscular influenciando o metabolismo muscular proporcionando diferenças na eficiência alimentar.

Fenótipos selecionados para baixo CAR apresentaram relação com genes associados com o desenvolvimento da fibra muscular, função muscular e organização do citoesqueleto.

## **Referências**

- ABERLE, D.E.; FORREST, J.C.; GERRARD, D.E.; MILLS, E.W. Principles of meat science. 4 ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing. 2001. 254 p.
- ANDERSON, R.V.; RASBY, R.J.; KLOPFENSTEIN, T.J.; CLARK, R.T. An evaluation of production and economic efficiency of two beef systems from calving to slaughter. **Journal of Animal Science**. v. 83, n. 3, p. 694–704, 2005.

ARTHUR P. F., HERD R. M., ARCHER J. A. Should measures of body composition be included in the model for residual feed intake in beef cattle? **Proceedings..** Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics. v. 15, p.306–309, 2003.

BARENDSE, W.; REVERTER, A.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; BARRIS, W.; THOMAS, M. B. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics**. v.176, n. 3, p. 1893–1905, 2007.

BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; AALHUS, J.L.; OKINE, E. K.; SNELLING, W. M.; LYLE, K. L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**. v.83, n. 2, p.189-204, 2003.

BENDIXEN, E.; DANIELSEN, M.; HOLLUNG, K.; GIANAZZA, E.; Miller, I. Farm animal proteomics — A review. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 3, p. 282-29, 2011.

BOTTJE, W.G.; CARSTENS, G.E. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. **Journal of Animal Science**. v. 87, n.14, p. E48-E63, 2009.

BOTTJE, W.G.; KONG, B.W.; SONG, J.J.; LEE, J.Y.; HARGIS, B.M.; LASSITER, K.; WING, T.; HARDIMAN, J. Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K microarray. II. Differentially expressed focus genes. **Poultry Science**, v. 91, n. 10, p. 2576-2587, 2012.

BOTTJE, W.; KONG, B.W. CELL BIOLOGY SYMPOSIUM: Feed efficiency: Mitochondrial function to global gene expression. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 4, p. 1582-1593, 2013.

CABRAL, C.H.A.; ALMEIDA, D.M.; MARTINS, L.S.; MENDES, R.K.V. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no turnover protéico: deposição e degradação de proteína muscular. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p 1185-1203, 2012.

CAMPOS, Y.; QIU, X.; ZANOTELI, E.; MOSHIACH, S.; VERGANI, N.; BONGIOVANNI, A.; HARRIS, A.J.; D'AZZO, A. Ozz-E3 ubiquitin ligase targets

sarcomeric embryonic myosin heavy chain during muscle development. **PLoS One.**, v. 5, n. 3, p. 1-14, 2010.

GOMES, A.V.; POTTER, J.D.; SZCZESNA-CORDARY, D. The Role of Troponins in Muscle Contraction. **IUBMB Life.** v. 54, n.6, p323-333, 2002.

HUANG, L.; CHARDON, J.W.; CARTER, M.T.; FRIEND, K.L.; DUDDING, T.E.; SCHWARTZENTRUBER, J.; BOYCOTT, K.M. Missense mutations in ITPR1 cause autosomal dominant congenital non progressive spinocerebellar ataxia. **Orphanet Journal of Rare Diseases.** v. 7, n. 1, p. 1-7, 2012.

HOCQUETTE, J.F. Endocrine and metabolic regulation of muscle growth and body composition in cattle. **Animal**, v. 4, n. 11, p. 1797–1809, 2010.

KEDAR, V.; MCDONOUGH, H.; ARYA, R.; LI, H.H.; ROCKMAN, H.A.; PATTERSON, C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA.* v. 101, n. 52, p. 18135–18140, 2004.

KONG, B.W.; SONG, J. J.; LEE, J.Y.; HARGIS, B.M.; WING, T.; LASSITER, K.; BOTTJE, W. Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K oligo microarray. I. Top differentially expressed genes. **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2535-2547, 2011.

LEHNERT, S.A.; BYRNE, K.A.; REVERTER, A.; NATTRASS, G.S.; GREENWOOD, P.L.; WANG, Y.H.; HUDSON, N.J.; HARPER, G.S. Gene expression profiling of bovine skeletal muscle in response to and during recovery from chronic and severe undernutrition. **Journal of animal science**, v. 84, n. 12, p. 3239-3250, 2006.

LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A. Centennial paper: Proteomics in animal science. **Journal of animal science**, v. 86, n. 9, p. 2430–41, 2008.

MONTANHOLI, Y.R.; SWANSON, K.C.; SCHENKEL, F.S.; MCBRIDE, B.W.; CALDWELL, T.R.; MILLER, S.P. On the determination of residual feed intake and associations of infrared thermography with efficiency and ultrasound traits in beef bulls. **Livestock Science.** v. 125, n.1, p. 22-30, 2009.

MOORE, K.L.; JOHNSTON, D.J.; GRASER, H.U.; HERD, R.M. Genetic and phenotypic relationships between insulin-like growth factor-i (IGF-I) and net feed intake, fat and growth traits in Angus beef cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 53, n.3, p. 211-218, 2005.

OJANO-DIRAIN, C.P.; PUMFORD, N.R.; TOYOMIZU, M.; BOTTJE, W.G. Association of mitochondrial function and feed efficiency. *Journal of Poultry Science*. v. 44, n. 3, p. 221-237, 2007.

RICHARDSON, E.C.; HERD, R.M.; ARCHER, J.A; ARTHUR, P.F. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v. 44, n. 5, p. 441 – 452, 2004.

RODRIGUES FILHO, M.; ZANGERONIMO, M.G.; LOPES, L.S.; LADEIRA, M.M.; ANDRADE, I. Fisiologia do crescimento e desenvolvimento do tecido muscular e sua relação com a qualidade da carne em bovinos. **Nutritime**, v. 8, n. 2, p. 1431-1443, 2011.

SANTOS, P.M., TEIXEIRA, M.C., SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Métodos em Biotecnologia - Proteômica Quantitativa**. Boletim de Biotecnologia v. 7, 2004.

SCHIAFFINO, S.; DYAR, K.A.; CICILLOT, S.; BLAAUW, B.; SANDRI, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS Journal**. v. 180, n. 17, p. 4294-314, 2013.

SERÃO, N.V.L.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; BEEVER, J.E.; FAULKNER, D.B.; SOUTHEY, B.R.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes associated with feed efficiency in beef cattle. **BMC Genetics**. v.14, n. 94, p. 1-20, 2013.

SHERMAN, E. L.; NKRUHAH, J. D.; MURDOCH, B. M.; MOORE, S. S. Identification of polymorphisms influencing feed intake and efficiency in beef cattle. **Animal Genetics**. v. 39, n. 3, p. 225–231, 2008.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, v. 1, n. 6, p. 2856–60, 2006.

SOARES, R.; FRANCO, C.; PIRES, E.; VENTOSA, M.; PALHINHASA, R.; KOCIA, K.; ALMEIDA, A. M.; COELHO, A. V. Mass spectrometry and animal science: Protein identification strategies and particularities of farm animal species. **Journal of Proteomics**. V. 75, n. 14, p. 4190 – 4206, 2012

TINSLEY, N.; IQBAL, M.; PUMFORD, N.R.; LASSITER, K.; OJANO-DIRAIN, C.; WING, T.; BOTTJE, W. Investigation of mitochondrial protein expression and oxidation in heart muscle in low and high feed efficient male broilers in a single genetic line. **Poultry Science**. v. 89, n. 2, p. 349–352, 2010.

WARRISS, P.D. *Ciencia de la carne*. Zaragoza: Acribia S.A., 2003. 309 p.

WHITE, P.; CATTANEO, D.; DAUNCEY, M.J. Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. **British Journal of Nutrition**. v. 84, n. 2, p. 185-194, 2000.

ZHAO, Y.M.; BASU, U.; DODSON, M.V.; BASARB, J.A.; GUAN, L.L. Proteome differences associated with fat accumulation in bovine subcutaneous adipose tissues. 1. **Proteome Science**, vol 8, n. 14, p. 2-11, 2010.

