



**DALTON MENDES DE OLIVEIRA**

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO  
METABOLISMO LIPÍDICO NO MÚSCULO DE  
BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS COM  
FONTES DE LIPÍDEOS**

**LAVRAS-MG**

**2013**

**DALTON MENDES DE OLIVEIRA**

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO  
LIPÍDICO NO MÚSCULO DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS  
COM FONTES DE LIPÍDEOS**

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

Orientador

Dr. Márcio Machado Ladeira

**LAVRAS - MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Oliveira, Dalton Mendes de.

Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no  
músculo de bovinos de corte alimentados com fontes de lipídeos /  
Dalton Mendes de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2013.

145 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Marcio Machado Ladeira.

Bibliografia.

1. *Bos taurus*. 2. Nutrigenômica. 3. mRNA. 4. Oleaginosas. 5. Tecido  
muscular. 6. Ácidos graxos. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD – 636.213

**DALTON MENDES DE OLIVEIRA**

**EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO  
LIPÍDICO NO MÚSCULO DE BOVINOS DE CORTE ALIMENTADOS  
COM FONTES DE LIPÍDEOS**

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

APROVADA em 03 de Outubro de 2013.

Dr. Mário Luiz Chizzotti UFV

Dr. Antônio Chalfun Junior UFLA

Dra. Priscila Vieira e Rosa UFLA

Dr. Horllys Gomes Barreto UFT

Dr. Márcio Machado Ladeira  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2013**

Aos meus Pais *Altino* e *Maria do Carmo*,

Irmãos *Aline* e *Altino Jr*

Namorada *Viviane Borges*

Sempre me apoiaram para que este objetivo fosse alcançado e que  
souberam entender a minha ausência em vários momentos durante esta jornada.

Obrigado por tudo...

**DEDICO**

Vó *Paulina Inácia de Jesus* (*in memoriam*)

Que agora intercede por nós junto ao Pai do Céu

**DEDICO ESPECIAL**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Maria Santíssima, pelo dom da vida. Obrigado por sempre guiarem os meus passos, amparar-me nos momentos difíceis, mostrar-me os caminhos nas horas incertas e proteger-me sempre.

Aos meus pais, Altino e Maria do Carmo que, em nenhum momento, mediram esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos. Obrigado por me conduzirem, ensinando-me como seguir o melhor caminho, sem precisar transpor as amizades e perder a humildade.

Aos meus irmãos, Aline e Altino Júnior que, de forma indireta, porém não menos importante, apoiaram-me sempre por meio de um incentivo ou palavra amiga.

À minha namorada por todo amor, carinho, amizade, incentivo e companheirismo que tem me dado todos estes anos que estamos juntos. Obrigado pelos sacrifícios a que esta tese a obrigaram e por me dar forças nos momentos de fraqueza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Machado Ladeira, pois confiou na minha capacidade e nos frutos deste projeto. Nossas conversas foram sempre muito esclarecedoras. Estes foram valiosos anos para a minha formação e isto jamais será perdido. Muito Obrigado!

Ao Prof. Dr. Antonio Chalfun Júnior, pela acolhida, amizade e pelos ensinamentos transmitidos que me auxiliaram em toda essa jornada e pelas conversas que colaboraram imensamente para a solução dos problemas com que me deparei ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Chizzotti pela ajuda e dedicação, ao elaborar os dados estatísticos e pela grande amizade.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Programa de pós-graduação em Zootecnia e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de MG (FAPEMIG) por financiar minha bolsa de estudo e acreditar em meu potencial.

Aos meus amigos da pós-graduação do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP): Horllys, Solange, Carla, Joáz, André, Samuel e Bárbara pelo convívio agradável, pelo conhecimento compartilhado e constante apoio que foram imprescindíveis para que este trabalho fosse concluído. Aos demais integrantes do LBMP, o meu muito obrigado.

Ao Laboratório de Bioquímica Vegetal (Meline, Camila, Cinthia e Hebert).

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM), em especial, Prof. Dr. Luciano, Fabrício e Eliete.

Às estagiárias, Priscilla e Maria Cecília e, em especial, à Tamara pelas várias horas de dedicação para a conclusão das análises laboratoriais.

Aos amigos e companheiros da pós-graduação em Zootecnia.

Ao hoje Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto e Me Leonardo de Castro Santarosa, pela disponibilização das amostras utilizadas na elaboração dos dados desta tese.

Ao Núcleo de Estudo em Pecuária de Corte (NEPEC).

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e graduação em Zootecnia pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia que participaram, positivamente, na minha formação acadêmico-científica.

“Esperei com paciência no Senhor, e o Senhor ouviu o meu clamor”  
(Salmo 40,1)



## RESUMO GERAL

Objetivou-se neste estudo analisar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* (LD) de bovinos, em duas condições experimentais, primeiro: alimentados com grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M) e, segundo: alimentados com dietas contendo grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E). Foram utilizados 28 tourinhos Red Norte, com idade média de 20 meses em cada experimento, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 x 2. As dietas apresentaram em média 6,5% de extrato etéreo e a silagem de milho utilizada como volumoso. A suplementação diária de monensina foi de 230 mg/cabeça/dia, enquanto que a de vitamina E foi de 2.500 UI/cabeça/dia. 24h *post mortem* foram coletadas amostras do músculo LD. Foram avaliados os genes: receptor ativador por peroxissomas  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), fator de transcrição de proteínas ligantes aos esteroides (SREBP-1c), esteroil CoA dessaturase (SCD1), acetil CoA carboxilase (ACC), lipoproteína lipase (LPL), proteína de ligação ao ácido graxo (FABP<sub>4</sub>) e glutathione peroxidase (GPX1). A expressão gênica foi analisada, utilizando a técnica de RT-qPCR. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. Posteriormente, os dados foram analisados no PROC GLM e no PROC CORR do SAS 9.2. No primeiro experimento, o gene PPAR- $\alpha$  foi mais expresso no músculo LD dos animais alimentados com GSM, sendo o ácido esteárico o principal responsável. O gene SCD1 foi mais expresso no tratamento onde os animais foram alimentados com GS e suplementados com M. As expressões da LPL e FABP<sub>4</sub> foram maiores ( $P < 0,05$ ) no músculo LD dos animais alimentados com as dietas contendo GS e, além disto, ambos apresentaram correlação positiva com o ácido esteárico. O ácido araquidônico e o  $\alpha$ -linolênico foram os principais ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) que apresentaram correlações com os genes avaliados. No segundo experimento houve interação ( $P < 0,05$ ) entre a oleaginosa e a vitamina E para os genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-1c, no entanto, fontes de AGPI apresentaram respostas inversas sobre a expressão destes genes. O gene SCD1 foi mais expresso no tratamento com CA sem vitamina E, comportamento inverso ao apresentado pelo gene GPX1. Os genes FABP<sub>4</sub> e LPL foram mais expressos ( $P < 0,05$ ) nas dietas com inclusão de grão de soja. Foi possível observar que os ácidos graxos linoleico e oleico apresentaram correlações antagônicas para três genes: PPAR- $\alpha$ , ACC e FABP<sub>4</sub>. A expressão gênica de genes envolvidos no metabolismo lipídico foi afetada pela fonte lipídica e pela suplementação.

Palavras-chave: *Bos taurus*. Nutrigenômica. mRNA. Oleaginosa. tecido muscular.

## GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the expression of genes involved in lipid metabolism in the *longissimus dorsi* (LD) muscle of beef cattle in two experimental conditions, first: fed soybean grain (SB) or rumen protected lipid (RPL), with or without supplementation with monensin (M); and second: fed diets containing soybean grain (SB) or cottonseed (CS), supplemented or not with vitamin E (E). Twenty eight Red Norte bulls, with an average age of 20 months were used in each experiment, allotted in a completely randomized design using a 2 x 2 factorial arrangement. The diets contained an average of 6.5% ether extract and corn silage was used as forage. Monensin supplementation was of 230 mg/head/day, while vitamin E supplementation was of 2500 IU/head/day. 24h *post mortem*, samples were collected from the LD muscle. The evaluated genes were: peroxisome proliferator activator receptor  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), sterol regulatory element binding protein (SREBP-1c), stearoyl CoA desaturase (SCD1), acetyl CoA carboxylase (ACC), lipoprotein lipase (LPL), adipocyte-type fatty acid binding protein (FABP<sub>4</sub>) and glutathione peroxidase (GPX1). Gene expression was analyzed using the RT-qPCR technique. The Shapiro-Wilk test was used in order to verify data normality. Posteriorly, the data were analyzed in the SAS 9.2 PROC GLM and PROC CORR. In the first experiment, the PPAR- $\alpha$  gene was more expressive in the LD muscle of animals fed SBM, with stearic acid being the main responsible factor. The SCD1 gene was more expressive in the treatment in which animals were fed SB supplemented with M. The expressions from LPL and FABP<sub>4</sub> genes were higher ( $P<0.05$ ) in the LD muscle of animals fed diets containing SB grain, moreover, both were positively correlated with stearic acid. Arachidonic and  $\alpha$ -linolenic acids were the main polyunsaturated fatty acids (PUFA) which presented correlations with the evaluated genes. In the second experiment, there was interaction ( $P<0.05$ ) between oilseed and vitamin E for the PPAR- $\alpha$  and SREBP-1c genes. However, the PUFA sources showed inverse relationship of the expression of these genes. The SCD1 gene was more expressive in the treatment with CS without vitamin E, the reverse being true to the GPX1 gene. FABP<sub>4</sub> and LPL genes were more expressive ( $P<0.05$ ) in diets containing soybean. We observed that the linoleic and oleic fatty acids showed antagonistic correlations toward three genes: PPAR- $\alpha$ , ACC and FABP<sub>4</sub>. The gene expression of genes involved in lipid metabolism was affected by the lipid source and by the supplementation.

Key words: *Bos taurus*. Nutrigenomics. mRNA. Muscle tissue. Oilseed.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 Mecanismo proposto para efeito dos ácidos graxos, por meio das SREBPs na regulação de enzimas chave da lipogênese (setas cheias indicam maior efeito, enquanto setas pontilhadas indicam menor efeito).....25
- Figura 2 Vias de biohidrogenação dos ácidos  $\alpha$ -linolênico (A), linoleico (B) e oleico (C) .....41
- Figura 3 Esquema ilustrativo da atuação dos fatores de transcrição.....44

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Expressão relativa dos genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-1c no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M) ..... 82
- Figura 2 Expressão relativa dos genes SCD1 e ACC no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M) ..... 84
- Figura 3 Expressão relativa dos genes LPL, FABP<sub>4</sub> e GPX1 no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M) ..... 88

### CAPÍTULO 3

- Figura 1 Expressão relativa dos genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-1c no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E) ..... 123
- Figura 2 Expressão relativa dos genes SCD1 e ACC no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E) ..... 125
- Figura 3 Expressão relativa dos genes LPL, FABP<sub>4</sub> e GPX1 no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E) ..... 129

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composição percentual de ingredientes, bromatológica e composição dos principais ácidos graxos das dietas experimentais: grão de soja sem monensina (GS), grão de soja + monensina (GSM), gordura protegida sem monensina (GP) e gordura protegida + monensina (GPM).....	72
Tabela 2	Sequência dos primers (5' para 3') que foram usados na PCR quantitativa em tempo real .....	76
Tabela 3	Amplicon e eficiência dos primers utilizados na PCR quantitativa em tempo real .....	79
Tabela 4	Coefficientes da correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo <i>longissimus dorsi</i> em bovinos.....	86
Tabela 5	Coefficientes da Correlação de Pearson entre o perfil de ácidos graxos e a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo <i>longissimus dorsi</i> em bovinos .....	91
Tabela 6	Coefficientes da correlação de Pearson dos índices de dessaturação e da elongase com a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo.....	97

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Composição percentual de ingredientes, bromatológica e composição dos principais ácidos graxos das dietas experimentais: grão de soja sem vitamina E (GS), grão de soja + vitamina E (GSE), caroço de algodão sem vitamina E (CA) e caroço de algodão + vitamina E (CAE) .....	113
----------	--	-----

Tabela 2	Sequência dos primers (5' para 3') que foram usados na PCR quantitativa em tempo real .....	117
Tabela 3	Amplicon e eficiência dos primers utilizados na PCR quantitativa em tempo real .....	120
Tabela 4	Coefficientes da correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo <i>longissimus dorsi</i> em bovinos.....	127
Tabela 5	Coefficientes da correlação de Pearson entre o perfil de ácidos graxos e a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo <i>longissimus dorsi</i> em bovinos .....	133
Tabela 6	Coefficientes da correlação de Pearson dos índices de dessaturação e da elongase com a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo.....	137

## LISTA DE ABREVIACOES

ACC	Acetil CoA Carboxilase
AGI	cido Graxo Insaturado
AGL	cido Graxo Livre
AGMI	cido Graxo Monoinsaturado
AGPI	cido Graxo Poli-insaturado
AGV	cido Graxo Volátil
CA	Caroço de Algodão
CAE	Caroço de Algodão + Vitamina E
cDNA	cido Dexorribonuclico Complementar
CLA	cido Linoléico Conjugado
DNA	cido Desoxirribonucléico
DHA	cido Docosaheptaenico
EPA	cido Eicosapentaenóico
FABP <sub>4</sub>	Proteína de Ligao ao cido Graxo
FAS	cido Graxo Sintase
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GP	Gordura Protegida
GPM	Gordura Protegida + Monensina
GPX1	Glutathione Peroxidase
GS	Grão de Soja
GSM	Grão de Soja + Monensina
GSE	Grão de Soja + Vitamina E
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
hnRNA	RNA nuclear heterogêneo
LD	<i>Longissimus dorsi</i>
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade



LPL	Lipoproteína Lipase
PPAR- $\alpha$	Receptor Ativado por Peroxissoma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-qPCR	Transcrição Reversa, seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SCD1	Estearoil CoA Dessaturase
SRE	Elemento Regulatório de Esterol
SREBP-1c	Fatores de Transcrição de Proteínas Ligantes aos Esteróides
$\omega$ -3	Ácido Graxo ômega 3
$\omega$ -6	Ácido Graxo ômega 6

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução Geral</b> .....	18
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>Receptor ativado por peroxissoma (PPAR)</b> .....	21
<b>2.2</b>	<b>Fatores de transcrição de proteínas ligantes aos esteroides (SREBPs)</b> .....	23
<b>2.3</b>	<b>Lipoproteína lipase (LPL) e proteína de ligação ao ácido graxo (FABP<sub>4</sub>)</b> .....	26
<b>2.4</b>	<b>Ação da acetil CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS)</b> .....	30
<b>2.5</b>	<b>Estearoil CoA Dessaturase (SCD)</b> .....	33
<b>2.6</b>	<b>Glutationa peroxidase (GPX)</b> .....	37
<b>2.7</b>	<b>Biohidrogenação ruminal</b> .....	39
<b>2.8</b>	<b>Controle da expressão gênica no tecido muscular</b> .....	43
<b>2.9</b>	<b>Análise da expressão gênica por RT-qPCR</b> .....	46
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
	<b>CAPÍTULO 2 Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos de corte alimentados com grão de soja e gordura protegida, suplementados ou não com ionóforo</b> .....	65
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	68
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	71
<b>2.1</b>	<b>Delineamento experimental, animais e dietas</b> .....	71
<b>2.2</b>	<b>Análises de ácidos graxos</b> .....	73
<b>2.3</b>	<b>Análises de expressão gênica</b> .....	74
<b>2.4</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	80
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	81
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	98
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99
	<b>CAPÍTULO 3 Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos de corte alimentados com grão de soja e caroço de algodão, suplementados ou não com vitamina E</b> .....	106
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	109
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	112
<b>2.1</b>	<b>Delineamento experimental, animais e dietas</b> .....	112
<b>2.2</b>	<b>Análises de ácidos graxos</b> .....	114
<b>2.3</b>	<b>Análises de expressão gênica</b> .....	115
<b>2.4</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	121
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	122

<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>139</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>140</b>

## **CAPÍTULO 1 Introdução Geral**

### **1 INTRODUÇÃO**

Em animais não ruminantes os ácidos graxos da dieta são absorvidos no intestino delgado e, posteriormente, incorporados nos tecidos (NUERNBERG et al., 2005), o que é restrito em ruminantes em decorrência da biohidrogenação microbiana que ocorre no rúmen. Assim, a composição de ácidos graxos nos tecidos em bovinos é menos dependente da dieta, em comparação com os não-ruminantes, pois há maior absorção de ácidos graxos saturados (AGS), o que não é vantajoso, visto que alguns destes ácidos graxos (láurico, mirístico e palmítico) elevam o teor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue (SALTER; TARLING, 2007). Várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de aumentar a concentração dos ácidos graxos benéficos na carne bovina por meio da manipulação da biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados (AGI) (LADEIRA; OLIVEIRA, 2007). Associado a estes fatores, há trabalhos na literatura (HILLER; HERDMANN; NUERNBERG, 2011; WATERS et al., 2009) que sugerem que a composição de ácidos graxos da carne pode ser controlada por fatores ainda mais específicos, tais como os genes relacionados com o metabolismo lipídico.

Diante disso, faz-se necessário ampliar os conhecimentos sobre o efeito das fontes lipídicas na expressão de genes importantes para o metabolismo lipídico. Dentre estas fontes, é comum o uso do grão de soja ou caroço de algodão, oleaginosas estas cultivadas em vários países, e que, em razão do elevado teor de ácido oleico e linoleico podem melhorar o perfil lipídico da carne bovina de animais submetidos a estas fontes alimentares (OLIVEIRA et al., 2011; SHINGFIELD; BONNET; SCOLLAN, 2013) além de gorduras protegidas ou sabões de cálcio. Estes últimos, por sua vez, caracterizam-se por

apresentar menor disponibilidade de ácidos graxos para a biohidrogenação (BAUMAN et al., 2003), o que aumentaria a disponibilidade de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) para absorção intestinal. Adicionalmente às fontes lipídicas, os aditivos que modificam a população microbiana e, conseqüentemente, os mecanismos envolvendo a biohidrogenação no rúmen (FELLNER; SAUER; KRAMER, 1997), também, podem ser utilizados com o objetivo de aumentar a disponibilidade de AGI no intestino delgado. Entretanto, o aumento no teor de AGPI, também, pode influenciar a vida de prateleira e os atributos sensoriais da carne (LEE et al., 2007), sendo a inclusão de vitamina E na dieta uma alternativa que pode reduzir a oxidação dos AGPI (LEE et al., 2007; SCOLLAN et al., 2006). Isto indica que a suplementação com antioxidantes regula enzimas metabolizadoras de peróxidos, como a glutathione peroxidase (GPX1).

As interações entre os nutrientes que compõem a dieta e o nível de expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico podem ilustrar inúmeras possibilidades no que diz respeito à deposição de ácidos graxos no tecido adiposo que, ainda, não foram analisadas. Isso é possível, em virtude da atividade biológica apresentada por certos lipídeos na dieta, com estimulação ou inibição de genes que codificam enzimas lipogênicas específicas (JUMP, 2002). Fontes ricas em AGPI têm a capacidade de modular a transcrição do gene que codifica a enzima esteroil CoA dessaturase (SCD1), enzima importante na conversão do ácido vaccênico em ácido linoleico conjugado (CLA), e que apresenta menor expressão gênica à medida que o teor de AGPI aumenta no tecido muscular (HERDMANN et al., 2010; WATERS et al., 2009). Além disto, destacam-se as proteínas ligantes aos elementos regulados por esteroides (SREBP-1c) (XU et al., 2001) e o receptor ativado por peroxissoma  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), que atuam na síntese de ácidos graxos e na via da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos no músculo (BIONAZ; HERING; LOOR, 2012), respectivamente.

Dessa forma, objetivou-se neste estudo investigar os efeitos de dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados sobre a expressão gênica do PPAR- $\alpha$ , SREBP-1c, GPX1 e de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos. Além disso, objetivou-se estudar as correlações entre as diferentes expressões analisadas e o perfil de ácidos graxos na carne dos animais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Receptor ativado por peroxissoma (PPAR)

O PPAR é uma família de receptores nucleares e que influenciados por ácidos graxos desempenham funções importantes na regulação do metabolismo de nutrientes e homeostase energética (LEMAY; HWANG, 2006). Os seus mecanismos não foram completamente elucidados quanto a sua ação e especificidade em alguns tecidos, principalmente, em ruminantes.

Basicamente, existem três isoformas de PPAR,  $\alpha$  (fígado),  $\gamma$  (adipócitos) e  $\delta/\beta$  (onipresente), que se diferenciam pelo tecido alvo, propriedades fisiológicas e estágios de desenvolvimento do tecido (DESVERGNE; WAHLI, 1999). Os PPARs, assim como vários receptores hormonais nucleares, são regulados por fosforilação. O PPAR- $\alpha$  foi demonstrado como sendo uma fosfoproteína em culturas primárias de adipócitos de ratos (SHALEV et al., 1996).

No entanto, a identificação dos AGI como ligantes dos PPARs fornece evidência sólida de que pelo menos parte da atividade deles é dependente de interação com moléculas de ácidos graxos (DESVERGNE; WAHLI, 1999). Os ácidos graxos ligam nos três PPARs e o PPAR- $\alpha$  apresenta maior afinidade. Em contraste, os ácidos graxos de cadeia longa (com mais de 20 átomos de carbono), que são ligantes fracos, parecem ser mais seletivos para PPAR- $\beta$  do que para PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  (KLIEWER et al., 1997). Comparado com os AGI, os AGS são ligantes fracos do PPAR, enquanto os ácidos graxos de cadeia ramificada se ligam de forma eficiente no PPAR- $\alpha$  (ELLINGHAUS et al., 1999).

Enquanto que os AGPI e seus metabólitos regulam a oxidação de ácidos graxos e termogênese via PPAR, em especial, as isoformas  $\alpha$ , eles, também,

podem regular alguns genes envolvidos na lipogênese via outros mecanismos que não são via PPAR. A descoberta de que alguns ácidos graxos podem agir como hormônios, que controlam a atividade dos fatores de transcrição, demonstra que essas moléculas não são meramente fontes de energia, mas também reguladores metabólicos. Estudos futuros devem investigar a distribuição de isoformas de PPAR no tecido, em relação ao teor qualitativo e quantitativo de ácidos graxos presentes no tecido.

Estudos *in vivo* (KERSTEN et al., 1999; RAKHSHANDEHROO et al., 2010) foram fundamentais para pesquisadores, pois demonstraram que PPAR- $\alpha$  no fígado e PPAR- $\gamma$  no tecido adiposo de ruminantes estão ativos e, provavelmente, desempenham funções semelhantes, como em monogástricos: regulação da  $\beta$ -oxidação para PPAR- $\alpha$  e regulação da adipogênese e sensibilidade à insulina para PPAR- $\gamma$ .

Caracterização e funções biológicas do PPAR são bem conhecidas em monogástricos, mas não muito em ruminantes (BIONAZ; HERING; LOOR, 2012). Como em monogástricos, PPAR em ruminantes, são ativados por ácidos graxos de cadeia longa, por conseguinte, entre os fatores que afetam a expressão do gene PPAR, o mais interessante do ponto de vista nutrigenômico são os ácidos graxos de cadeia longa e o nível de energia da dieta, pois podem ser facilmente manipulados.

O PPAR- $\alpha$  induziu a expressão do gene SCD1 em ratos e em suínos por meio da resposta do peroxissoma presente na região promotora do gene (CHEON et al., 2005). No entanto, Sampath e Ntambi (2006) relataram, em estudos com ratos, que uma redução na atividade do gene SCD1 pode ser parcialmente dependente do fator de transcrição SREBP, mas muito provavelmente independente do PPAR- $\alpha$ . Em trabalho envolvendo bovinos de corte, Waters et al. (2009) não encontraram relação entre a expressão do PPAR-



$\alpha$  e ácidos graxos avaliados. Em adição, o estudo concluiu que não existe relação entre a expressão da SCD e PPAR- $\alpha$ .

Já Brown et al. (2003) demonstraram que o isômero do CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12 impede o preenchimento dos adipócitos, diminuindo a expressão do gene PPAR- $\gamma$  em preadipócitos de roedores. No entanto, a diferenciação dos preadipócitos de bovinos pode ser estimulada fortemente pela adição de agonistas da PPAR como insulina e dexametasona (SMITH et al., 2009).

Lee et al. (2011) concluíram que a PPAR- $\alpha$  apresentou maior atividade na gordura perirenal de bovinos da raça Wagyu e apresentou menor expressão que os genes SCD1 e SREBP-1c. Os animais holandeses apresentaram níveis de expressão semelhantes e altos na gordura perirenal das três isoformas, já nos animais mestiços o PPAR- $\alpha$  foi maior em ambos os depósitos de gordura. Ainda, de acordo com os autores, o padrão de mRNA dos PPARs nos tecidos adiposos foram semelhantes para todas as isoformas, independentemente da raça, sendo os níveis de expressão mais elevados apresentados no tecido perirenal em todas as raças.

## **2.2 Fatores de transcrição de proteínas ligantes aos esteroides (SREBPs)**

Na composição dos fosfolipídios, o balanço entre as proporções de AGI e de AGS são importantes para definir as propriedades e para manutenção da integridade das membranas celulares. Esta composição parece ser controlada pelo fator de transcrição SREBP no retículo sarcoplasmático e núcleo celular (XU et al., 2001).

Existem três membros da família de SREBPs: 1a, 1c e 2. A SREBP-1 parece estar mais relacionada com a regulação dos genes envolvidos na lipogênese, enquanto a SREBP-2 tem maior influência na regulação da

expressão dos genes colesterogênicos. De modo geral, as SREBPs são fatores de transcrição que desempenham um papel central na homeostase energética, promovendo a lipogênese e adipogênese (EBERLE et al., 2004). Portanto, as diferenças no nível de expressão do gene SREBP podem levar a diferenças na composição de ácidos graxos no tecido adiposo dos animais.

As sequências SREBP-1a e SREBP-2 são relativamente maiores que a sequência SREBP-1c, sendo essa um ativador mais fraco que os outros (PAI et al., 1998). As SREBPs contêm uma tirosina no lugar de uma arginina que é conservada em quase todos os outros membros da família de proteínas de dupla hélice de leucina. Esta substituição permite que as SREBPs reconheçam segmentos de DNA chamados de elementos regulatórios de esterol (SREs) (KIM et al., 1995). Assim, as SREBPs mostram uma forte preferência para a sequência de SRE que foi originalmente definida em genes que codificam o receptor da LDL (MAGAÑA et al., 2000). O SREBP-1c constitui 90% da SREBP-1 encontrados em ensaios *in vivo* e são determinantes sobre fatores de transcrição ligados a genes lipogênicos (BIONAZ; HERING; LOOR, 2012; CLARKE, 2001).

Os mecanismos de ação das SREBPs, na ativação ou supressão de rotas metabólicas de colesterogênese e lipogênese são descritos na Figura 1. Os AGPI estão envolvidos em uma redução da concentração da SREBP-1c. De acordo com Botolin et al. (2006), estes ácidos graxos em ratos inibem a transcrição de genes envolvidos na lipogênese no fígado, por rapidamente reduzir os fatores transcripcionais ligados a SREBP, conseqüentemente, reduzem a ativação do gene que codifica a enzima acetil CoA carboxilase (ACC). O CLA parece ter um efeito mais pronunciado em relação a outros AGPIs na redução da concentração de mRNA da SREBP-1 (WATERS et al., 2009).