### **Artigo 3 - Modelos para estimação de consumo alimentar residual (CAR) em bovinos Nelore como medida para eficiência alimentar**

#### **Resumo**

Objetivou-se avaliar o modelo na estimação de equações de predição de consumo de alimentos para bovinos Nelore e no ranking de desempenho alimentar, utilizando diferentes modelos para a estimativa do CAR. Foram utilizados 97 animais com alto e baixo consumo alimentar residual (CAR) para avaliação da ingestão, crescimento, eficiência alimentar e características de carcaça. Os modelos utilizados para estimação do CAR foram o modelo atualmente em uso, que leva em consideração o peso vivo e peso metabólico, e modelos que incluíram medidas de ultrassom de músculo e espessura de gordura. As estimativas dos modelos foram estudadas utilizando o procedimento MIXED do SAS. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento MIXED em que as médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos e comparadas pelo teste Tukey-kramer, a 5% de probabilidade. A análise de correlação entre as medidas de eficiência, desempenho, ganho de peso, consumo e composição corporal foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson, utilizando o procedimento CORR. A análise de agrupamento foi realizada para comparar o desempenho dos animais classificados para alto e baixo CAR em relação ao modelo utilizado, utilizando-se o programa R (pacote clusters). A utilização das características de deposição tecidual no modelo para estimação do CAR apresentou melhora para predição do consumo de alimentos, aumentando o  $R^2$  e reduzindo os valores do BIC e RMSE. O modelo inicial para calcular CAR pode ser melhorado através da inclusão de características de ultrassom, em que foram úteis para explicar a variação observada para ingestão de alimentos. A avaliação de diferentes modelos utilizados para calcular o CAR tem mostrado que alguns destes modelos podem ser mais apropriados para utilização do que outros. Embora os modelos de CAR tenham apresentado diferenças na estimação, as correlações entre cada um dos modelos indicam que estes não foram diferentes uns dos outros na classificação dos animais para eficiência alimentar. No entanto, a variação na eficiência do modelo que inclui os parâmetros de composição corporal é muito importante e leva à sugestão de que a composição corporal pode ser fundamental para explicar a variação no consumo de alimentos, e que esta precisa ser incluída no modelo de cálculo do CAR.

**Palavras-chave:** deposição tecidual, eficiência alimentar, gado de corte

### **Article 3 – Evaluation of models to estimate residual feed intake (RFI) utilizing tissue deposition characteristics in Nellore animals as a measure of feed efficiency**

#### **Abstract**

The objective was to evaluate of the model in estimating equations for predicting feed intake for Nellore and in the ranking of feeding performance, using different models to estimate residual feed intake (RFI). Ninety-seven animals, classified for high and low RFI, measured for intake, growth, feed efficiency, and carcass traits, were utilized. Models utilized for RFI estimation were the current model used, which considers body and metabolic weights, and models which included muscle ultrasound and fat thickness measurement. Estimation of models was adjusted utilizing the MIXED procedure of SAS. Statistical analyzes were achieved by using the MIXED procedure, with means adjusted by least square method, and compared by the Tukey-Kramer test at 5% probability. Correlation analysis between measures of efficiency, performance, body weight gain, intake, and body composition was performed by the Pearson correlation coefficient using the CORR procedure. Cluster analysis was performed to compare high and low RFI animal performance of animals regarding the model used, using the R program (cluster package). The use of tissue deposition characteristics in the model to estimate RFI showed improvement in predicting feed intake by increasing  $R^2$  and reducing BIC and RMSE values. The initial model to calculate RFI can be improved by the inclusion of ultrasound data, in which are useful for explaining the variation observed for feed intake. The evaluation of different models used to calculate RFI have shown that some of these models may be more appropriate compared with other models. Although models differed in RFI estimation, correlations among models indicate that they were not different from each other in classifying animals for feed efficiency. Nonetheless, variation in efficiency of the model that includes body composition parameters is important, suggesting that body composition can be critical to explain variations in feed intake and it must be included in the RFI model.

**Key words:** beef cattle, feed efficiency, fiber types, muscle metabolism, proteomic analysis

## **Introdução**

O Consumo alimentar residual (CAR), estimado como a diferença entre o consumo real de alimentos para animais e previsão do consumo, tornou-se uma medida preferida de eficiência alimentar, através dos diferentes sistemas de produção pecuária (Rauw et al., 2006). O CAR avalia a eficiência com que os animais utilizam a dieta para manutenção e produção, uma vez que implica uma conversão mais eficiente. A predição do consumo de alimento é predominantemente avaliada como uma regressão linear do consumo real de alimentos para animais em um conjunto de variáveis, tais como ganho de peso médio diário (GMD), peso médio metabólico ( $PVM^{0,75}$ ) e medidas de composição da carcaça, como gordura de cobertura que podem ser adicionadas ao modelo como fator de ajuste (Hoque et al., 2009).

Alguns parâmetros precisam ser explorados no que diz respeito ao impacto que eles podem ter sobre os preditores do CAR. O ganho de peso pode ser dividido em: ganho de tecido magro (proteína), ganho de tecido gordo, e, ou em função das necessidades de produção. Estes termos adicionais no modelo linear descrevem os requisitos de manutenção e os níveis de produção do animal.

O modelo original para o cálculo do CAR (Koch et al., 1963) não leva em consideração diferenças de eficiência entre deposição de musculatura e gordura. As diferenças quantitativas na eficiência energética de deposição de musculatura e gordura pode ser um fator de influência importante no CAR. Para características tais como a eficiência alimentar, que tem um impacto significativo sobre a rentabilidade, estes efeitos podem ser significativos. Além disso, esses impactos potenciais podem ainda variar entre os diferentes setores da pecuária, como resultado de diferenças na necessidade de manutenção, sugerindo benefícios consideráveis a partir de uma melhor eficiência (Arthur et al., 2005). O objetivo neste estudo é avaliar diferentes modelos para estimação de equações de predição do consumo de alimentos para bovinos Nelore.

## **Material e Métodos**

### **Animais**

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA / USP), Pirassununga, SP, Brasil.

Foram utilizados 97 animais machos da raça Nelore (*Bos indicus*), com média de 404,19 kg ( $\pm 30,49$  kg) de peso vivo no início do experimento e 584 ( $\pm 30$ ) dias de idade, classificados para alto e baixo consumo alimentar residual (CAR).

Durante o período experimental os animais foram mantidos em confinamento por 126 dias, alocados em dois tipos de instalações: baias individuais (n=50 animais) e em baias coletivas equipados com sistema de portão eletrônico do tipo calan gate (n=47 animais), contendo bebedouro e cocho para cada animal. Antes da avaliação do CAR, os animais passaram por um período de adaptação das instalações e à dieta, por 20 dias. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia na forma de dieta total misturada, com acesso ad libitum à dieta e à água.

### Coleta de dados

Os animais foram pesados em jejum alimentar e hídrico durante o período de avaliação e assim obtido o peso corporal médio (PVM). O ganho de peso médio diário (GMD) foi calculado com base nas pesagens periódicas dos animais, representado como o coeficiente angular da regressão linear dos pesos em relação aos dias em teste. Adicionalmente, no período de avaliação, a ingestão de matéria seca (IMS) para cada animal foi mensurada diariamente, por meio da subtração entre a quantidade de alimento fornecido e as sobras alimentares. A partir desses dados de IMS, foram calculadas as medidas de eficiência alimentar: taxa de conversão alimentar (CA), consumo alimentar residual (CAR), ganho de peso residual (GPR) e consumo e ganho residuais (CGR).