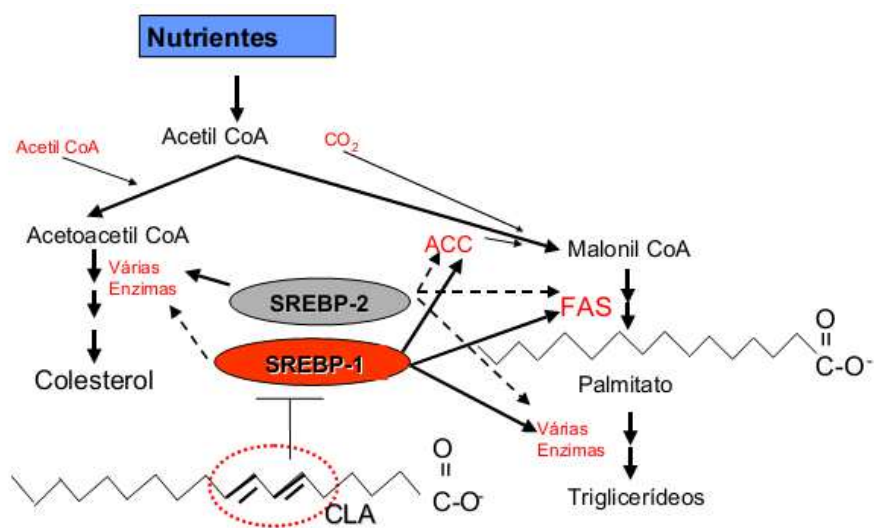


Figura 1 Mecanismo proposto para efeito dos ácidos graxos, por meio das SREBPs na regulação de enzimas chave da lipogênese (setas cheias indicam maior efeito, enquanto setas pontilhadas indicam menor efeito)

Fonte: Tsuboyama-Kasaoka et al. (2000)

Estudos têm relatado que a expressão da  $\Delta 9$  dessaturase, também, conhecida com SCD1 é regulada por fatores associados à SREBP-1c (RENAVILLE et al., 2006; SAMPATH; NTAMBI, 2006). A região promotora da SCD1 foi isolada e caracterizada em bovinos (KEATING et al., 2005) e, aparentemente, contém uma região de resposta à AGPI, incluindo uma ligação local para o fator de transcrição SREBP-1c. De fato, estudos com ratos (TABOR et al., 1999) e células intestinais humanas (RENAVILLE et al., 2006) sugerem que AGPI são regulados pela atividade genética da SCD1, interferido pela maior ou menor resposta do fator de transcrição SREBP, uma vez que este é capaz de se ligar a promotores de várias outras enzimas lipogênicas e induzir a sua expressão (ANGELA; STOECKMAN; HOWARD, 2002). Assim como para

outras enzimas lipogênicas, há poucas informações publicadas sobre o efeito dos AGPI sobre a expressão gênica da SREBP-1c.

Dentre os poucos trabalhos, Waters et al. (2009) descreveram a importância do equilíbrio entre  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na dieta como importante regulador da SCD1 por meio da SREBP-1c no músculo de bovinos de corte. No entanto, esta explicação poderia ser aplicada apenas a ácidos graxos linoleico (C18:2  $\omega$ -6) e linolênico (C18:2  $\omega$ -3), mas não para os ácidos graxos de cadeia mais longa. De forma semelhante, Renaville et al. (2006) encontraram redução nos níveis de mRNA da SREBP-1c associados com diminuição da expressão da SCD1 em culturas de células intestinais humanas. Mudança no perfil de ácidos graxos de cadeia mais longa pode estar relacionada aos efeitos da dieta sobre a expressão de dessaturases e não da SREBP, no entanto, essa possibilidade ainda não está bem clara na literatura.

### **2.3 Lipoproteína lipase (LPL) e proteína de ligação ao ácido graxo (FABP<sub>4</sub>)**

Os ácidos graxos é uma pequena quantidade de triacilgliceróis que escapam do rúmen e chegam ao intestino, sofrem ação de lipases e proteínas carreadoras específicas até a sua deposição no tecido.

As ações metabólicas principais do tecido adiposo são divididas em armazenamento ou síntese (lipogênese) e mobilização (lipólise). Ambas são reguladas pela integração dos mecanismos endócrino e neural, que cooperam para manter a massa adiposa relativamente constante frente às condições habituais (WILLIAMS; FRÜHBECK, 2009).

Na lipogênese em ruminantes, os triacilgliceróis armazenados nos adipócitos são derivados da captação na corrente sanguínea de ácidos graxos livres (AGL) ou ácidos graxos voláteis (AGV) oriundos do processo de fermentação do rúmen, principalmente acetato e lactato (GILBERT et al., 2003).

Os AGL podem estar ligados e serem transportados pela albumina ou podem ser liberados pela hidrólise de triacilgliceróis presente nas superfícies endoteliais dos capilares. Isto dá ao tecido adiposo um papel especial na remoção e armazenamento dos triacilgliceróis em circulação. A lipoproteína lipase (LPL) é sintetizada nos adipócitos e depois exportada para os capilares onde se liga à parede luminal das células endoteliais por uma interação com a superfície celular (WILLIAMS; FRÜHBECK, 2009). As lipoproteínas são muito grandes para penetrar o endotélio, logo, a LPL atua liberando AGL, que cruza o endotélio chegando ao adipócito.

A LPL, basicamente, hidrolisa triglicerídeos em monoacilglicerol e é de particular interesse em tecidos de animais para produção de carne, porque controla a divisão dos ácidos graxos entre o tecido adiposo e muscular (HOCQUETTE; GRAULET; OLIVECRONA, 1998). De acordo com Waylan et al. (2004), os promotores responsáveis pela transcrição da LPL estão, positivamente, correlacionados com a atividade da enzima no tecido de ruminantes. Portanto, a atividade da LPL pode afetar a qualidade das carcaças de bovinos, regulando os substratos disponíveis para qualquer músculo ou desenvolvimento do marmoreio.

Ainda, segundo estes autores, apesar dos mRNA da LPL estarem presentes no tecido adiposo e no músculo esquelético, seus níveis são maiores no tecido adiposo. É descrito em trabalhos um aumento de até 15 vezes de mRNA no tecido adiposo comparado ao músculo esquelético (GOLDBERG; MERKEL, 2001).

Por fim, a entrada dos AGL no adipócito exige processos específicos ou transportadores, que facilitam a entrada destas moléculas, como a proteína de ligação ao ácido graxo (FABP) (JURIE et al., 2007).

As FABPs já foram isoladas do citosol de diferentes tecidos de vertebrados e invertebrados como proteínas de 13 a 15 kDa de peso molecular.

Nove FABPs foram nomeadas, de acordo com o tecido a partir do qual elas foram isoladas (DAMCOTT et al., 2004). Essas apresentam distribuição celular e tecidual característica e são consideradas os transportadores de nutrientes de maior importância no controle da repartição de energia, sendo expressa em todos os tecidos e órgãos envolvidos no metabolismo da gordura (VEERKAMP; MOERKERK; ZIMMERMAN, 2000). As FABPs se ligam a compostos hidrofóbicos como os ácidos graxos, mas possuem diferentes estruturas, distribuição tecidual e especificidade de ligação.

O papel da FABP-A ou FABP<sub>4</sub> (uma das nove formas da FABP) no transporte de ácidos graxos foi identificado no tecido adiposo de animais domésticos, atuando no efluxo e influxo de ácidos graxos no adipócito, em resposta às condições anabólicas e catabólicas, respectivamente (HERTZEL et al., 2006; SHEN et al., 1999; VURAL et al., 2008). A FABP<sub>4</sub> também está associada ao metabolismo energético do músculo ao direcionar os ácidos graxos de cadeia longa para a oxidação ou esterificação nas mitocôndrias e nos peroxissomos, contribuindo, desta forma, para o armazenamento de gordura entre as fibras musculares (BRANDSTETTER et al., 2002; GERBENS, 2004). Como também são transportadoras intracelulares que transportam os ácidos graxos para os sítios de depósito de gordura ou para os sítios de produção de energia, essas proteínas estão, conseqüentemente, relacionadas à deposição de gordura de marmoreio em determinados músculos de suínos e bovinos (GERBENS, 2004).

A gordura de marmoreio é resultado do equilíbrio entre síntese e degradação de triacilgliceróis, conseqüentemente, muitas vias metabólicas dos adipócitos podem contribuir para a variação do teor do marmoreio, incluindo a capacidade do músculo de utilizar triacilgliceróis circulantes e o transporte intracelular de ácidos graxos pela FABP<sub>4</sub> (HOCQUETTE; GRAULET; OLIVECRONA, 1998).

A expressão do gene FABP<sub>4</sub> é extremamente baixa em pré-adipócitos, mas é altamente induzido em adipócitos durante a diferenciação em ratos e suínos (CHMURZYNSKA, 2006; DEIULIIS et al., 2008; LI; SHIN; LEE, 2009). Além disso, o gene FABP<sub>4</sub> é expresso na maioria das espécies de mamíferos, destacando-se camundungos, humanos, suínos e bovinos (LI; ZERBY; LEE, 2007; STEJSKAL; KARPISEK, 2006), sendo específico do tecido adiposo. Por estas razões, este gene tem sido amplamente utilizado como marcador no tecido adiposo e de adipócitos em estudos sobre a obesidade e desenvolvimento dos adipócitos em humanos, camundungos e animais destinados à produção (CHAVEY et al., 2006; LI; SHIN; LEE, 2009).

Em estudo avaliando a expressão gênica de pré-adipócitos derivados de bovinos Wagyu e Holandês, Ohsaki et al. (2007) observaram aumento significativo do nível de mRNA da FABP<sub>4</sub> durante a diferenciação (pré-adipócitos colhidos 1, 2, 4, 6, 8 e 12 dias após a indução de diferenciação) em ambas as raças bovinas, sendo a expressão gênica maior em pré-adipócitos de animais da raça Wagyu em todas as fases do processos de diferenciação. Este resultado sugere que os pré-adipócitos desses animais podem ter um maior potencial para acúmulo de lipídeos.

Shin et al. (2009), analisando FABP<sub>4</sub> em tecido adiposo, músculo, coração, baço, fígado, pulmão e rim, verificaram que a sua expressão era predominante no tecido adiposo de camundungos, bovinos e suínos. Estes resultados levaram os autores a realizar uma análise comparativa dos promotores da FABP<sub>4</sub> para identificar os elementos reguladores da sua expressão nestas espécies. No entanto, a conclusão foi evasiva, pois a região promotora conservada possuía elementos de diferenciação associados à hormônios e ao próprio tecido adiposo.

#### **2.4 Ação da acetil CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS)**

A síntese de gordura em ruminantes pode ocorrer por duas vias bioquímicas diferentes, a partir da síntese de triacilgliceróis realizada pela re-esterificação do glicerol e de mono ou diglicerídios com ácidos graxos provenientes da dieta ou via a síntese de novo de ácidos graxos (ROLLIN et al., 2003).

As enzimas lipogênicas ACC e ácido graxo sintase (FAS) estão associadas à síntese de novo de lipídios que, em suínos e ruminantes, ocorre no próprio tecido adiposo, em aves e na espécie humana ocorre no fígado e, em roedores ocorre em ambos os locais (SMITH; WITKOWSKI; JOSHI, 2003). Portanto, estas enzimas são consideradas regulatórias, pois mudanças nas suas atividades refletem em alterações nas taxas de síntese dos ácidos graxos.

A ACC catalisa a carboxilação da acetil-CoA em malonil-CoA, este por sua vez, é o sinal metabólico chave para o controle da síntese e oxidação de ácidos graxos em respostas a mudanças na dieta (BROWNSEY et al., 2006). Na verdade, é um substrato para a síntese de ácidos graxos de cadeia longa. Assim, a ACC tem função importante na regulação da homeostase energética em animais e desempenha um papel importante na deposição de lipídeos em diferentes compartimentos do corpo, por meio do seu produto (ROLLIN et al., 2003).

Nos mamíferos, a ACC é altamente regulada pela dieta, hormônios e outros fatores fisiológicos (KIM, 1997). A ingestão de alimentos, especialmente os constituídos por baixo teor de lipídeos, induz a síntese de ACC e, conseqüentemente, aumento na sua atividade (ABU-ELHEIGA et al., 2001). Em peixes, a ACC tem sido estudada principalmente por seu papel na biossíntese de ácidos graxos no tecido adiposo, sendo realizados estudos no fígado e em culturas primárias de hepatócitos (ALVAREZ et al., 2000).



Em animais de produção e na espécie humana, existem duas isoformas da ACC, a ACC1 e ACC2, que são codificadas por genes distintos e apresentam diferentes distribuições quanto ao tecido alvo. A ACC1 é mais comum, sendo altamente expressa nos tecidos associados à lipogênese (o fígado e tecido adiposo), enquanto ACC2 é predominantemente expressa em tecidos que utilizam ácidos graxos como fonte de energia (músculo esquelético e cardíaco) e, em menor grau, no fígado (ABU-ELHEIGA et al., 1997).

Após a ação da ACC, a FAS começa a desempenhar a sua função, ao ativar a síntese de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir do acetil-CoA, malonil-CoA e NADPH. A biossíntese dos ácidos graxos requer uma série coordenada de reações enzimáticas, que são desempenhadas pela FAS, um dos principais complexos enzimáticos multifuncionais. Em mamíferos, estas múltiplas funções foram consolidadas em uma única proteína que é o produto de um único gene (KIM, 1997).

A FAS é um homodímero de duas subunidades que contêm sete diferentes sítios catalíticos que são;  $\beta$  cetoacil sintase, malonil/acetil transferase,  $\beta$  hidroxiaçil desidrase, enoil redutase,  $\beta$  cetoacil redutase, proteína carreadora de acil e tioesterase (SEMENKOVICH, 1997). O domínio da tioesterase no complexo da FAS é responsável pela terminação da síntese de ácido graxo e liberação do ácido graxo sintetizado.

O principal produto dessas reações é o palmitato (C16:0). No entanto, esteárico (C18:0), mirístico (C14:0) e, ainda, ácidos graxos menores podem ser produzidos. Até os dias de hoje, não se sabe como os ácidos graxos sintetizados pela FAS ou obtidos de outras fontes são particionados dentro da célula (WARD et al., 2010). A questão é saber se os produtos da FAS constituem um conjunto discreto, que pode se distinguir exogenamente dos demais derivados de ácidos graxos. Se assim for, este conjunto poderia ter um quadro regulamentar específico de função, capaz de sinalizar o estado de energia da célula.

Alguns ácidos graxos atuam como inibidores alostéricos da atividade da ACC (curto prazo) e da FAS (longo prazo), em ratos em crescimento, recebendo dietas ricas em AGPI (ETHERTON, 2000). A supressão da abundância de mRNA da FAS em tecido hepático causada pela ingestão de AGPI, pode ser resultado de uma inibição da transcrição gênica associada à aceleração nas taxas de degradação de mRNA (BHUIYAN et al., 2009). Segundo estes autores, a supressão da transcrição dos genes que codificam enzimas da síntese de novo é consistente com a menor necessidade de síntese de gordura em animais que já apresentam altas taxas de deposição de lipídeos a partir de ácidos graxos pré-formados.

No entanto, a atividade dessas enzimas pode estar associada a outros fatores, como observado por Ward et al. (2010), ao demonstrarem que a composição da gordura de marmoreio em bovinos está, positivamente, relacionada com a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de AGS. Estes resultados sugerem que a taxa de biossíntese de AGS pode ser um fator importante na determinação do perfil lipídico da gordura de marmoreio em ruminantes.

Um possível envolvimento da atividade da ACC na formação do marmoreio em bovinos, também, foi verificado por Underwood et al. (2007), que relataram que bovinos com maior quantidade de gordura de marmoreio tiveram menor taxa de inativação do gene ACC. Em contraste, os animais com baixo marmoreio tiveram maior taxa de inativação da ACC, o que resultou em menor atividade da enzima.

De acordo com Gilbert et al. (2003), o tecido adiposo intramuscular usa alta proporção de glicose para a síntese de ácidos graxos, diferente do tecido adiposo subcutâneo que utiliza acetato para a deposição de lipídios. Como a glicose é um dos principais precursores da acetil-CoA, principal substrato da

ACC, aumento do marmoreio correlaciona-se, positivamente, com a atividade desta enzima.

Segundo Chung et al. (2007), com o declínio na produção de acetato, a glicose assume papel muito importante como fonte doadora de carbono para a síntese de novos ácidos graxos. Esse efeito é mais sensível no tecido intramuscular, pois no tecido subcutâneo a taxa de incorporação de acetato e glicose na síntese de ácido graxo é bem semelhante. Porém, no tecido intramuscular, a taxa de incorporação de glicose nos ácidos graxos chega a ser duas vezes mais alta que a taxa de incorporação de acetato.

Em relação a FAS, resultados de Ward et al. (2010) estão em acordo com os dados de Bonnet et al. (2007), que avaliaram a atividade da FAS em vários músculos de Limousin, Angus e seus mestiços e observaram maior atividades da FAS em músculos com maior nível de marmoreio (*rectus femoris*) quando comparado com o *semitendinosus*. Além disso, Zhang et al. (2008) relataram encontrar polimorfismos no DNA do gene FAS em bovinos, dessa forma, sugeriu a importância desse gene para a regulação de ácidos graxos na composição da carne bovina.

## 2.5 Estearoil CoA Dessaturase (SCD)

A partir do momento que o ácido graxo livre se encontra dentro do adipócito, vários outros processos metabólicos começam a desencadear uma série de reações. Com grande destaque está a enzima SCD, responsável pela conversão de AGS em ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), que são associados à maciez e sabor da carne (MATSUISHI; FUJIMORI; OKITANI, 2001).

Mais de uma isoforma dessa enzima existe em mamíferos (MIYAZAKI et al., 2003; MIYAZAKI; NTAMBI, 2003; THIEDE; OZOLS;

STRITTMATTER, 1986). Também tem sido demonstrado que essas isoformas são específicas, sendo a isoforma SCD1 predominante no fígado e tecido adiposo (KIM; MIYAZAKI; NTAMBI, 2002), enquanto SCD2, SCD3 e SCD4 foram encontrados no cérebro, pele e coração, respectivamente (MIYAZAKI et al., 2003; ZHENG et al., 2001), e SCD5, que foi encontrada em níveis elevados no cérebro de suínos (LENGI; CORL, 2008).

No entanto, apenas a isoforma SCD1 tem sido relatada como de extrema importância em animais de produção, por ser encontrada na glândula mamária e, principalmente, no tecido adiposo. Três proteínas principais a compõem: NADH-citocromo b5 redutase, b5 citocromo, e algumas dessaturases terminais (BESWICK; KENNELLY, 2000). Uma transferência de elétrons permite a introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 do ácido esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0), convertendo-os em ácido oleico (C18:1) e ácido palmitoleico (C16:1), respectivamente. De forma geral, a atividade da SCD1 pode ser regulada por ácidos graxos, embora as respostas variem conforme a espécie (CANOVAS et al., 2009).

No caso dos ruminantes, os ácidos graxos na alimentação são quimicamente reduzidos pelos microrganismos no rúmen e absorvidos como AGS. Diante disso, a composição de ácidos graxos armazenados em depósitos de gordura reflete a ação anterior da SCD1 sobre alguns substratos (KIM; NTAMBI, 1999). Embora a nutrição possa claramente contribuir para o perfil de ácidos graxos da gordura subcutânea e intramuscular, os fatores genéticos aos quais estão associados, ainda, estão sendo definidos. Dado o seu papel determinante na formação de certos ácidos graxos, a SCD1 é candidata à variação genética na deposição e composição do tecido adiposo (TANIGUCHI et al., 2004). Estudos recentes já revelaram que a expressão do gene SCD1 está relacionado com o percentual de AGPI (DUCKETT; PRATT; PAVAN, 2009) e alterações da expressão gênica já refletiram diferenças no teor de AGMI e na

relação AGMI:AGS do tecido adiposo subcutâneo (MATSUHASHI et al., 2011), ambos os trabalhos realizados com bovinos de corte.

A enzima SCD1, além de responsável pela conversão de AGS em AGMI, também está associada à conversão do ácido vaccênico (C18:1 *trans* 11) a CLA (C18:2 *cis* 9, *trans* 11) (SMITH et al., 2006). Estudos sobre o assunto em ruminantes centram, principalmente, sobre os efeitos no CLA referentes à atividade da enzima SCD1 e quantidade de mRNA, e os resultados variam. Baumgard et al. (2002) e Choi et al. (2000) mostraram que o CLA reduziu, assim como a atividade da enzima e os níveis de mRNA. No entanto, Park et al. (2000) observaram que a redução do CLA foi diretamente proporcional à baixa atividade da enzima, mas a expressão gênica não alterou. Além disso, nenhuma alteração foi encontrada por Wynn et al. (2006) nos níveis de mRNA de ovelhas alimentadas com gordura inerte.

A expressão de SCD1 pode ser fortemente modulada por vários nutrientes (AGPI e frutose), drogas (ácido estercúlico), hormônios (insulina e leptina) (NTAMBI et al., 2002) e colesterol (KIM; MIYAZAKI; NTAMBI, 2002). De acordo com Gillis, Duckett e Sackmann (2004), a suplementação lipídica pode diminuir a atividade da SCD1, reduzindo a conversão de ácido vaccênico a CLA. A suplementação dietética com AGPI inibe a expressão do gene que codifica a enzima necessária para remover a saturação do ácido vaccênico no tecido de bovinos de corte (WATERS et al., 2009). Além disso, segundo esses autores, o grau de inibição da transcrição está relacionado aos níveis dietéticos de AGPI na dieta.

Segundo Smith et al. (2009), o isômero do CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12, também, diminuiu a expressão gênica da SCD1 e, assim, reduz a síntese de AGMI. Ntambi et al. (2002) demonstraram que camundongos que não expressaram o gene SCD1 em seus fígados não demonstram o fenótipo de obesidade. Assim, a redução na expressão do gene SCD1 hepático, causado pelo

CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12 pode ser responsável por seu efeito "antiobesidade". No entanto, reduzir a atividade da SCD1 pode causar acúmulo de triacilgliceróis hepáticos (MIYAZAKI; KIM; NTAMBI, 2001), levando a acúmulo de gordura no fígado. Do ponto de vista de produção, qualquer aumento na formação e absorção de C18:2 *trans*-10, *cis*-12 vai diminuir a adipogênese e fará com que os lipídeos do tecido adiposo se tornem mais saturados (PALMQUIST et al., 2005).

Lee et al. (2011) reportaram uma maior expressão da SCD1 no tecido adiposo subcutâneo em relação ao tecido intramuscular. De forma semelhante, Archibeque et al. (2005) já demonstraram que o tecido adiposo subcutâneo tem, aproximadamente, o dobro da quantidade de mRNA da SCD1 em relação ao tecido adiposo intramuscular, o que pode parcialmente explicar níveis mais elevados de AGI no tecido subcutâneo em relação ao intramuscular.

O nível de expressão da SCD1 foi, significativamente, reduzido no tecido adiposo subcutâneo de bovinos suplementados com dietas com alto teor de AGPI  $\omega$ -3 e a baixa atividade da enzima, também, foi associada à diminuição de CLA e ácido oleico (C18:1 *cis* 9) (HERDMANN et al., 2010). Isto é consistente com os dados da literatura sobre os efeitos inibitórios de AGPI sobre a expressão da SCD1 em outras espécies (FLOWERS; NTAMBI, 2008). No entanto, diferentes respostas da SCD1 mediadas por manipulações dietéticas sugerem a existência de mecanismos específicos do tecido e, possivelmente, expressão tecido-específica dos fatores de transcrição relacionados à regulação deste gene em ruminantes.

Aliás, é preciso relatar que respostas específicas da SCD1 têm sido mais bem relatadas em suínos. Doran et al. (2006) estabeleceram que a redução de proteína na dieta aumenta a expressão da SCD1 na gordura intramuscular, não tendo efeito sobre a gordura subcutânea. As razões dessas alterações específicas sobre a expressão das enzimas nesses tecidos não são claras, no entanto, podem estar relacionadas, pelo menos em parte, às variações do nível dos fatores de

transcrição que regula a expressão deste gene. Verifica-se que a gordura intramuscular é um tecido com amadurecimento mais tardio quando comparado com gordura subcutânea (GARDAN; GONDRET; LOUVEAU, 2006), e há significativas diferenças morfológicas e metabólicas entre estes dois depósitos (GARDAN; GONDRET; LOUVEAU, 2006; GONDRET et al., 2008) que, consequentemente, definem o tipo de resposta do gene.

## **2.6 Glutationa peroxidase (GPX)**

Peroxidação lipídica é um dos principais mecanismos de deterioração da qualidade dos alimentos armazenados. As mudanças na qualidade podem ser manifestadas por deterioração no sabor, na textura, cor, valor nutritivo e produção de compostos tóxicos (MOHAMED et al., 2008; SCOLLAN et al., 2006).

Entre as enzimas antioxidantes, a GPX é um componente essencial do sistema celular. Várias formas de GPX são encontradas em vertebrados: a GPX celular e citosólica (GPX1), o GPX plasma extracelular (GPX2), a GPX citosólica gastrointestinal (GPX3), a GPX hidroperóxido de fosfolípido (GPX4) e a GPX específica do epidídimo (GPX5), no entanto, para os cinco genes da GPX identificados em mamíferos até o momento, a nomenclatura internacional mais adotada é a GPX1 (VERNET et al., 1999).

No início dos anos 70, o papel biológico específico para o Selênio se tornou evidente com a descoberta da primeira selenoproteína, a glutatona peroxidase (GPX1) (ROTRUCK et al., 1973). A eliminação de peróxidos de hidrogênio e lipídeos é catalisada por isoformas da GPX. Como consequência, sua forma reduzida é oxidada, que é, então, reduzida novamente com gasto de NADPH, formando, assim, um ciclo redox (ARTEEL; SIES, 2001). Além da eliminação enzimática de hidroperóxidos, hidroxila e lipídios peroxidados, a

forma oxidada, também, pode reagir não enzimaticamente com OH,  $N_2O_3$  e  $ONOO^-$  (WINK; MITCHELL, 1998). Portanto, a medição do teor de glutatona nos tecidos poderia ser um indicador do estado redox da carne.

Diversas pesquisas com suplementação de Selênio observaram aumento do conteúdo e atividade da GPX1, sugerindo que o consumo deste mineral pode constituir-se em estratégia importante para a inibição dos danos pelo excesso de radicais livres. Todavia, Yamasaki et al. (2006) demonstraram que a expressão do gene GPX1 é independente da presença de Selênio. Por outro lado, a produção de proteína aumentou em decorrência da administração de Selênio no processo de diferenciação dos adipócitos.

É fundamental ressaltar que estratégias que associam a atividade da GPX1 a outros antioxidantes importantes são escassos na literatura, principalmente, quando se avaliam animais terminados em sistemas de confinamento, onde a produção de radicais livres formados em nível celular associados à dieta são ainda maiores (DESCALZO et al., 2007).

Dentre os poucos trabalhos realizados, Insani et al. (2008) observaram que a atividade da enzima GPX1 foi maior em animais terminados em confinamento do que animais terminados a pasto. Esta observação, também, foi relatada por Gatellier, Mercier e Renerre (2004), no entanto, esses autores concluíram que a atividade da enzima na carne, durante o armazenamento diminuiu. A GPX1 é uma enzima seleno-dependente, que usa a glutatona como cofactor e a diminuição na sua atividade poderia estar associada ao esgotamento de seus co-fatores ou à oxidação de proteínas durante o armazenamento do produto.

Descalzo et al. (2007) observaram que a carne de animais alimentados a pasto ou alimentados a pasto e suplementados com vitamina E apresentaram maior conteúdo de GPX1, quando comparados a animais alimentados com dieta



à base de grãos. Valores significativamente mais elevados de glutatona, reduzida ou oxidada, também, foram observados nas amostras da pastagem.

A expressão do gene da GPX1 foi analisada em diversos tecidos de bovino por RT-qPCR (YAMASAKI et al., 2006). A expressão do gene GPX1 na gordura subcutânea e intramuscular foi muito baixa, apresentando resultados satisfatórios apenas na região intraperitoneal e renal. A expressão gênica da GPX1 foi fraca no intestino, fígado e baço, não sendo detectada nos músculos avaliados, cérebro ou fígado. Estes dados revelam que a GPX1 tem distribuição específica em alguns tecidos, porém, ainda desconhecidas.

Urs et al. (2004) relataram aumento da expressão gênica da GPX1 em adipócitos humanos, já Yamasaki et al. (2006) observaram que a expressão da GPX1 é aumentada de forma semelhante durante a diferenciação de adipócitos em bovinos. Esses autores, também, demonstraram que esse gene é expresso em vários depósitos de tecido adiposo. No entanto, a relação entre a produção de GPX1 de diferentes tecidos adiposos, associado ao seu papel de antioxidante, ainda, não é conhecido, principalmente, quando técnicas mais específicas são empregadas, como a RT-qPCR.