A CA foi calculada pela razão da IMS pelo GMD, enquanto que o CAR e o GPR representam os resíduos ( $\varepsilon_1$  e  $\varepsilon_2$ ) das equações de regressão que estimaram a ingestão de matéria seca (IMS) e o ganho de peso médio diário (GMD), respectivamente. Os modelos para estimação destas características foram:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 GMD + \beta_2 PVM^{0,75} + \varepsilon_1 \text{ (Koch, et al., 1963)}$$

$$GMD = \beta_0 + \beta_1 IMS + \beta_2 PVM^{0,75} + \varepsilon_2 \text{ (Koch, et al., 1963)}$$

Onde: os parâmetros ( $\beta$ ) foram estimados a partir do procedimento PROC MIXED do software SAS 9.3.

O CGR foi calculado pela fórmula abaixo:

$$CGR = (-1 * CAR) + GPR \text{ (Berry e Crowley, 2012)}$$

As medidas de carcaça foram avaliadas no início e no final do período experimental: Área do Olho do Lombo (AOL), Espessura de Gordura Subcutânea sobre o Lombo (EGS) e também Espessura de Gordura Sobre a Picanha (EGP). A AOL e a EGS foram mensuradas entre a região da 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas, transversalmente ao músculo Longissimus. A EGP foi mensurada na intersecção dos músculos Gluteus medius e Biceps femoris, localizados entre o íleo e o ísquio. Os valores iniciais foram subtraídos dos finais para cálculo dos ganhos das medidas (AOLg, EGSg e EGPg) durante o experimento. A avaliação de carcaça por meio de ultrassonografia (Aloka SSD500 com um transdutor de 3,5MHz) por um técnico certificado da Ultrasound Guidelines Council, seguindo a metodologia descrita no guia da Beef Improvement Federation (BIF, 1996).

Para estimação do CAR foram utilizados diferentes modelos encontrado na literatura (Koch et al., 1963; Basarab et al., 2013; Francois et al., 2002):

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com seus valores de CAR individuais. Animais com valores de CAR superiores à média mais 0,5 desvios padrão (DP), foram classificados como novilhos de alto CAR e animais com valores de CAR abaixo da média menos 0,5 DP, foram classificados como o grupo de baixo CAR.

Para avaliação do consumo voluntário da dieta, foi feita a diferença entre o alimento fornecido e as sobras. Foi realizado o ajuste da sobra do consumo para que correspondesse de 5 a 10% do total de alimento oferecido diariamente, de forma a garantir alimentação ad libitum para todos os animais.

## **Modelo I**

Nas primeiras discussões sobre CAR por Koch et al. (1963), o consumo de ração foi ajustado para diferenças no ganho em peso médio diário (GMD), e peso vivo metabólico.

Para o modelo, a ingestão de matéria seca foi ajustada para GMD e peso metabólico médio ( $PVM^{0,75}$ ):

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 PVM^{0,75} + \beta_2 GMD + \varepsilon,$$

em que: IMS – ingestão de matéria seca diária por animal,  $\beta_0$  – intercepto;  $\beta_1$  – coeficiente linear da regressão para  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_2$  – coeficiente linear da regressão para GMD;  $\varepsilon$  – resíduos que expressam a medida da eficiência CAR.

### Modelo II

A ingestão de matéria seca foi ajustada para GMD e peso metabólico médio ( $PVM^{0,75}$ ) considerando efeito linear e quadrático das variáveis e o efeito do GMD no  $PVM^{0,75}$  (Basarab et al., 2013):

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 PVM^{0,75} + \beta_2 GMD + \beta_3 GMD * PVM^{0,75} + \beta_4 GMD^2 + \beta_5 (PVM^{0,75})^2 + \varepsilon$$

em que: IMS – ingestão de matéria seca diária por animal;  $\beta_0$  – intercepto;  $\beta_1$  – coeficiente linear da regressão para  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_2$  – coeficiente linear da regressão para GMD;  $\beta_3$  – coeficiente linear da regressão para GMD e  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_4$  – coeficiente do efeito quadrático para GMD;  $\beta_5$  – coeficiente do efeito quadrático para  $PVM^{0,75}$ ;  $\varepsilon$  – resíduos que expressam a medida da eficiência CAR.

### Modelo III

O CAR foi estimado pela regressão do consumo de ração pelo GMD,  $PVM^{0,75}$  e composição corporal (François et al., 2002). O consumo de ração foi ajustada para peso metabólico médio ( $PVM^{0,75}$ ), GMD, espessura de gordura subcutânea na 13ª costela ao fim do teste ( $EGS_f$ ). Usando este modelo, o CAR foi calculado para cada conjunto de dados:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 PVM^{0,75} + \beta_2 GMD + \beta_3 EGS_f + \varepsilon$$

em que: IMS – ingestão de matéria seca diária por animal;  $\beta_0$  – intercepto;  $\beta_1$  – coeficiente linear da regressão para  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_2$  – coeficiente linear da regressão para GMD;  $\beta_3$  – coeficiente linear da regressão para  $EGS_f$ ;  $\varepsilon$  – resíduos que expressam a medida da eficiência CAR.

### Modelo IV

A ingestão de matéria seca foi estimada pela regressão do consumo de ração pelo GMD,  $PVM^{0,75}$  e composição corporal (François et al., 2002). O consumo de ração foi ajustada para peso metabólico médio ( $PVM^{0,75}$ ), GMD, espessura de gordura subcutânea na 13ª costela ao fim do teste ( $EGS_f$ ), área de olho de lombo no final do

experimento ( $AOL_f$ ). Usando esse modelo, CAR foi calculado para cada conjunto de dados:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 PVM^{0,75} + \beta_2 GMD + \beta_3 EGS_f + \beta_4 AOL_f + \varepsilon$$

em que: IMS – ingestão de matéria seca diária por animal;  $\beta_0$  – intercepto;  $\beta_1$  – coeficiente linear da regressão para  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_2$  – coeficiente linear da regressão para GMD;  $\beta_3$  – coeficiente linear da regressão para  $EGS_f$ ;  $\beta_4$  – coeficiente linear da regressão para  $AOL_f$ ;  $\varepsilon$  – resíduos que expressam a medida da eficiência CAR.

### Modelo V

A ingestão de matéria seca foi estimada pela regressão do consumo de ração pelo GMD,  $PVM^{0,75}$  e composição corporal (François et al., 2002). O consumo de ração foi ajustado para peso metabólico médio ( $PVM^{0,75}$ ), GMD, espessura de gordura subcutânea na 13ª costela ao fim do teste ( $EGS_f$ ), área de olho de lombo no final do experimento ( $AOL_f$ ), espessura de gordura subcutânea na garupa ao fim do teste ( $EGP_f$ ). Usando esse modelo, o CAR foi calculado para cada conjunto de dados:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 PVM^{0,75} + \beta_2 GMD + \beta_3 EGS_f + \beta_4 AOL_f + \beta_5 EGP_f + \varepsilon$$

em que: IMS – ingestão de matéria seca diária por animal;  $\beta_0$  – intercepto;  $\beta_1$  – coeficiente linear da regressão para  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_2$  – coeficiente linear da regressão para GMD;  $\beta_3$  – coeficiente linear da regressão para  $EGS_f$ ;  $\beta_4$  – coeficiente linear da regressão para  $AOL_f$ ;  $\beta_5$  – coeficiente linear da regressão para  $EGP_f$ ;  $\varepsilon$  – resíduos que expressam a medida da eficiência CAR.

### Modelo VI

A ingestão de matéria seca foi estimada pela regressão do consumo de ração pelo GMD,  $PVM^{0,75}$  e composição corporal (François et al., 2002). O consumo de ração foi ajustada para peso metabólico médio ( $PVM^{0,75}$ ), GMD, espessura de gordura corporal (GORD) sendo a média da  $EGS_f$  e  $EGP_f$ . Usando esse modelo, o CAR foi calculado para cada conjunto de dados:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 PVM^{0,75} + \beta_2 GMD + \beta_3 GORD + \varepsilon$$

em que: IMS – ingestão de matéria seca diária por animal;  $\beta_0$  – intercepto;  $\beta_1$  – coeficiente linear da regressão para  $PVM^{0,75}$ ;  $\beta_2$  – coeficiente linear da regressão para GMD;  $\beta_3$  – coeficiente linear da regressão para GORD;  $\varepsilon$  – resíduos que expressam a medida da eficiência CAR.