## **2.7 Biohidrogenação ruminal**

Os lipídeos dietéticos fornecidos aos ruminantes sofrem grandes modificações no ambiente ruminal, caracterizadas basicamente pela biohidrogenação e, em condições típicas, pouca quantidade de AGI escapa do ambiente ruminal.

No entanto, antes da biohidrogenação, as ligações éster existentes entre ácidos graxos e o glicerol são hidrolisadas de maneira rápida e extensiva pelas enzimas microbianas lipolíticas no rúmen, tendo como consequência a formação de ácidos graxos livres e glicerol (JENKINS, 2008). O glicerol oriundo desta

hidrólise pode, então, ser metabolizado pelos microorganismos ruminais para produzir ácidos graxos voláteis (NAGARAJA et al., 1997).

Os AGI livres liberados como consequência da hidrólise microbiana, podem exercer efeitos antimicrobianos no ambiente ruminal (PALMQUIST; JENKINS, 1980). Para reduzir os efeitos tóxicos destes, os microorganismos ruminais utilizam a biohidrogenação, sendo formado o ácido esteárico (C18:0) ao término das reações (Figura 2) (JENKINS, 2008).

No entanto, caso haja a biohidrogenação incompleta ocorre a produção de CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11). O CLA tem sido alvo de muitos estudos e efeitos benéficos do seu uso têm sido relatados. Entre estes, podemos destacar a prevenção de câncer, redução de aterosclerose, melhoria da resposta imune, além de modificações do metabolismo proteico e energético (BELURY, 2002; PALMQUIST et al., 2005; PARIZA, 2004).

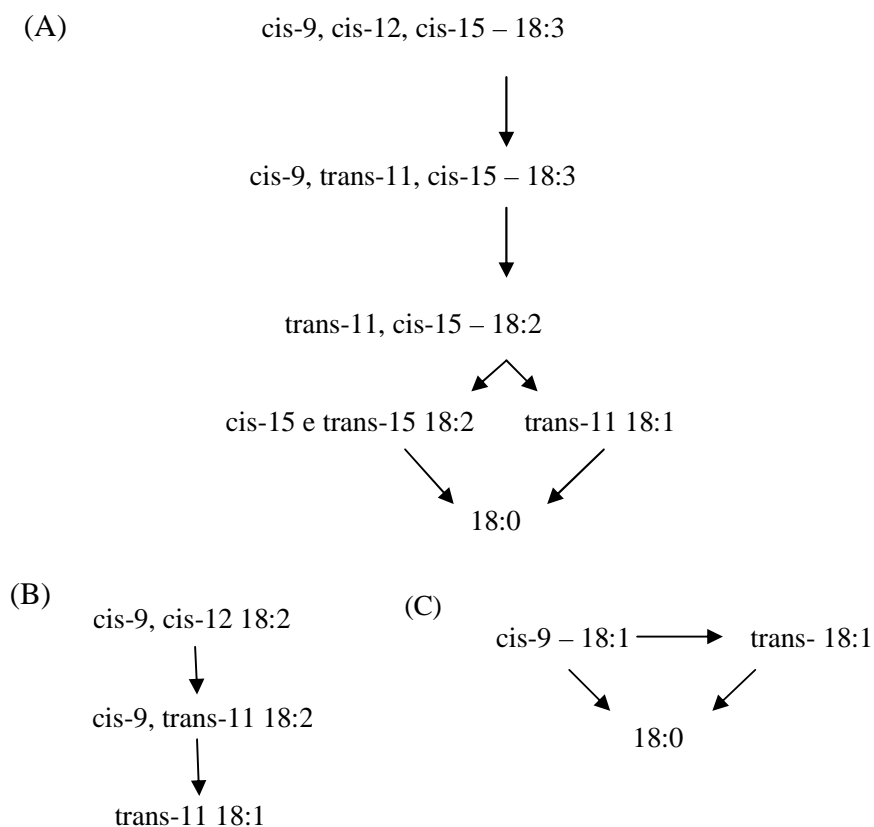


Figura 2 Vias de biohidrogenação dos ácidos  $\alpha$ -linolênico (A), linoleico (B) e oleico (C)

Fonte: Adaptado de Harfoot e Hazlewood (1988)

O C18:2 *cis*-9 *trans*-11 está presente em maiores concentrações nos produtos oriundos de ruminantes e em produtos oriundos de não-ruminantes sua concentração é irrisória. Este fenômeno ocorre em consequência do fato de que para a sua síntese, há necessidade de ação das bactérias ruminais sobre o ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12), onde o CLA é considerado o principal isômero (PARIZA, 2004), além disso, o ácido graxo C18:1 *trans* 11 (ácido vaccênico),

que também é um intermediário da biohidrogenação dos ácidos linoleico e linolênico, é substrato para a formação de CLA no tecido adiposo do animal, pela ação da SCD1 (GRIINARI et al., 2000). Desta forma, estratégias que possibilitem o aumento no fluxo de ácido vaccênico para o intestino delgado e sua posterior absorção colaboram de forma positiva para o aumento da concentração de CLA na carne bovina.

Dessa forma, a suplementação da dieta de bovinos com AGPI (óleos *in natura* ou sementes oleaginosas) pode aumentar a passagem destes para o intestino delgado, o que possibilita maior absorção e alteração do perfil de ácidos graxos da carne de animais ruminantes. Embora a nutrição possa, claramente, contribuir para o perfil de ácidos graxos da gordura subcutânea e intramuscular (HERDMANN et al., 2010; PAVAN; DUCKETT, 2007; OLIVEIRA et al., 2011), os fatores genéticos que determinam o perfil de ácidos graxos, ainda, estão sendo definidos (MANNEN, 2011).

E indubitável lembrar, também, que o ácido oleico (C18:1 *cis*-9) presente na carne de ruminantes, oriundo da biohidrogenação ruminal, bem como da dessaturação endógena do ácido esteárico (C18:0), não reduz as lipoproteínas de alta densidade (HDL), além de atuar contra o surgimento de doenças coronarianas (MOLKETIN, 2000). Além disso, a melhoria da relação  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 é altamente desejável (HOWE et al., 2006).

No entanto, os AGS produtos da biohidrogenação completa no rúmen, em geral, elevam as LDL. Considera-se, nesta situação, o efeito hipercolesterolêmico dos ácidos graxos láurico, mirístico e palmítico, por diminuírem a atividade dos receptores hepáticos da LDL (GIVENS, 2005), aumentando sua concentração no plasma, causando problemas à saúde humana.

## 2.8 Controle da expressão gênica no tecido muscular

Atualmente, o maior esforço da genética molecular é a identificação de sequências codificadoras ou unidades de transcrição do DNA que são associadas a uma característica expressa em um órgão ou tecido específico (EGGEN; HOCQUETTE, 2004). O verdadeiro desafio não é o conhecimento do genoma físico propriamente dito, mas a compreensão de quais genes são transcritos e traduzidos em produtos proteicos e como esses processos são regulados. Portanto, essas sequências codificadoras são responsáveis por uma função particular ou um fenótipo específico. Algumas dessas proteínas são expressas no tecido muscular ou no tecido adiposo, possuindo comprovado efeito nas características de interesse para o consumo humano (HOUEBINE, 2002).

A expressão dos genes é controlada pela ligação de determinados fatores de transcrição em sequências específicas do DNA. A expressão destes fatores e, conseqüentemente, a sua atuação, é dependente da situação fisiológica e do estágio de desenvolvimento do organismo. Assim, alguns genes são expressos apenas nos momentos apropriados.

A transcrição é, na maioria dos casos, guiada por uma sequência promotora situada na região de codificação, reconhecida pela RNA polimerase do tipo II (Figura 3) (PROUDFOOT; FURGER; DYE, 2002). Embora consigam sintetizar ácido ribonucleico (RNA) a partir de nucleotídeos livres, a RNA polimerase sempre precisa de proteínas acessórias, chamadas de fatores de transcrição, que auxiliem o início da transcrição. São estes fatores que identificam ao longo de um gene as sequências específicas no DNA e o local de início da transcrição, ou seja, a partir de qual base o gene deve ser traduzido em RNA. O primeiro par de bases do segmento do DNA que será transcrito recebe o valor +1. Sequências anteriores ao sítio de início são chamadas *upstream* e as bases progridem negativamente (-1, -2, -3...) a partir do +1 para trás, às

localizadas após o sítio de início são chamadas *downstream* e progridem, positivamente (+2,+3, +4...) (PROUDFOOT; FURGER; DYE, 2002).

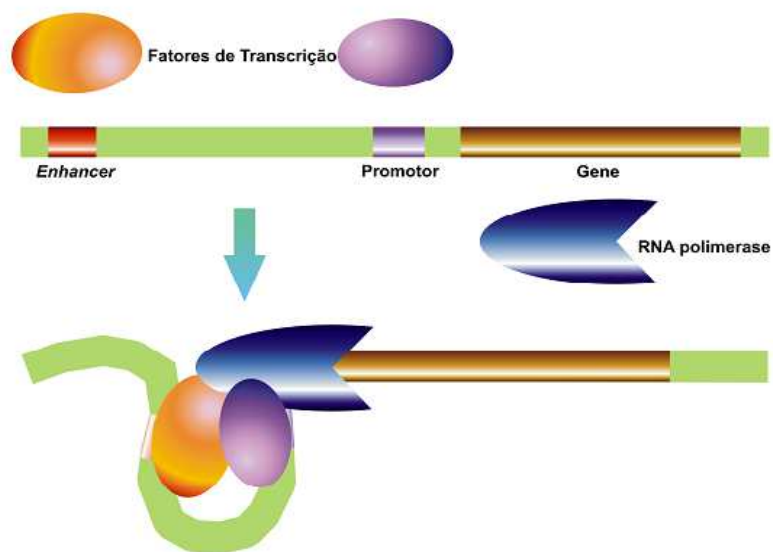


Figura 3 Esquema ilustrativo da atuação dos fatores de transcrição

As sequências reguladoras da transcrição podem ser divididas em duas: promotores e *enhancers* (KORNBERG, 2007). Essas nada mais são do que um padrão de bases encontrado em todos os genes, cuja função é designada de acordo com algumas proteínas e enzimas que os reconhecem e se ligam a ele.

As regiões reguladoras dos genes nos eucariotos podem estar localizadas próximas aos genes, nas suas extremidades 5' e 3' e no interior do gene, em regiões intrônicas ou, ainda, em regiões muito distantes do gene há milhares de pares de bases, longe do início da transcrição.

A molécula de RNA mensageiro (mRNA) recém sintetizada no núcleo precisa sofrer várias alterações bioquímicas. O objetivo é transformar-se no que

é chamado de mRNA maduro ou mRNA processado, para só, então, ser transportado ao citoplasma e ser traduzido. Esses precursores de mRNA são chamados de RNA nuclear heterogêneo (hnRNA - *heterogeneous nuclear RNA*) (PROUDFOOT; FURGER; DYE, 2002).

Em células eucarióticas os genes que codificam as proteínas estão organizados na forma de exons (sequências codificantes) e íntrons (sequências não codificantes) que se alternam ao longo dos mesmos. Ao transcrito primário, em sua extremidade 5', é adicionado uma metilguanosina - trifosfato (ou cap) e, em sua extremidade 3', uma cauda poli-A. Os transcritos primários são processados pelo mecanismo de *cis-splicing* que, simultaneamente, remove sequências de íntrons e liga as sequências de exons adjacentes (KORNBERG, 2007).

Portanto, dada uma molécula de mRNA, um problema central da biologia molecular é determinar se a mesma contém regiões codificadoras e, a partir daí, descobrir qual proteína será codificada (NAKAGAWA et al., 2008). O controle do início da tradução é um dos mais importantes processos na regulação da expressão genética.

A tradução, normalmente, inicia-se no primeiro ATG da molécula de mRNA (KOZAK, 1984), mas pode iniciar em um códon diferente (HATZIGEORGIOU, 2002). Segundo Kozak (1999), a escolha pelo códon inicial da sequência codante depende da posição e, também, do contexto da sequência. Sendo assim, a correta determinação da tradução é uma importante etapa na análise genômica para determinar a proteína resultante desse processo.

A transcrição e a tradução são os meios pelos quais as células interpretam e expressam suas informações genéticas. Somente parte das sequências transcritas carrega informações para codificar proteínas, ou seja, mesmo o mRNA podendo ser traduzido em sua totalidade, apenas um trecho desse é traduzido (KOZAK, 1999).

No entanto, existem outras duas classes abundantes de RNA presentes na célula: o RNA transportador (tRNA) e o RNA ribossomal (rRNA). Estes são frequentemente referidos como RNA estáveis, por possuírem uma meia-vida bem mais extensa do que a do mRNA. Porém, o rRNA constitui sozinho mais de 80% do RNA total da célula (JONES; QIU; RICKWOOD, 1994). Os mRNAs eucarióticos representam apenas uma pequena fração do RNA celular total (~5% da massa) e são bastante heterogêneos, com relação ao seu tamanho, refletindo a diversidade de produtos dos genes que codificam (LEWIN, 2001).

## **2.9 Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

A genética está dividida em duas áreas: a caracterização da natureza física do genoma total (genômica estrutural) e a caracterização dos modelos gerais da expressão gênica do mRNA e de proteínas (genômica funcional). Assim, entende-se por expressão gênica os processos pelos quais a informação contida na estrutura do DNA é transmitida para os RNAs e produtos proteicos (EGGEN; HOCQUETTE, 2004).

Com a descoberta da PCR (reação em cadeia da polimerase), numerosas aplicações vêm sendo descritas para avaliação da expressão de mRNA. A introdução dessa nova metodologia baseada na cinética de fluorescência possibilita a quantificação do produto da PCR quantitativo em tempo real, processo que combina em um só procedimento, amplificação e detecção (CIKOS; BUKOVSKÁ; KOPPEL, 2007).

Segundo Bustin (2010), a transcrição reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), é uma das técnicas mais utilizadas para análise da expressão gênica em laboratórios de biotecnologia. Esta técnica consiste na síntese de um DNA complementar (cDNA) a partir de um RNA-molde, por meio da enzima Transcriptase Reversa. O cDNA



sintetizado é, então, amplificado exponencialmente pela PCR e pode ser facilmente detectado.

A facilidade de uso da RT-qPCR tem revolucionado a ciência molecular. A sua eficácia na amplificação e quantificação de baixos níveis de ácidos nucleicos tem impulsionado o surgimento de inúmeras aplicações (BUSTIN, 2010). Além disso, esta nova técnica dispensa os procedimentos pós PCR, eliminando a necessidade do uso de géis de agarose, possibilitando a visualização direta dos produtos amplificados diminuindo o tempo de análises dos resultados. Além do mais, a amplificação e a análise do produto são realizadas no mesmo tubo da reação, o que melhora a padronização dos resultados pela quantificação dos genes e evita contaminação.

Apesar de ser uma técnica que vem sendo utilizada com crescente frequência em estudos de expressão gênica que envolve humanos (AERTS et al., 2001) e animais de importância zootécnica, como bovinos (TANIGUCHI et al., 2004; WANG et al., 2009; YANG et al., 2003), ovinos (DANIEL; SALTER; BUTTERY, 2004) e suínos (CARRODEGUAS et al., 2005; DUGAN et al., 2002; RAMSAY; RICHARDS, 2005), a PCR possui seus percalços. Para que os resultados obtidos tenham validade biológica, é muito importante atentar para alguns detalhes durante a sua execução. Diferente do DNA, que é uma molécula bastante resistente, o RNA é extremamente frágil tão logo é removido do seu ambiente celular. Portanto, sua obtenção é muito mais complicada do que a do DNA, sendo um molde adequado para ser incluído em uma PCR atender algumas premissas, como ser de alta qualidade para que os resultados quantitativos sejam relevantes e livres de DNA genômico.

A detecção do aumento do produto de PCR ao longo de cada ciclo é possível em virtude do DNA amplificado ser marcado com algum tipo de molécula fluorescente. A emissão crescente de sinal luminoso caracterizará as curvas de amplificação típicas da PCR quantitativo. Entre os sistemas utilizados

para a detecção da fluorescência destaca-se o sistema SYBR Green. Neste sistema o corante se liga ao DNA dupla fita emitindo fluorescência. Este método de detecção tem sido bastante utilizado em ensaios de RT-qPCR, pois apresenta a vantagem de apresentar um custo mais baixo em relação à construção de sondas marcadas. Um fator importante que deve ser levado em consideração na utilização deste sistema é que os iniciadores utilizados na reação devem ser desenhados cuidadosamente para evitar a amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros, uma vez que esse corante se liga a qualquer DNA dupla fita (GIULIETTI et al., 2001).

Na RT-qPCR as curvas de amplificação são mostradas graficamente em tempo real por software, para auxiliar na determinação do ciclo no qual a fluorescência alcança o “nível limiar” ou ciclo *Threshold* ( $C_T$ ). Durante a amplificação, quanto mais rápido o sinal fluorescente alcança o  $C_T$  na fase exponencial da reação, maior é a quantidade da sequência-alvo na amostra original, permitindo, deste modo, a quantificação. O valor do  $C_T$  é inversamente proporcional à quantidade de sequências específicas de ácidos nucleicos contidos na amostra inicial. Tanto a quantificação relativa quanto a absoluta da expressão gênica utilizam o valor do  $C_T$  para quantificar o cDNA e, consequentemente, para determinar a expressão gênica.

O aumento na emissão de fluorescência é uma consequência direta da amplificação da sequência de DNA/cDNA de interesse. De forma geral, o método de PCR quantitativo em tempo real tem se mostrado uma ferramenta de extrema importância na quantificação de RNAs mensageiros, tornando a quantificação mais rápida e acurada (HOCQUETTE et al., 2007).

Dessa forma, os fatores associados às mudanças na transcrição do mRNA e da sua estabilidade são essenciais para compreensão do metabolismo dos ácidos graxos depositados no tecido animal (KERSTEN et al., 1999) que,

em geral, regulam a expressão de diversas enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos (JUMP, 2002).

## REFERÊNCIAS

- ABU-ELHEIGA, L. et al. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. **Science**, New York, v. 291, n. 55132, p. 2613-2616, Mar. 2001.
- ABU-ELHEIGA, L. et al. Human acetyl-coA carboxylase 2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 18, p. 10669-10677, Apr. 1997.
- AERTS, J. et al. A real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect breast carcinoma cells in peripheral blood. **Annals of Oncology**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 39-46, Jan. 2001.
- ALVAREZ, M. J. et al. Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, n. 5, p. 619-628, Nov. 2000.
- ANGELA, K.; STOECKMAN, C.; HOWARD C. The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 30, p. 27029-27035, July 2002.
- ARCHIBEQUE, S. L. et al. Fatty acid indices of stearoyl-CoA desaturase do not reflect actual stearoyl-CoA desaturase enzyme activities in adipose tissues of beef steers finished with corn, flaxseed, or sorghum based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 5, p. 1153-1166, May 2005.
- ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology Pharmacology**, New York, v. 10, n. 4, p. 153-158, Sept. 2001.
- BAUMAN, D. E. et al. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE, 3., 2003, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 2003. p. 175-189.
- BAUMGARD, L. H. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2155-2163, Sept. 2002.

BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 505-531, 2002.

BESWICK, N. S.; KENNELLY, J. J. Influence of bovine growth hormone and growth hormone-releasing factor on messenger RNA abundance of lipoprotein lipase and stearoyl-CoA desaturase in the bovine mammary gland and adipose tissue. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 2, p. 412-419, Feb. 2000.

BHUIYAN, M. S. A. et al. DNA polymorphisms in SREBF1 and FASN genes affect fatty acid composition in Korean cattle (Hanwoo). **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 22, n. 6, p. 765-773, June 2009.

BIONAZ, M.; HERING, B. J.; LOOR, J. J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-alpha activation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 179-191, Jan. 2012.

BONNET, M. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and leptin are related to marbling differences among Limousin and Angus or Japanese Black × Angus steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 2882-2894, Nov. 2007.

BOTOLIN, D. et al. Docosahexanoic acid (22:6, n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 47, n. 1, p. 181-192, Jan. 2006.

BRANDSTETTER, A. M. et al. Effects of muscle type, castration, age and growth rate on H-FABP expression in bovine skeletal muscle. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 199-208, June 2002.

BROWN, J. M. et al. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR $\gamma$  signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, n. 7, p. 1287-1300, July 2003.

BROWNSEY, R. W. et al. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 34, n. 2, p. 223-227, Apr. 2006.

BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?: the case for MIQE. **Methods**, San Diego, v. 50, n. 4, p. 217-226, Apr. 2010.

CANOVAS, A. et al. Acetyl-CoA carboxylase and stearoyl-CoA desaturase protein expression in subcutaneous adipose tissue is reduced in pigs selected for decreased backfat thickness at constant intramuscular fat content. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 3905-3914, Dec. 2009.

CARRODEGUAS, J. A. et al. Incidence in diverse pig populations of an IGF2 mutation with potential influence on meat quality and quantity: an assay based on real time PCR (RT-PCR). **Meat Science**, Barking, v. 71, n. 3, p. 577-582, Nov. 2005.

CHAVEY, C. et al. Regulation of secreted protein acidic and rich in cysteine during adipose conversion and adipose tissue hyperplasia. **Obesity**, Silver Spring, v. 14, n. 11, p. 1890-1897, Nov. 2006.

CHEON, Y. et al. Induction of overlapping genes by fasting and a peroxisome proliferator in pigs: evidence of functional PPARalpha in nonproliferating species. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 288, n. 6, p. 1525-1535, June 2005.

CHMURZYŃSKA, A. The mutigene family of fatty acid-binding proteins (fabps): function, structure and polymorphism. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 47, n. 1, p. 39-48, Mar. 2006.

CHOI, Y. et al. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid down-regulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 8, p. 1920-1924, Aug. 2000.

CHUNG, K. Y. et al. Lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase gene expression and enzyme activity in adipose tissue of short- and long-fed Angus and Wagyu steers fed corn- or hay-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 380-387, Feb. 2007.

CIKOS, S.; BUKOVSKÁ, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC Molecular Biology**, London, v. 20, n. 8, p. 8-13, Dec. 2007.

CLARKE, S. D. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis: I., molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 281, n. 4, p. G865-G869, Oct. 2001.

DAMCOTT, C. M. et al. Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. **Metabolism: Clinical and Experimental**, New York, v. 53, n. 3, p. 303-309, Mar. 2004.

DANIEL, Z. C. T. R.; SALTER, A. M.; BUTTERY, P. J. Vitamin A regulation of stearoyl-CoA desaturase mRNA levels and fatty acid composition in sheep tissues. **Animal Science**, Edinburgh, v. 78, n. 2, p. 237-243, Apr. 2004.

DEIULIIS, J. A. et al. Developmental, hormonal, and nutritional regulation of porcine adipose triglyceride lipase (ATGL). **Lipids**, Champaign, v. 43, n. 3, p. 215-225, Mar. 2008.

DESCALZO, A. M. et al. Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle. **Meat Science**, Barking, v. 75, n. 2, p. 299-307, Feb. 2007.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator activated receptors: nuclear control of metabolism. **The Endocrine Society**, Chevy Chase, v. 20, n. 5, p. 649-688, Oct. 1999.

DORAN, O. et al. A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 95, n. 3, p. 609-617, Mar. 2006.

DUCKETT, S. K.; PRATT, S. L.; PAVAN, E. Corn oil or corn grain supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue: II., effects on subcutaneous fatty acid content and lipogenic gene expression. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 3, p. 1120-128, Mar. 2009.

DUGAN, M. E. R. et al. The effects of feeding conjugated linoleic acid on pig liver vitamin A and retinol binding protein mRNA. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 461-463, May 2002.

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

EGGEN, A.; HOCQUETTE, J. F. Genomic approaches to economic trait loci and tissue expression profiling: application to muscle biochemistry and beef quality. **Meat Science**, Barking, v. 66, n. 1, p. 1-9, Jan. 2004.

ELLINGHAUS, P. et al. Phytanic acid activates the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in sterol carrier protein2-/sterol carrier protein x-deficient mice. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 5, p. 2766-2772, Jan. 1999.

ETHERTON, T. D. The Biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 11, p. 2623-2625, Nov. 2000.

FELLNER, V.; SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. G. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 921-928, May 1997.

FLOWERS, M. T.; NTAMBI, J. M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 19, n. 3, p. 248-256, June 2008.

GARDAN, D.; GONDRET, F.; LOUVEAU, I. Lipid metabolism and secretory function of porcine intramuscular adipocytes compared with subcutaneous and perirenal adipocytes. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 291, n. 2, p. E372-E380, Aug. 2006.

GATELLIER, P.; MERCIER, Y.; RENERRE, M. Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidant status of Charolais bovine meat. **Meat Science**, Barking, v. 67, n. 3, p. 385-394, July 2004.

GERBENS, F. Genetic control of intramuscular fat accretion. In: PAS, M. F. W.; EVERTS, M. E.; HAAGSMAN, H. P. (Ed.). **Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality**. Wallingford: CABI, 2004. p. 343-361.

GILBERT, C. D. et al. Carcass, sensory, and adipose tissue traits of brangus steers fed casein-formaldehyde-protected starch and/or canola lipid. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2457-2468, Oct. 2003.

GILLIS, M. H.; DUCKETT, S. K.; SACKMANN, J. R. Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or soybean oil on fatty acid composition of adipose tissues in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1419-1427, Mar. 2004.



- GIULIETTI, A. P. et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 386-401, Dec. 2001.
- GIVENS, D. I. The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 395-402, Aug. 2005.
- GOLDBERG, I. J.; MERKEL, M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 6, n. 1, p. 388-405, Mar. 2001.
- GONDRET, F. et al. Regional differences in porcine adipocytes isolated from skeletal muscle and adipose tissues as identified by a proteomic approach. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 9, p. 2115-2125, Feb. 2008.
- GRIINARI, J. M. et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta 9 desaturase. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, Sept. 2000.
- HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, S. G. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. New York: Elsevier Science, 1988. p. 285-322.
- HATZIGEORGIOU, A. G. Translation initiation start prediction in human cDNAs with high accuracy. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 343-350, Feb. 2002.
- HERDMANN, A. et al. Effect of dietary fatty acids on expression of lipogenic enzymes and fatty acid profile in tissues of bulls. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 755-762, Mar. 2010.
- HERTZEL, A. V. et al. Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 290, n. 5, p. E814-E823, May 2006.
- HILLER, B.; HERDMANN, A.; NUERNBERG, K. Dietary n-3 fatty acids significantly suppress lipogenesis in bovine muscle and adipose tissue: a functional genomics approach. **Lipids**, Champaign, v. 46, n. 7, p. 557-567, July 2011.

HOCQUETTE, J. F. et al. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 159-173, Jan. 2007.

HOCQUETTE, J. F.; GRAULET, B.; OLIVECRONA, T. Lipoprotein lipase activity and mRNA levels in bovine tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 121, n. 2, p. 201-212, Oct. 1998.

HOUDEBINE, L. M. Transgenesis to improve animal production. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 255-268, Apr. 2002.

HOWE, P. et al. Dietary intake of long-chain  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids: contribution of mets sources. **Nutrition**, London, v. 22, n. 1, p. 47-53, June 2006.

INSANI, E. M. et al. Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 442-452, July 2008.

JENKINS, T. C. Board-invited review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 397-412, Feb. 2008.

JONES, P.; QIU, J.; RICKWOOD, D. **RNA isolation and analysis**. Oxford: BIOS Scientific, 1994. 196 p.

JUMP, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 13, n. 2, p. 155-164, Apr. 2002.

JURIE, C. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 10, p. 2660-2669, Oct. 2007.

KEATING, A. F. et al. Isolation and characterisation of the bovine stearoyl-CoA desaturase promoter and analysis of polymorphisms in the promoter region in dairy cows. **Mammalian Genome**, Redmond, v. 16, n. 10, p. 184-193, Oct. 2005.

KERSTEN, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 103, n. 11, p. 1489-1498, June 1999.

KIM, H. J.; MIYAZAKI, M.; NTAMBI, J. M. Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 43, n. 10, p. 1750-1757, Oct. 2002.

KIM, J. B. et al. Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 15, n. 5, p. 2582-2588, May 1995.

KIM, K. H. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 77-99, 1997.

KIM, Y. C.; NTAMBI, J. M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 266, n. 1, p. 1-4, Dec. 1999.