## Análise estatística dos dados

Os modelos foram ajustados a partir do procedimento PROC MIXED do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos as duas classes de CAR (alto e baixo). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o PROC MIXED do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3). As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos e comparadas pelo teste Tukey-kramer, a 5% de probabilidade.

As análises de correlação entre as medidas de eficiência, desempenho, ganho de peso, consumo e composição corporal foram realizadas pelo coeficiente de correlação de Pearson e Spearman, utilizando o procedimento CORR e SPEARMAN do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.3).

A análise de agrupamento foi realizada para comparar o desempenho dos animais classificados para alto e baixo CAR em relação ao modelo estudado, utilizando o pacote clusters do programa R (Maechler et al., 2013), por meio do método de Ward que combina as observações em grupos no qual a soma de quadrados é a menor possível, em cada passo de agrupamento.

Desse modo, se AB é um grupo obtido pela junção do grupo A e B:

$$ESS_A = \sum_{i=1}^{n_A} (Y_i - \bar{Y}_A)'(Y_i - \bar{Y}_A)$$

$$ESS_B = \sum_{i=1}^{n_B} (Y_i - \bar{Y}_B)'(Y_i - \bar{Y}_B)$$

$$ESS_{AB} = \sum_{i=1}^{n_{AB}} (Y_i - \bar{Y}_{AB})'(Y_i - \bar{Y}_{AB})$$

Em que  $\bar{Y}_{AB} = \frac{(n_A \bar{Y}_A + n_B \bar{Y}_B)}{(n_A + n_B)}$ ,  $n_A$ ,  $n_B$ , são o número de indivíduos em A, B e  $\bar{Y}_A$ ,

$\bar{Y}_B$  e  $\bar{Y}_{AB}$  são os vetores de médias dos grupos A, B e AB, respectivamente,

O Método de Ward une dois grupos A e B que minimizam o acréscimo em ESS, também chamado de incremento da soma de quadrados ( $I_{AB}$ ), definido como:

$$I_{AB} = ESS_{AB} - (ESS_A + ESS_B)$$

ou

$$I_{AB} = \frac{(n_A * n_B)}{(n_A + n_B)} (\bar{Y}_A - \bar{Y}_B)' (\bar{Y}_A - \bar{Y}_B)$$

Assim, pela última equação minimizar o aumento na ESS é equivalente a minimizar a distância entre grupos.

Para a determinação do número de grupos foi utilizado o K-Means que é uma heurística de agrupamento não hierárquico que busca minimizar a distância dos elementos a um conjunto de  $k$  centros dado por  $c = \{x_1, x_2, \dots, x_k\}$  de forma iterativa. A distância entre um ponto  $p_i$  e um conjunto de clusters, dada por  $d(p_i, c)$ , é definida como sendo a distância do ponto ao centro mais próximo dele. A função a ser minimizada então, é dada por:

$$d(P, \chi) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d(p_i, \chi)^2$$

O algoritmo depende de um chute inicial ( $k$ =número de clusters) definido pelo usuário.

## Resultados e Discussão

O modelo proposto para estimar o CAR com base no peso médio metabólico (PVM<sup>0,75</sup>) e o GMD (Modelo I) apresentou um  $R^2$  de 0,58, neste modelo as variáveis apresentaram efeito significativo para a previsão do CAR (Tabela1). A eficiência modelada como uma função do peso metabólico e GMD, a partir da ingestão de matéria seca (IMS) total foi um preditor significativo de ganho total, devido os modelos apresentarem os mesmos parâmetros para a manutenção e produção (PVM e GMD), e, portanto, todos eles são razoavelmente similares na quantidade de variação da IMS que explicam. De acordo com Basarab et al. (2003), a inclusão de variáveis no modelo para a predição da ingestão de matéria seca aumenta o  $R^2$ , o que foi observado no presente estudo em que a inclusão de algumas variáveis melhoraram a estimativa do CAR.

O modelo II apresentou o maior valor para o BIC entre os modelos avaliados, indicando que outros modelos são mais apropriados para se ajustar a variação associada com o IMS. No entanto, é importante notar que os dois parâmetros utilizados para calcular o CAR, o Peso Metabólico como um indicador de manutenção e GMD como uma medida da produção, são responsáveis pela maior parte da variação da IMS em comparação com as características de ultrassom que foram adicionadas ao Modelo I.

**Tabela 1.** Coeficientes de estimação de vários modelos de regressão para estimação do consumo alimentar residual (CAR) em bovinos Nelore (n = 97) com base em variáveis de previsão.

Modelo	Equação de regressão (DMI)	R <sup>2</sup>	RMSE <sup>1</sup>	BIC <sup>2</sup>
Modelo I	$\hat{y}=0,11PVM^{0,75}+1,77GMD - 3,46$	0,58	0,89	262,5
Modelo II	$\hat{y}=0,74PVM^{0,75}+0,42GMD - 1,23GMD^2 - 33,92$	0,61	0,87	269,7
Modelo III	$\hat{y}=0,10PVM^{0,75}+1,79GMD+0,17EGS_f - 3,41$	0,63	0,84	254,6
Modelo IV	$\hat{y}=0,097PVM^{0,75}+1,77GMD+0,17EGS_f - 3,62$	0,63	0,84	261
Modelo V	$\hat{y}=0,097PVM^{0,75}+1,75GMD+0,10EGS_f + 0,11EGP_f - 4,68$	0,65	0,82	259,4
Modelo VI	$\hat{y}=0,101PVM^{0,75}+1,76GMD+0,21GORD - 3,87$	0,68	0,81	248,5

$\beta_0$ : intercepto,  $\beta_1$ : coeficiente linear para  $PVM^{0,75}$ ,  $\beta_2$ : coeficiente linear para GMD; Modelo II:  $\beta_3$ : coeficiente linear para interação entre GMD e  $PVM^{0,75}$ ,  $\beta_4$ : coeficiente do efeito quadrático para GMD,  $\beta_5$ : coeficiente do efeito quadrático para  $PVM^{0,75}$ ; Modelo III:  $\beta_3$ : coeficiente linear para  $EGS_f$ , Modelo IV:  $\beta_3$ : coeficiente linear para  $EGS_f$ ,  $\beta_4$ : coeficiente linear para  $AOL_f$ , Modelo V:  $\beta_3$ : coeficiente linear para  $EGS_f$ ,  $\beta_4$ : coeficiente linear para  $AOL_f$ ,  $\beta_5$ : coeficiente linear para  $EGP_f$ ; Modelo VI:  $\beta_3$ : coeficiente linear para GORD.

RMSE

O modelo II que considerou o efeito quadrático do  $PVM^{0,75}$ , o GMD e a interação  $GMD*PVM^{0,75}$ , apresentou valor de  $R^2$  mais elevado em comparação ao Modelo I. Entretanto não se observou efeito significativo para a interação  $GMD*PVM^{0,75}$  e efeito quadrático de  $PVM^{0,75}$ . Entretanto, o GMD apresentou efeito quadrático significativo ( $\beta_3$ ) (Tabela 1), devido a taxa de ganho de peso aumentar até determinado ponto onde a deposição de tecido muscular é mais eficiente em termos de peso de tecido depositado, correspondendo a uma taxa de crescimento linear, relativamente constante. Depois, a taxa de ganho de peso começa a declinar devido ao aumento da deposição de gordura na carcaça ser menos eficiente em comparação à deposição muscular para o aumento do peso corporal.

A inclusão das medidas de espessura de gordura e área de olho de lombo nos modelos III, IV, V e VI para predição do consumo de alimentos aumentou o  $R^2$  apresentando valores entre 0,63 a 0,68 (Tabela 1). No entanto, os coeficientes de regressão para a AOL não foram significativos nos modelos IV e V, indicando que essa variável não apresenta relação funcional na predição do consumo de alimentos. Resultados semelhantes foram observados por Kanott et al. (2008), avaliando o uso de diferentes modelos para a estimativa de consumo alimentar residual como uma medida da eficiência alimentar em ovinos, não encontraram significância para a inclusão de medidas de gordura e de AOL no modelo para estimar o consumo de alimentos.

Montanholi et al. (2009), utilizando modelos alternativos para calcular o consumo alimentar residual (CAR), observaram significância da inclusão da AOL e das medidas de espessura de gordura em modelos para avaliação do CAR em bovinos, indicando que a área de olho de lombo pode ser um indicador de teor de proteína corporal, dada a sua relação com a produção de tecido magro. Entretanto no presente estudo não foi observado significância da inclusão da AOL na estimação do CAR.

Os modelos que combinaram medidas de deposição de gordura corporal (modelos III ao VI) apresentou melhora no  $R^2$  e BIC (Tabela 1). No entanto, a inclusão da gordura corporal como sendo a média de deposição de gordura da EGP e EGS no modelo VI o  $R^2$ , RMSE e BIC apresentaram as melhores estimativas (0,68; 0,81 e 248,5, respectivamente).

Quando as características de ultrassom foram incluídas no modelo para explicar parte da variabilidade da eficiência alimentar pela composição corporal, observou-se

que os dados de AOL não melhoraram a  $R^2$  e BIC, devido a este parâmetro de composição corporal não ser significativo e, portanto, não deve normalmente ser incluído no modelo (Tabela 1). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Schenkel et al. (2004), que utilizando diferentes modelos para estimação do CAR, observou que animais classificados para CAR não trazem impactos negativos nesse atributo da carcaça, sugerindo que a AOL, não tem um impacto significativo sobre a previsão da ingestão de matéria seca (IMS).

Entretanto, Monhatoli et al. (2009) observou que a inclusão da área de olho de lombo dentre as características medidas por ultrassom foi a que melhor explicou parte da variação para ingestão de matéria seca, em relação ao modelo proposto por Koch, cerca de 7% a mais, sendo consistentes em qualquer período de avaliação.

Diferente da área de olho de lombo, os dados de deposição de tecido adiposo apresentaram efeito significativo sobre  $R^2$  e BIC. A inclusão da EGS, EGP ou GORD, melhoraram a explicação da variação da IMS por reduzir o BIC e o RMSE. Segundo Knott et al., (2008) modelos para estimação do CAR, que incluíram medidas de composição corporal (gordura e AOL por ultra-som), observaram aumento na variação do consumo de alimento por ajustar melhor os dados e contribuir para alguma variação no CAR, em comparação com outros modelos de previsão da ingestão de matéria seca. Isto indica que os parâmetros de composição corporal são úteis no modelo para estimação do CAR.

No presente estudo foi observado que a adição da espessura de gordura subcutânea apresentou melhora na previsão da IMS em 10% no  $R^2$  em comparação ao modelo de Koch (Modelo I), aparentemente, a composição corporal contribuiu para a variação no CAR, concordando com resultados encontrados por Arthur et al. (2003) e Basarab et al. (2003) observaram uma melhoria de 6%, na estimação da IMS utilizando modelos similares em bovinos de corte jovens. Monhatoli et al. (2009) constataram que a inclusão dos dados de ultrassom melhorou a previsão da IMS cerca de 9% em comparação com o modelo proposto por Koch.

Van der Werf (2004) indica que essa melhoria na estimação da ingestão de matéria seca pode ser devido à deposição de tecido adiposo e proteína apresentarem padrões distintos em relação ao peso corporal e como consequência, retratar com maior precisão a eficiência biológica e reduzir a variação do CAR. As medidas de composição devem ser conhecidas e incluídas na estimativa do CAR.

A deposição de tecido adiposo é mais onerosa que de proteína em termos energéticos, uma vez que contém o dobro da energia contida na molécula, por isso, pode-se inferir que animais com maior IMS, consomem mais energia proporcionando maior deposição de gordura corporal. A faixa de peso vivo na qual o animal se encontra ou em que é terminado, afeta o consumo de alimentos em termos absolutos, e a eficiência da energia para as funções produtivas (Silva et al., 2008).

As maiores e menores distâncias Euclidianas médias padronizadas, entre os modelos avaliados, proporcionaram avaliar as diferenças de desempenho dos animais para características produtivas, levando em consideração o modelo de estimação do CAR (Tabela 2). As estimativas das distâncias euclidianas médias evidenciam o grau de dissimilaridade entre os modelos para a predição do CAR avaliados. Por intermédio do desempenho médio e das estimativas destas distâncias, é possível identificar entre os modelos avaliados, aqueles mais divergentes. A análise de agrupamento agrupou os modelos em grupos semelhantes segundo suas características (variáveis), levando em consideração critérios de similaridade ou dissimilaridade, de tal forma que os animais apresentem homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre eles.

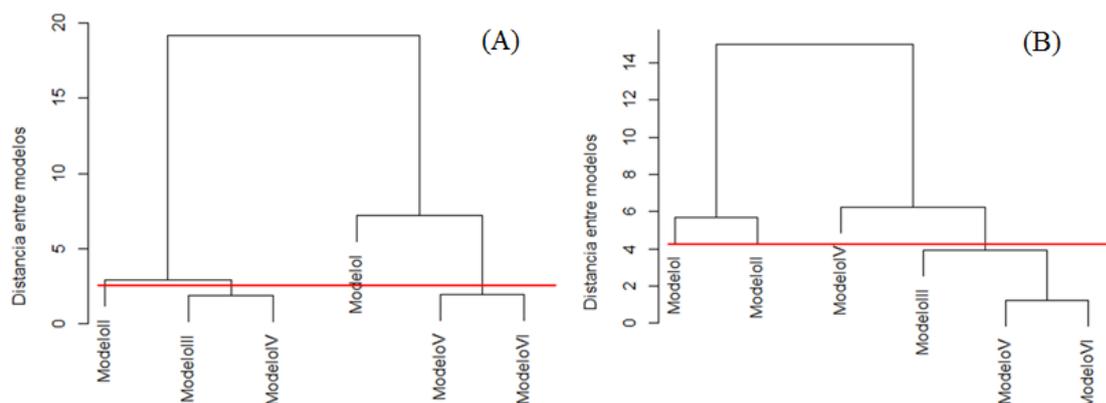
**Tabela 2.** Distância euclidiana resultante da análise dos modelos para estimação do CAR com base nas características de desempenho de bovinos classificados para baixo CAR (diagonal inferior) e alto CAR (diagonal superior).

	Modelo I	Modelo II	Modelo III	Modelo IV	Modelo V	Modelo VI
Modelo I	-	5,67	5,21	8,36	6,37	7,06
Modelo II	10,30	-	8,63	12,73	9,31	9,36
Modelo III	12,32	3,32	-	4,32	2,97	3,02
Modelo IV	10,95	2,00	1,90	-	5,35	5,39
Modelo V	6,35	7,25	8,21	7,47	-	1,25
Modelo VI	5,37	6,84	8,03	6,99	1,16	-

Essas estimativas evidenciam os graus de similaridade e dissimilaridade entre os modelos avaliados. Os resultados mostram que a maior dissimilaridade ocorre entre o modelo I com o modelo IV (11,00), modelo II (10,30) e modelo III (12,32) e a maior

similaridade entre os modelos V e VI, com valor estimado de 0,96 de distância euclidiana média para bovinos classificados para baixo CAR.

Para bovinos classificados para alto CAR, o modelo I apresentou a maior dissimilaridade em comparação aos outros modelos. As maiores similaridades de desempenho dos animais ocorreram entre os modelos V e VI para estimação do CAR. Em programas que buscam a obtenção de animais superiores para eficiência alimentar a considerável divergência entre os animais classificados para alto e baixo CAR, por diferentes modelos, indicam que o modelo utilizado para estimar o CAR pode trazer diferenças no desempenho produtivo dos animais, devido o maior distanciamento de características produtivas dos animais classificados pelo Modelo VI em relação ao Modelo I (Figura 1).