KLIEWER, S. A. et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, n. 9, p. 4318-4323, Apr. 1997.

KORNBERG, R. D. The molecular basis of eukaryotic transcription. **PNAS**, Washington, v. 14, n. 32, p. 1989-1997, Aug. 2007.

KOZAK, M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 857-872, Jan. 1984.

KOZAK, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**, Amsterdam, v. 234, n. 2, p. 187-208, July 1999.

LADEIRA, M. M.; OLIVEIRA, R. L. Desafios nutricionais para melhoria da qualidade da carne bovina. In: OLIVEIRA, R. L.; BARBOSA, M. A. A. F. (Ed.). **Bovinocultura de corte: desafios e tecnologias**. Salvador: EDUFBA, 2007. p. 183-210.

LEE, J. H. et al. Effect of feeding rumen-protected dietary protein-oil supplements on fatty acid composition and  $\alpha$ -tocopherol content of blood serum and muscle lipids of lambs. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 101-110, Oct. 2007.

LEE, J. H. et al. Relationship between adipose maturity and fatty acid composition in various adipose tissues of Japanese Black, Holstein and Crossbred (F1) steers. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 82, n. 5, p. 689-697, Oct. 2011.

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

LENGI, A. J.; CORL, B. A. Comparison of pig, sheep and chicken SCD5 homologs: evidence for an early gene duplication event. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 150, n. 4, p. 440-446, Aug. 2008.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 955 p.

LI, B.; SHIN, J.; LEE, K. Interferon-stimulated gene ISG12b1 inhibits adipogenic differentiation and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 cells. **Endocrinology**, Baltimore, v. 150, n. 3, p. 1217-1224, Mar. 2009.

LI, B.; ZERBY, H. N.; LEE, K. Heart fatty acid binding protein is upregulated during porcine adipocyte development. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 1651-1659, July 2007.

MAGAÑA, M. M. et al. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 7, p. 4726-4733, Feb. 2000.

MANNEN, H. Identification and utilization of genes associated with beef qualities. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 82, n. 1, p. 1-7, Feb. 2011.

MATSUHASHI, T. et al. Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 12-22, Jan. 2011.

MATSUISHI, M.; FUJIMORI, M.; OKITANI, A. Wagyu beef aroma in Wagyu (Japanese Black Cattle) beef preferred by the Japanese over imported beef. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 72, n. 6, p. 498-504, Nov. 2001.

MIYAZAKI, M. et al. Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 36, p. 33904-33911, Sept. 2003.

MIYAZAKI, M.; KIM, Y. C.; NTAMBI, J. M. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 42, n. 7, p. 1018-1024, July 2001.

MIYAZAKI, M.; NTAMBI, M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 68, n. 2, p. 113-121, Feb. 2003.

MOHAMED, A. et al. A review on lipid oxidation of meat in active and modified atmosphere packaging and usage of some stabilizers. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 6, n. 3, p. 76-81, Aug. 2008.

MOLKETIN, J. Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, n. 1, p. 47-53, Nov. 2000.

NAGARAJA, T. G. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HUBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Chapman and Hall, 1997. p. 523-632.

NAKAGAWA, S. et al. Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 861-871, Feb. 2008.

NTAMBI, J. M. et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 17, p. 11482-11486, Aug. 2002.

NUERNBERG, K. et al. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 1, p. 63-74, May 2005.

OHSAKI, H. et al. Stearoyl-CoA desaturase mRNA expression during bovine adipocyte differentiation in primary culture derived from Japanese Black and Holstein cattle. **Comparative and Biochemistry Physiology**, New York, v. 148, n. 3, p. 629-634, Nov. 2007.

OLIVEIRA, D. M. et al. Fatty acid profile and qualitative characteristics of meat from zebu steers fed with different oilseeds. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 2546-2555, Aug. 2011.

PAI, J. et al. Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 40, p. 26138-26148, Oct. 1998.

PALMQUIST, D. L. et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 50, n. 4, p. 179-217, May 2005.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 1, p. 1-14, Jan. 1980.

PARIZA, M. W. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 6, p. 1132-1136, June 2004.

PARK, Y. et al. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1486, n. 3, p. 285-292, Aug. 2000.

PAVAN, E.; DUCKETT, S. K. Corn oil supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue: II., effects on longissimus muscle and subcutaneous adipose fatty acid composition and stearyl-CoA desaturase activity and expression. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 1731-1740, July 2007.

PROUDFOOT, N.; FURGER, A.; DYE, M. Integrating mRNA processing with transcription. **Cell**, Cambridge, v. 108, n. 4, p. 501-512, Feb. 2002.

RAKSHANDEHROO, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. **PPAR Research**, New York, v. 2010, n. 8, p. 1-20, Aug. 2010.

RAMSAY, T. G.; RICHARDS, M. P. Leptin and leptin receptor expression in skeletal muscle and adipose tissue in response to in vivo porcine somatotropin treatment. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2501-2508, Nov. 2005.

RENAVILLE, B. A. et al. Eicosapentaenoic acid and 3,10 dithia stearic acid inhibit the desaturation of trans-vaccenic acid into *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid through different pathways in Caco-2 and T84 cells. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 95, n. 4, p. 688-695, Apr. 2006.

ROLLIN, X. et al. Short- and long-term nutritional modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 89, n. 6, p. 803-810, June 2003.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, New York, v. 179, p. 588-590, 1973.

SALTER, A. M.; TARLING, E. J. Regulation of gene transcription by fatty acids. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 1314-1320, July 2007.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1, sterol regulatory element binding protein-1c and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ : independent and interactive roles in the regulation of lipid metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care**, Philadelphia, v. 9, n. 2, p. 84-88, Mar. 2006.

SCOLLAN, N. et al. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality: review. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 1, p. 17-33, Sept. 2006.

SEMENKOVICH, C. F. Regulation of fatty acid synthase (FAS). **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 43-53, Mar. 1997.

SHALEV, A. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  is a phosphoprotein: regulation by insulin. **Endocrinology**, Baltimore, v. 137, n. 10, p. 4499-4502, Oct. 1996.

SHEN, W. J. et al. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, n. 10, p. 5528-5532, June 1999.

SHIN, J. et al. Comparative analysis of fatty acid-binding protein 4 promoters: conservation of peroxisome proliferator-activated receptor binding sites. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 3923-3934, Dec. 2009.

SHINGFIELD, K. J.; BONNET, M.; SCOLLAN, N. D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 132-162, 2013. Supplement.

SMITH, S. B. et al. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 77, n. 5, p. 478-486, Oct. 2006.

SMITH, S. B. et al. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 14, p. E72-E82, Apr. 2009.

SMITH, S. B.; WITKOWSKI, A.; JOSHI, A. K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 289-317, July 2003.

STEJSKAL, D.; KARPISEK, M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? **Europen Journal Clinical Investigation**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 621-625, Sept. 2006.

TABOR, D. E. et al. Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 29, p. 20603-20610, July 1999.

TANIGUCHI, M. et al. Differences in stearoyl-CoA desaturase mRNA levels between Japanese Black and Holstein cattle. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 215-220, May 2004.

THIEDE, M. A.; OZOLS, J.; STRITTMATTER, P. Construction and sequence of cDNA for rat liver stearoyl coenzyme A desaturase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, n. 28, p. 13230-13235, Oct. 1986.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N. et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, New York, v. 49, n. 9, p. 1534-1542, Sept. 2000.

UNDERWOOD, K. R. et al. Relationship between kinase phosphorylation, muscle fiber typing, and glycogen accumulation in Longissimus muscle of beef cattle with high and low intramuscular fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 23, p. 9698-9703, Nov. 2007.



URS, S. et al. Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 4, p. 762-770, Apr. 2004.

VEERKAMP, J. H.; MOERKERK, T. B. van; ZIMMERMAN, A. W. Effect of fatty acid-binding proteins on intermediate fatty acid transport: studies on different types and mutant proteins. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 267, n. 19, p. 5959-5966, Nov. 2000.

VERNET, P. et al. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 54, n. 4, p. 362-370, Dec. 1999.

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

WANG, Y. H. et al. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 119-130, Jan. 2009.

WARD, R. E. et al. Relationship between the expression of key lipogenic enzymes, fatty acid composition, and intramuscular fat content of Limousin and Aberdeen Angus cattle. **Livestock Science**, New York, v. 127, n. 1, p. 22-29, Jan. 2010.

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

WAYLAN, A. T. et al. Effect of flax supplementation and growth promotants on lipoprotein lipase and glycogenin messenger RNA concentrations in finishing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1868-1875, June 2004.

WILLIAMS, G.; FRÜHBECK, G. **Obesity science to practice**. New York: J. Wiley, 2009. 584 p.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free**

**Radicals in Biology and Medicine**, New York, v. 25, n. 4, p. 434-456, Sept. 1998.

WYNN, R. J. et al. Effect of feeding rumen-protected conjugated linoleic acid on carcass characteristics and fatty acid composition of sheep tissues. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 12, p. 3440-3450, Dec. 2006.

XU, J. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 13, p. 139-145, Mar. 2001.

YAMASAKI, T. et al. Mechanism of plasma glutathione peroxidase production in bovine adipocytes. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 326, n. 1, p. 139-147, Oct. 2006.

YANG, S. H. et al. Fat depot-specific differences in leptin mRNA expression and its relation to adipocyte size in steers. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 74, n. 1, p. 17-21, Jan. 2003.

ZHANG, S. et al. DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 62-70, Feb. 2008.

ZHENG, Y. et al. Scd3-A novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. **Genomics**, San Diego, v. 71, n. 2, p. 182-191, Jan. 2001.

**CAPÍTULO 2 Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos de corte alimentados com grão de soja e gordura protegida, suplementados ou não com ionóforo**

## RESUMO

Objetivou-se neste estudo analisar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* (LD) de bovinos alimentados com dietas, contendo grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M). Foram utilizados 28 tourinhos Red Norte, com idade média de 20 meses e peso vivo inicial médio de 359 kg, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 x 2. As dietas apresentaram 6,6% de extrato etéreo e a silagem de milho utilizada como volumoso. Metade dos animais alimentados com GS ou GP foram suplementados com 230 mg/cabeça/dia de monensina. Os animais foram abatidos com peso médio de 497 kg ( $P>0,05$ ). Na desossa, às 24h *post mortem* foram coletadas amostras do músculo LD e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foram avaliados os genes: receptor ativador por peroxissomas  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), fator de transcrição de proteínas ligantes aos esteroides (SREBP-1c), estearoil CoA dessaturase (SCD1), acetil CoA carboxilase (ACC), lipoproteína lipase (LPL), proteína de ligação ao ácido graxo (FABP<sub>4</sub>) e glutathiona peroxidase (GPX1). A expressão gênica foi analisada utilizando a técnica de RT-qPCR sendo a quantificação relativa calculada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e quando estes não apresentaram esta distribuição, realizou-se a transformação utilizando o PROC RANK do SAS 9.2. Posteriormente, os dados foram analisados no PROC GLM e no PROC CORR do SAS 9.2. O PPAR- $\alpha$  foi mais expresso no músculo LD dos animais alimentados com GSM, sendo o ácido esteárico o principal responsável. Houve interação entre a fonte lipídica e monensina ( $P<0,05$ ) para o gene SCD1, sendo mais expresso no tratamento onde os animais foram alimentados com grão de soja e suplementados com monensina, comportamento semelhante ao gene GPX1. As expressões da LPL e FABP<sub>4</sub> foram maiores ( $P<0,05$ ) no músculo LD dos animais alimentados com as dietas, contendo grão de soja, além disto, ambos apresentaram correlação positiva com o ácido esteárico. O gene SCD1 correlacionou-se com PPAR- $\alpha$ , FABP<sub>4</sub>, LPL e GPX1. Já o gene PPAR- $\alpha$  correlacionou-se com os genes FABP<sub>4</sub>, LPL, que se correlacionaram entre si. O ácido araquidônico e o  $\alpha$ -linolênico foram os únicos ácidos graxos poli-insaturados que apresentaram correlações negativas com os genes PPAR- $\alpha$ , SCD1, LPL e FABP<sub>4</sub>. O uso de grãos de soja ou gordura protegida, com ou sem suplementação de monensina, alteraram a expressão gênica do PPAR- $\alpha$ , LPL, FABP<sub>4</sub> e do SCD1, sendo os efeitos principais associados ao ácido araquidônico e  $\alpha$ -linolênico.

Palavras-chave: Ionóforo. Nutrigenômica. Oleaginosa. Ruminante. Tecido muscular.

## ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the expression of genes involved in lipid metabolism in the *longissimus dorsi* (LD) muscle of beef cattle fed diets containing soybean grain (SB) or rumen protected lipid (RPL), with or without supplementation with monensin (M). Twenty eight Red Norte bulls, with an average age of 20 months and initial body weight of 359 kg were allotted in a completely randomized design using a 2 x 2 factorial arrangement. The diets contained 6.6% ether extract and corn silage was used as forage. Half of the animals fed SB or RPL was supplemented with 230 mg/head/day of monensin. The animals were slaughtered with an average weight of 497 kg ( $P>0.05$ ). During boning, 24h *post mortem*, samples were collected from the LD muscle and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The evaluated genes were: peroxisome proliferator activator receptor  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), sterol regulatory element binding protein (SREBP-1c), stearoyl CoA desaturase (SCD1), acetyl CoA carboxylase (ACC), lipoprotein lipase (LPL), adipocyte-type fatty acid binding protein (FABP<sub>4</sub>) and glutathione peroxidase (GPX1). Gene expression was analyzed using the RT-qPCR technique, calculating the relative quantification using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . The Shapiro-Wilk test was used in order to verify data normality and, when the data did not show a normal distribution, they were transformed using the SAS 9.2 PROC RANK. Posteriorly, the data were analyzed using SAS 9.2 PROC GLM and PROC CORR. The PPAR- $\alpha$  gene was more expressive in the LD muscle of animals fed SBM, with stearic acid being the main responsible factor. There was interaction between the lipid source and monensin ( $P<0.05$ ) for the SCD1 gene, which was more expressive in the treatment in which animals were fed soybean supplemented with monensin, the same being true with the GPX1 gene. The expressions from LPL and FABP<sub>4</sub> genes were higher ( $P<0.05$ ) in the LD muscle of animals fed diets containing soybean grain, moreover, both were positively correlated with the stearic acid. The SCD1 gene was correlated with PPAR- $\alpha$ , FABP<sub>4</sub>, LPL and GPX1. The PPAR- $\alpha$  gene was correlated with genes FABP<sub>4</sub> and LPL, which were correlated with each other. Arachidonic and  $\alpha$ -linolenic acids were the only polyunsaturated fatty acids which showed a negative correlation with PPAR- $\alpha$ , SCD1, LPL and FABP<sub>4</sub> genes. The use of soybean grain or rumen protected lipid, with or without supplementation with monensin, altered the expression of PPAR- $\alpha$ , LPL, FABP<sub>4</sub> and SCD1 genes, with the main effects being associated with arachidonic and  $\alpha$ -linolenic acids.