**Figura 1.** Dendrograma resultante da análise dos modelos para estimação do CAR com base nas características de desempenho de bovinos classificados para baixo consumo alimentar (A) e alto consumo alimentar (B).

A partir do agrupamento pelo método de Ward, o modelo V e o modelo VI puderam compor o primeiro grupo, com maior homogeneidade entre desempenho dos animais. O modelo III e o modelo IV formaram outro grupo homogêneo baseado nos resultados de variância intra-grupo. O modelo II e o modelo I formaram grupos isolados, devido o desempenho dos animais classificados para baixo CAR se distanciarem do desempenho produtivo para outros modelos (Figura 1 [A]).

A partir do agrupamento dos modelos de estimação do IMS pelo método de Ward (Figura 1 [B]), o modelo III, o modelo V e o modelo VI puderam compor o primeiro grupo, com maior homogeneidade entre os animais. O modelo I, o modelo II e

o modelo IV formaram grupos isolados, devido ao desempenho dos animais classificados para baixo CAR se distanciar do desempenho produtivo dos animais estimados para outros modelos (Figura 1 [B]).

Os modelos avaliados que apresentaram a deposição tecidual como variável no ajuste para estimar o CAR, apresentaram informações relevantes sobre a influência das características de ultrassom sobre a variação da IMS devido à possibilidade de alterar a composição corporal indiretamente, através de seleção para CAR em modelos que não apresenta deposição tecidual (Modelo I e II).

Por meio da análise de agrupamento, observou-se que a inclusão de medidas de composição corporal asseguram que o modelo para estimar o CAR descreva de forma precisa os processos de manutenção e de produção, resultados semelhantes foram observados por Basarab et al. (2003), embora a pressão de seleção potencial que pode ser aplicada ao CAR seja reduzida, à medida que mais variáveis são incluídas no modelo.

Embora a inclusão de medidas de composição corporal tenha aumentado a quantidade da variação contabilizada no modelo para a previsão da ingestão de matéria seca no presente estudo, Arthur et al. (2003) observou correlações altamente significativas entre os modelos para estimação do CAR sem medidas de composição corporal com modelo considerando a composição corporal, sugerindo que não seria necessário incluir esta características na estimativa do CAR e que a reclassificação dos animais entre os diferentes modelos apresentam mínima proporção.

O CAR estimado pelos diferentes modelos estudados apresentaram correlações fenotípicas e de rank de alta magnitude, indicando que os animais selecionados para maior eficiência não alteram sua posição nos diferentes modelos avaliados (Tabela 3). Estes resultados de correlação de rank concordam com os resultados encontrados por Arthur et al. (2003); Knott et al. (2008) que indicaram que os animais selecionados para maior eficiência em modelos que consideram a composição corporal continuam sendo o mais eficientes quando a seleção para o CAR é realizada utilizando modelos de Koch para o ajuste do consumo de alimentos.

**Tabela 3.** Correlação fenotípica (diagonal inferior) e correlação de Spearman (acima da diagonal) de características de desempenho e CAR calculado por diferentes modelos de estimação.

	PVI	PVF	IMS	IMSpv	GMD	EA	CA	GPR	CGR	CAR I	CAR II	CAR III	CAR IV	CAR V	CAR VI
PVI		0,68**	0,29**	-0,15	-0,07	-0,33**	0,33**	-0,37**	-0,09	0,003	-0,0004	0,009	0,011	0,031	0,03
PVF	0,73**		0,64**	0,23*	0,62**	0,27**	-0,27*	0,22*	0,07	-0,002	-0,015	-0,0007	-0,006	0,011	0,015
IMS	0,37**	0,72**		0,84**	0,64**	0,06	-0,05	-0,008	-0,54**	0,66**	0,65**	0,61	0,59**	0,58**	0,59**
IMSpv	-0,16	0,27**	0,84**		0,53**	0,06	-0,06	0,006	-0,67**	0,82**	0,79**	0,76**	0,76**	0,74**	0,74**
GMD	-0,07	0,68**	0,67**	0,57**		0,72**	-0,73**	0,68**	0,13	0,05	0,031	0,033	0,024	0,036	0,04
EA	-0,29*	0,29**	0,07	0,09	0,79**		-0,99**	0,99**	0,64**	-0,47**	-0,49**	-0,45**	-0,45**	-0,44**	-0,44**
CA	0,29*	-0,28**	-0,06	-0,08	-0,77**	-0,98**		-0,99**	-0,65**	0,47**	0,49**	0,44**	0,45**	0,44**	0,44
GPR	-0,32**	0,25**	0,001	0,03	0,75**	0,99**	-0,97**		0,68**	-0,52**	-0,53**	-0,48**	-0,49**	-0,47**	-0,48**
CGR	-0,06	0,06	-0,54**	-0,66**	0,2	0,68**	-0,67**	0,72**		-0,97**	-0,96**	-0,91**	-0,91**	-0,88**	-0,89**
CAR I	-0,02	0,001	0,64**	0,81**	-0,001	-0,51**	0,50**	-0,56**	-0,98**		0,99**	0,94**	0,94**	0,91**	0,91**
CAR II	-0,03	0,001	0,64**	0,79**	-0,001	-0,51**	0,50**	-0,55**	-0,97**	0,99**		0,93**	0,93**	0,90**	0,90**
CAR III	-0,02	0,001	0,60**	0,76**	-0,0001	-0,47**	0,48**	-0,52**	-0,91**	0,94**	0,92**		0,99**	0,96**	0,97**
CAR IV	-0,02	0,001	0,60**	0,76**	-0,0001	-0,47**	0,48**	-0,52**	-0,91**	0,94**	0,92**	0,99**			0,97**
CAR V	-0,02	0,01	0,58**	0,73**	0,0001	-0,46**	0,46**	-0,51**	-0,88**	0,90**	0,89**	0,97**	0,97**		0,99**
CAR VI	-0,02	0,01	0,58**	0,73**	0,0001	-0,46**	0,46**	-0,51**	-0,89**	0,91**	0,89**	0,97**	0,97**	0,99**	

\*\* P<0,01; \*P<0,05 pelo teste t

PVI – peso no início do confinamento, PVF – peso ao final do confinamento, IMS – ingestão de matéria seca, IMSpv – ingestão de matéria seca por peso vivo, GMD – ganho médio diário, EA - eficiência alimentar, CA – conversão alimentar, GPR – ganho de peso residual, CGR - Consumo e Ganho Residual, CARI – CAR estimado pelo modelo de Koch; CARII – O CAR ajustado pelo GMD e PVM<sup>0,75</sup> considerando efeito linear e quadrático das variáveis e a interação; CARIII – O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD e espessura de gordura subcutânea na 13ª costela ao fim do teste (EGSf); CARIV – O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD, EGSf e área de olho de lombo no final do experimento (AOLf); CARV - O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD, EGSf, AOLf, espessura de gordura subcutânea na garupa ao fim do teste (EGPf); CARVI - O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD, espessura de gordura corporal (GORD) sendo a média da EGSf e EGPf..

A área de olho de lombo (inicial, final e ganho) apresentou correlações não significativas ( $P > 0,05$ ) com os modelos avaliados (Tabela 4). Estes resultados concordam com os encontrados por Lancaster et al. (2009). Esses dados não estão de acordo com o estudo de Leme e Gomes (2007) que encontraram relação do CAR com a AOL em animais zebuínos, sendo que os animais mais eficientes tiveram maiores áreas de olho de lombo. De acordo com o presente estudo, animais mais eficientes para CAR não teriam menor rendimento de carne magra presente na carcaça e assim não teriam prejuízos para a quantidade de porção comestível da carcaça.

Foram observadas relações entre os modelos utilizados para a estimação do CAR com características de deposição de gordura em animais classificados para alto e baixo CAR, onde os modelos que não consideram essas características por ultrassom para estimar o CAR (MI e MII) apresentaram relação positiva com a deposição de gordura, indicando que o aumento do CAR resultaria no aumento na deposição de gordura corporal (Tabela 4). Richardson et al. (2001) avaliando a composição corporal de progênes de touros e matrizes selecionados, verificaram diferenças entre animais CAR positivos e negativos, sendo que aqueles mais eficientes apresentaram menor espessura de gordura subcutânea, sugerindo que bovinos em crescimento mais eficientes, apresentam um ganho maior em proteína do que em gordura.

O CAR, dependendo do modelo utilizado para a estimação, apresentou associação à composição do ganho de tal forma que os animais mais eficientes apresentaram redução na gordura de acabamento (Tabela 4). Robinson e Oddy (2004), estudando a eficiência alimentar de bovinos de corte, encontraram correlação significativa entre CAR e espessura de gordura conforme observado no estudo.

Esta tendência à menor deposição de espessura de gordura apresentada pelos animais CAR negativo, tem sido alvo de preocupação entre os estudiosos, já que poderá levar a uma depreciação da qualidade da carcaça. Assim, dada a importância da gordura subcutânea para a maciez da carne bovina por evitar queda brusca de temperatura, e conseqüentemente, o encurtamento de fibras musculares pelo frio (Zorzi et al., 2013; Duarte et al., 2013). No entanto, para corrigir tais problemas, tem sido sugerido que o consumo de matéria seca predito seja calculado também em função da espessura de gordura subcutânea (McDonagh et al., 2001).

**Tabela 4.** Correlação fenotípica de características de deposição tecidual e CAR estimados por diferentes modelos.

	AOLi	AOLf	AOLg	EGSi	EGSf	EGSg	EGPi	EGPf	EGPg	gord
CGR	0,02	-0,03	-0,048	-0,21*	-0,34**	-0,24*	-0,27**	-0,37**	-0,20*	-0,41**
GPR	-0,04	0,06	0,089	-0,23*	-0,20*	-0,07	-0,2	-0,18	-0,03	-0,22*
CAR I	-0,05	0,05	0,08	0,18	0,34**	0,26**	0,26**	0,38**	0,23*	0,42**
CAR II	-0,05	0,05	0,092	0,18	0,34**	0,26**	0,26**	0,39**	0,24*	0,43**
CAR III	0,02	0,05	0,035	0,02	0,0001	-0,02	0,11	0,18	0,16	0,13
CAR VI	0,004	0,0002	-0,003	0,031	-0,0004	-0,02	0,11	0,17	0,17	0,13
CAR V	0,03	-0,0006	-0,02	0,0014	-0,0003	-0,0013	-0,034	-0,0001	0,038	-0,0003
CAR VI	0,04	0,045	0,013	-0,004	-0,006	-0,004	-0,023	0,006	0,034	0,0003
AOLi		0,346*	-0,43**	-0,002	-0,12	-0,14	-0,12	-0,16	-0,08	-0,17
AOLf			0,69**	-0,06	0,07	0,12	0,07	0,04	-0,01	0,06
AOLg				-0,06	0,16	0,23*	0,16	0,17	0,05	0,19
EGSi					0,46**	-0,14	0,60**	0,34**	-0,21*	0,45**
EGSf						0,81**	0,42**	0,52**	0,25*	0,84**
EGSg							0,06	0,36**	0,42**	0,64**
EGPi								0,70**	-0,15	0,66**
EGPf									0,59**	0,89**
EGPg										0,50**

\*\* P<0,01; \*P<0,05 pelo teste t.

CAR I – CAR estimado pelo modelo de Koch; CAR II – O CAR ajustado pelo GMD e PVM<sup>0,75</sup> considerando efeito linear e quadrático das variáveis e a interação; CAR III – O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD e espessura de gordura subcutânea na 13ª costela ao fim do teste (EGSf); CAR IV – O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD, EGSf e área de olho de lombo no final do experimento (AOLf); CAR V - O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD, EGSf, AOLf, espessura de gordura subcutânea na garupa ao fim do teste (EGPf); CAR VI - O CAR ajustado pelo PVM<sup>0,75</sup>, GMD, espessura de gordura corporal (GORD) sendo a média da EGSf e EGPf. AOLi - área de olho de lombo (cm<sup>2</sup>) no início do confinamento, AOLf - área de olho de lombo (cm<sup>2</sup>) no final do confinamento; AOLg – ganho em área de olho de lombo (cm<sup>2</sup>), EGSi - espessura de gordura na 13ª costela (mm) no início do confinamento, EGSf - espessura de gordura na 13ª costela (mm) no final do confinamento, EGSg – ganho em espessura de gordura na 13ª costela (mm), EGPi – espessura de gordura na garupa (mm) no início do confinamento, EGPf – espessura de gordura na garupa (mm) no final do confinamento, EGPg – ganho em espessura de gordura na garupa (mm).

O CAR estimado com o ajuste para deposição tecidual, não foi correlacionado com características de carcaça, apresentando assim impacto mínimo para as características de carcaça (Tabela 4). Animais classificados para CAR que não levaram a composição da carcaça na sua estimação, foram correlacionados com características de carcaça, indicando que o aumento do CAR aumentaria a deposição de EGSf, EGSg, EGPI, EGPf, EGPg e GORD. Segundo alguns autores (Arthur et al., 2003; Basarab et al., 2003; Lancaster et al., 2009) a inclusão de variáveis de deposição tecidual podem ser úteis para reduzir o impacto potencial da seleção de animais para CAR em características de qualidade da carcaça.

Os modelos que corrigiram a estimação do CAR para deposição de gordura corporal, média da gordura na EGS e EGP no fim do confinamento, e pela composição corporal, não apresentaram relação com as características de deposição de gordura corporal, por ajustar a estimação do consumo de alimentos ao aumento desproporcional da energia necessária para a manutenção, devido a alterações no parcionamento energético e ao excesso de energia consumida, sendo depositada como tecido adiposo (Tabela 5). Resultados semelhantes foram observados por Lancaster et al. (2009), em que o CAR ajustado para deposição de gordura não apresentou relação fenotípica com as características de deposição tecidual, devido a ocorrer o ajuste da estimação da ingestão de alimentos para deposição de gordura corporal. Schenkel et al. (2004) relatou que o CAR ajustado para a deposição tecidual não apresentou correlação genética com características de carcaça.

As diferenças entre os grupos de eficiência (CAR) estimadas por diferentes modelos, indicam que os animais mais eficientes tiveram menor deposição de gordura subcutânea no músculo Biceps femoris (EGP), Longissimus dorsi (EGS), ao final do confinamento e para o ganho em deposição de gordura em comparação com os animais menos eficientes para os modelos que não consideraram as características de deposição corporal para a estimação da eficiência alimentar (Tabela 5). Não foram observadas outras diferenças significativas entre os grupos de eficiência alimentar para os modelos que incluíram as variáveis de deposição tecidual.

**Tabela 5.** Características de carcaça mensuradas por ultrassonografia de touros Nelore classificados por diferentes modelos de estimação do CAR.

Modelo	Classificação CAR		Pr >  t
	Eficiente (Baixo CAR)	Ineficiente (Alto CAR)	
EGSi			
Modelo I	1,02	1,49	0,12
Modelo II	1,05	1,54	0,1
Modelo III	1,21	1,20	0,96
Modelo IV	1,24	1,30	0,82
Modelo V	1,16	1,21	0,84
Modelo VI	1,22	1,20	0,96
EGSf			
Modelo I	3,92	5,55	0,001
Modelo II	4,09	5,58	0,004
Modelo III	4,77	4,64	0,813
Modelo IV	4,69	4,61	0,896
Modelo V	4,48	4,60	0,812
Modelo VI	4,65	4,64	0,980
EGSg			
Modelo I	2,90	4,06	0,012
Modelo II	3,04	4,04	0,031
Modelo III	3,56	3,45	0,801
Modelo IV	3,45	3,31	0,765
Modelo V	3,32	3,39	0,879
Modelo VI	3,43	3,45	0,964
EGPi			
Modelo I	2,57	3,56	0,051
Modelo II	2,57	3,27	0,168
Modelo III	2,98	3,22	0,627
Modelo IV	2,94	3,35	0,409
Modelo V	3,13	2,71	0,401
Modelo VI	3,20	2,81	0,430
EGPf			
Modelo I	6,05	7,97	0,002
Modelo II	6,03	7,74	0,006
Modelo III	6,48	7,54	0,089
Modelo IV	6,35	7,66	0,035
Modelo V	6,96	6,89	0,904
Modelo VI	7,03	6,98	0,931
EGPg			
Modelo I	3,48	4,41	0,031
Modelo II	3,46	4,47	0,019
Modelo III	3,50	4,32	0,056
Modelo IV	3,41	4,30	0,035
Modelo V	3,83	4,17	0,413
Modelo VI	3,83	4,16	0,42
GORDURA			
Modelo I	4,99	6,76	0,0005
Modelo II	5,06	6,66	0,001
Modelo III	5,63	6,09	0,353
Modelo IV	5,52	6,14	0,213
Modelo V	5,72	5,74	0,958
Modelo VI	5,84	5,81	0,951

Analisando em relação à eficiência de deposição de tecidual, o CAR está relacionado com a composição do ganho de peso, animais mais eficientes tenderiam a apresentar carcaças mais magras. Observou que animais mais eficientes apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) de acordo com o modelo utilizado (Modelo I e II) para estimação do CAR. Estas diferenças proporciona menor acabamento e gordura intramuscular, devido a energia requerida para depositar 1 kg de tecido magro ser cerca de 25% da energia necessária para depositar a mesma quantidade de gordura, o que poderia, inclusive, afetar aspectos qualitativos da carne, não sendo interessante do ponto de vista mercadológico (McDonagh et al., 2001; Basarab et al., 2003; Baker et al., 2006).

## **Conclusão**

A avaliação de diferentes modelos utilizados para calcular o CAR, mostrou que os modelos que consideram a deposição de gordura podem ser mais apropriados por apresentarem melhor ajuste do modelo ( $R^2$ , BIC e RSE).

Sugere-se que o modelo para estimação do CAR inclua características de composição tecidual por reduzir o impacto potencial da seleção na deposição de gordura. Animais avaliados por modelos que não inclui variáveis de deposição tecidual apresentaram relações com as características de carcaça.

## **Referências**

ARTHUR P. F., HERD R. M., ARCHER J. A. Should measures of body composition be included in the model for residual feed intake in beef cattle? **Proceedings..** Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics. v.15, p.306–309, 2003.

BASARAB, J.; MILLER, S.; CROWLEY, J. An evaluation of alternate feed efficiency estimates in beef cattle. Paper, Agricultural & Applied Economics Association's, **Joint Annual Meeting**, p.4-6, 2013.

BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; AALHUS, J.L.; OKINE, E.K.; SNELLING, W.M.; LYLE, K.L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 83, n.2, p.189–204, 2003.

BAKER, S.D.; SZASZ, J.I.; KLEIN, T.A. , KUBER, P.S.; HUNT, C.W.; GLAZE, J.B. JR; FALK, D.; RICHARD, R.; MILLER, J.C.; BATTAGLIA, R.A.; HILL R.A. Residual feed intake of purebred Angus steers: effects on meat quality and palatability. **Journal of Animal Science**, v.84, n.4, p.938-945, 2006.

BERRY, D.P.; CROWLEY, J.J. Residual intake and body weight gain: a new measure of efficiency in growing cattle. **Journal Animal Science**. v. 90, n.1, p.109-115, 2012.

BIRKETT, S.; DE LANGE, K. Limitations of conventional models and a conceptual framework for a nutrient flow representation of energy utilization by animals. **British Journal of Nutrition**. v.86, n.6, p.647–659, 2001.

DUARTE, M.S.; PAULINO, P.V.R.; DAS, A.K.; WEI, S.; SERAO, N.V.L.; FU, X.; HARRIS, S.M.; DODSON, M.V.; DU, M. Enhancement of adipogenesis and fibrogenesis in skeletal muscle of Wagyu compared with Angus cattle. **Journal of Animal Science**. v.91, n.6, p.2938-2946, 2013.

FRANÇOIS, D., BIBÉ, B., BOUIX, J., BRUNEL, J.C., WEISBECKER, J.L., RICARD, E. Genetic parameters of feeding traits in meat sheep. In: Proc. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, France, Comm. No. 10-10, 2002.

HOQUE, M.A.; KADOWAKI, H.; SHIBATA, T.; OIKAWA, T.; SUZUKI, K. Genetic parameters for measures of residual feed intake and growth traits in seven generations of duroc pigs. **Livestock Science**. v.121, n.1, p.45-49, 2009.

KHATTREE, R.; NAIK, D.N. Multivariate data reduction and discrimination with SAS software. New York: John Wiley and Sons, 2000.

KNOTT, S.A.; CUMMINS, L.J.; DUNSHEA, F.R.; LEURY, B.J. The use of different models for the estimation of residual feed intake (RFI) as a measure of feed efficiency in meat sheep. *Animal Feed Science and Technology*. v.143, n.1-4, p.242–255, 2008.

LANCASTER, P.A.; CARSTENS, G.E.; CREWS JR, D.H.; WELSH JR; T.H.; FORBES, T.D.A. FORREST, D.W. TEDESCHI, L.O. RANDEL, R.D.; ROUQUETTE, F.M. Phenotypic and genetic relationships of residual feed intake with performance and ultrasound carcass traits in Brangus heifers. **Journal of Animal Science**. v.87, n.12, p.3887-3896, 2009.

LEME, P.R., GOMES, R.C. Características de carcaça de novilhos Nelore com diferente consumo alimentar residual. In: XX Reunión Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA). Cuzco, Perú. Anais da XX Reunión Asociación Latinoamericana de Produccion Animal (ALPA), 2007.

McDONAGH, M. B.; HERD, R. M.; RICHARDSON, E. C.; ODDY, V. H.; ARCHER, J. A.; ARTHUR, P. F. Meat quality and the calpain system of feedlot steers following a single generation of divergent selection for residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v.41, n.7, p.1013–1021, 2001.

MAECHLER, M., ROUSSEEUW, P., STRUYF, A., HUBERT, M., HORNIK, K. cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 1.14.4., 2013.

MONTANHOLI, Y.R.; SWANSON, K.C.; SCHENKEL, F.S.; MCBRIDE, B.W.; CALDWELL, T.R.; MILLER, S.P. On the determination of residual feed intake and associations of infrared thermography with efficiency and ultrasound traits in beef bulls. **Livestock Science**. v.125, n.1, p.22-30, 2009.

RAUW, W. M.; SOLER, J.; TIBAU, J.; REIXACH, J.; RAYA, L.G. Feeding time and feeding rate and its relationship with feed intake, feed efficiency, growth rate, and rate of fat deposition in growing Duroc barrows. **Journal of animal science**, v.84, n.12, p. 3404-3409, 2006.

ROBINSON, D. L.; ODDY, V. H. Genetic parameters for feed efficiency, fatness, muscle area and feeding behaviour of feedlot finished beef cattle. **Livestock Production Science**. v.90, n.2-3, p.255–270, 2004.

SCHENKEL, F.S., MILLER, S.P., WILTON, J.W. Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth, and body composition traits of young beef bulls. **Canadian Journal of Animal Science**. v.84, n.2, p.177–185, 2004.

TIXIER-BOICHARD, M.; BORDAS, A.; RENAND, G.; BIDANEL, J.P. Residual food consumption as a tool to unravel genetic components of food intake. In: 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France, **Proceedings**, Session v.10, 2002.

VAN DER WERF, J.H.J. Is it useful to define residual feed intake as a trait in animal breeding programs? **Australian Journal of Experimental Agriculture**. v.44, n.5, p. 405–409, 2004.

ZORZI, K.; BONILHA, S.F.M.; QUEIROZ, A.C.; BRANCO, R.H.; SOBRINHO, T.L.; DUARTE, M.S. Meat quality of young Nellore bulls with low and high residual feed intake. **Meat Science**. v.93, n.3 , p. 593-599, 2013.