Key words: Ionophore. Muscle tissue. Nutrigenomics. Oilseed. Ruminant.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente os consumidores estão cada vez mais interessados em um produto com qualidade nutricional desejável e que atenda às exigências diárias para uma vida saudável e está estabelecido na literatura que a carne bovina é excelente fonte de proteína, vitaminas e micronutrientes (BIESALSKI, 2005; WILLIAMSON; FOSTER; STANNER, 2005). Entretanto, há algum tempo os atributos positivos da carne ficaram em segundo plano por determinados setores ligados à saúde humana, que se preocuparam, principalmente, com os teores de ácidos graxos saturados (AGS). Todavia, ao analisar melhor a fração lipídica da carne de ruminantes, verifica-se que ela é fonte de ácidos graxos benéficos à saúde, como o ácido oleico e o isômero do ácido linoleico conjugado (CLA) C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (FRENCH; STANTON; LAWLESS, 2000).

Com isso, estratégias nutricionais que visam melhorar o perfil destes ácidos graxos presentes na composição da gordura intramuscular na carne têm utilizado fontes alimentares ricas em lipídeos (HILLER; HERDMANN; NUERNBERG, 2011; NUERNBERG et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011; WANG et al., 2012). No entanto, respostas mais específicas associadas a estes fatores de síntese lipídica podem ser obtidos ao se avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico.

As interações entre os nutrientes que compõem a dieta e o nível de expressão gênica, além de fatores de transcrição e receptores nucleares ligados ao metabolismo lipídico podem influenciar a deposição de ácidos graxos na carne bovina e, até o momento, o número de trabalhos que avaliaram esta questão em ruminantes ainda é reduzido (BIONAZ et al., 2013; COSTA et al., 2013; DERVISHI et al., 2010; HERDMANN et al., 2010; LEE et al., 2011), principalmente, com a análise na mesma pesquisa de vários genes. Dentre os fatores de transcrição e os receptores nucleares envolvidos no metabolismo

lipídico, destacam-se as proteínas ligantes aos elementos regulados por esteroides (SREBP-1c) (XU et al., 2001) e o receptor ativado por peroxissoma  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ). O primeiro atua, principalmente, sobre síntese de ácidos graxos, enquanto que o PPAR- $\alpha$  tem como função induzir a proliferação de peroxissomas na célula, regulando assim a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos no músculo (BIONAZ et al., 2013).

O efeito de determinados nutrientes, como os ácidos graxos, sobre a expressão de alguns genes, ocorre em virtude da atividade biológica apresentada por certos lipídeos na dieta, que podem estimular ou inibir genes que codificam enzimas específicas (JUMP, 2002). Neste sentido, pesquisas realizadas por Herdmann et al. (2010), Hocquette et al. (2007) e Pavan e Duckett (2007) verificaram que dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são potentes inibidores do gene que codifica a enzima estearoil CoA dessaturase (SCD1).

Portanto, faz-se necessário ampliar os conhecimentos sobre o efeito das fontes lipídicas na expressão de outros genes importantes para o metabolismo lipídico. Dentre estas fontes, na alimentação de ruminantes é comum o uso do grão de soja e de fontes de gorduras protegidas ou sabões de cálcio. Estes últimos, por sua vez, caracterizam-se por apresentar menor disponibilidade de ácidos graxos para a biohidrogenação (BAUMAN et al., 2003), o que aumentaria a disponibilidade de AGPI para absorção intestinal. Adicionalmente às fontes lipídicas, os aditivos que modificam a população microbiana e, conseqüentemente, os mecanismos envolvendo a biohidrogenação no rúmen (FELLNER; SAUER; KRAMER, 1997), também, podem ser utilizados com o objetivo de aumentar a disponibilidade de ácidos graxos insaturados (AGI) no intestino delgado. Dentre eles os ionóforos são destaque em decorrência de sua grande utilização na pecuária mundial (ELLIS et al., 2012). Dessa forma, o uso de ionóforos pode alterar o tipo de ácido graxo disponível para os tecidos

(LADEIRA et al., 2013), o que poderia influenciar a expressão de determinados genes.

Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a expressão gênica do PPAR- $\alpha$ , SREBP-1c e de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos alimentados com dietas, contendo grão de soja ou gordura protegida, suplementados ou não com monensina. Além disso, objetivou-se estudar as correlações entre as diferentes expressões analisadas e o perfil de ácidos graxos na carne desses animais.



## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental, animais e dietas**

A pesquisa foi conduzida no setor de Bovinocultura de Corte e no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, ambos localizados na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Foram utilizados 28 tourinhos Red Norte, com idade inicial média de 20 meses e peso vivo inicial médio de 359 kg, em um delineamento inteiramente casualizado e arranjo fatorial 2 x 2, com 4 tratamentos e 7 repetições por tratamento. As dietas apresentavam a silagem de milho como volumoso e quatro diferentes tipos de concentrados foram utilizados, contendo grão de soja moído ou gordura protegida oriunda de soja (Megalac®, Química Geral do Nordeste SA, Nova Ponte, Brasil), como fontes de lipídeos, e a inclusão ou não do ionóforo monensina sódica (Rumenpac®, MCassab, São Paulo, Brasil). Portanto, cada tipo de dieta representou um determinado tratamento (Tabela 1). As dietas foram formuladas para atender as exigências de ganho de peso diário de 1,4 kg/dia, segundo o National Research Council - NRC (1996) e, quando utilizado, a dose diária de ionóforo foi de 230 mg/animal.

Tabela 1 Composição percentual de ingredientes, bromatológica e composição dos principais ácidos graxos das dietas experimentais: grão de soja sem monensina (GS), grão de soja + monensina (GSM), gordura protegida sem monensina (GP) e gordura protegida + monensina (GPM)

Ingredientes (%MS)	Dietas			
	GS	GSM	GP	GPM
Silagem de Milho	40,0	40,0	40,0	40,0
Milho Integral	38,2	38,2	40,2	40,2
Farelo de Soja	-	-	13,8	13,8
Grão de soja moído	20,0	20,0	-	-
Megalac-E®	-	-	4,2	4,2
Monensina (mg/dia)	-	230	-	230
Premix Mineral <sup>1</sup>	1,8	1,8	1,8	1,8
Nutrientes (%MS)				
Matéria Seca	66,0	66,0	64,9	64,9
Proteína Bruta	12,9	12,9	12,5	12,5
Fibra em Detergente Neutro	27,0	27,0	28,0	28,0
Carboidrato não fibroso	46,0	46,0	48,5	48,5
Extrato Etéreo	6,5	6,5	6,7	6,7
Ácido Graxo (%MS)				
Ácido mirístico	0,6	0,6	0,9	0,9
Ácido palmítico	17,3	17,3	20,3	20,3
Ácido esteárico	6,8	6,8	7,7	7,7
Ácido oleico	26,71	26,7	28,9	28,9
Ácido linoleico	44,5	44,5	38,7	38,7
Ácido linolênico	4,0	4,0	3,1	3,1

<sup>1</sup>Conteúdo de garantia por quilograma de produto é a seguinte: Ca, 235 g; P, 45 g; S, 23 g; Na, 80,18 g; Zn, 2,38 mg; Cu, 625 mg; Fe, 1,18 mg; Mn, 312 mg; Co, 32 mg; I, 41,6 mg; Se, 11,25 mg; vitamina A, 70,000 IU; vitamina D<sub>3</sub>, 5,000 IU; vitamina E, 15 IU; e niacina, 3,33 mg

A duração do experimento foi de 84 dias, precedido de um período de 14 dias para adaptação dos animais às dietas e instalações. Os animais foram confinados em baias coletivas, com 30 m<sup>2</sup> de área por animal e as dietas foram

fornecidas duas vezes ao dia, às 7h e 14h, na forma de ração total e ajustadas para manter as sobras em 5% do oferecido.

Os animais foram abatidos com peso vivo médio de 497 kg ( $P>0,05$ ), utilizando a técnica de concussão cerebral e secção da veia jugular, seguido de remoção do couro e evisceração. As carcaças foram identificadas, lavadas, divididas em duas metades, sendo estas pesadas individualmente e levadas à câmara fria, por aproximadamente 24 horas, à temperatura de 1°C. Após esse período, duas amostras foram extraídas do músculo *longissimus dorsi* (LD) entre a 12ª e 13ª costelas de cada animal. Para a coleta dos tecidos, todos os instrumentos utilizados foram esterilizados e as amostras de músculo colhidas foram lavadas com solução fisiológica de NaCl a 0,9%. A primeira amostra foi armazenada a uma temperatura de -20°C para posterior extração dos lipídeos e análise dos ácidos graxos, enquanto a segunda foi embrulhada em papel alumínio, congelada e transportada em nitrogênio líquido, sendo, posteriormente, armazenadas em *ultra-freezer* (-80°C).

## 2.2 Análises de ácidos graxos

A extração dos lipídeos do músculo foi realizada de acordo com procedimentos estabelecidos por Folch, Less e Stanley (1957) e metiladas segundo Hara e Radim (1978). As amostras transmetiladas foram analisadas em cromatógrafo a gás modelo Focus CG-Finnigan, com detector de ionização de chama, coluna capilar CP-Sil 88 (Varian), com 100 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e com espessura de 0,20 µm (Supelco, Bellefonte, PA). Foi utilizado o hidrogênio como gás de arraste, numa vazão de 1,8 mL/min. O programa de temperatura inicial do forno foi de 70°C, mantida por 4 min, elevação de 13°C/min até 175°C e mantida por 27 min, elevação de 4°C/min até 215°C e mantida por 9 min e, em seguida, aumentando 7°C/min até 230°C,

permanecendo por 5 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e a do detector 300°C.

A identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção com padrões de ácidos graxos de manteiga e a percentagem dos ácidos graxos foi obtida por meio do *software* Chromquest 4.1 (Thermo Electron, Italy).

As atividades das enzimas  $\Delta^9$  dessaturases e elongases foram determinadas, conforme descrito por Malau-Aduli et al. (1997), por meio de índices matemáticos. Os cálculos foram realizados da seguinte maneira:

$$\text{C14 index: } 100 [(C14:1cis9)/(C14:1cis9 + C14:0)]$$

$$\text{C16 index: } 100 [(C16:1cis9)/(C16:1cis9 + C16:0)]$$

$$\text{C18 index 18: } 100 [(C18:1cis9)/(C18:1cis9 + C18:0)]$$

$$\text{Total dessaturase index: } 100 [(C14:1 + C16:1 + C18:1)/(C14:1 + C16:1 + C18:1 + C14:0 + C16:0 + C18:0)]$$

$$\text{Elongase: } 100 [(C18:0 + C18:1cis9)/(C16:0 + C16:1cis9 + C18:0 + C18:1cis9)]$$

### 2.3 Análises de expressão gênica

O desenho dos primers alvos e de referência foi realizado pelas sequências cadastradas e publicadas no banco de dados público do *Genbank*, plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para a caracterização dos genes as ORFs (*Open Reading Frames*) das sequências selecionadas foram obtidas pela ferramenta *ORFinder* do NCBI e as sequências de proteínas codificadas obtidas a partir da ferramenta *translate*, encontrada no banco de proteínas ExPASy (BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL, 2013).

A sequência dos primers foi desenhada, utilizando o *software* Oligo Perfect™ Designer, considerando as sequências obtidas no *Genbank*. Os primers para o tempo real (RT-qPCR) foram comercialmente sintetizados (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com suas sequências sendo apresentadas na Tabela 2.

Para a extração do RNA total, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de cadinho e pistilo. Do material macerado, 200 mg de tecido foram coletados, adicionados 1,2 mL de QIAzol (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) e misturados vigorosamente em vortex. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo, posteriormente, adicionados 200 µL de clorofórmio, agitadas e levadas à centrifuga por 15 minutos a 14.000 rpm à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionados mais 200 µL de clorofórmio para uma segunda lavagem. Novamente o sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionado 600 µL de isopropanol. As amostras foram mantidas por um período de 1 hora à temperatura de -20°C, em seguida, foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, seguido de nova centrifugação por 8 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o etanol a 75% foi descartado, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água ultra pura. Após estes procedimentos as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

Tabela 2 Sequência dos primers (5' para 3') que foram usados na PCR quantitativa em tempo real

Símbolo	Nome	Forward (F) e Reverse (R)	Número de Acesso
PPAR- $\alpha$	Receptor ativado por peroxissomas $\alpha$	F CAATGGAGATGGTGGACACA R TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	NM_001034036.1
SREBP-1c	Fator de transcrição de proteínas ligantes aos esteroides	F GAGCCACCCTTCAACGAA R TGTCTTCTATGTCCGGTCAGCA	NM_001113302.1
SCD1	Estearoil CoA dessaturase	F TTATTCCGTTATGCCCTTGG R TTGTCATAAGGGCGGTATCC	NM_173959.4
ACC	Acetil CoA carboxilase	F TGAAGAAGCAATGGATGAACC R TTCAGACACGGAGCCAATAA	NM_174224.2
LPL	Lipoproteína lipase	F CTCAGGACTCCCGAAGACAC R GTTTTGCTGCTGTGGTTGAA	NM_001075120.1
FABP <sub>4</sub>	Proteína de ligação ao ácido graxo	F GGATGATAAGATGGTGCTGGA R ATCCCTTGGCTTATGCTCTCT	NM_174314.2
GPX1	Glutationa peroxidase	F GGAGATCCTGAATTGCCTGA R CCATTCACCTCGCACTTTTC	NM_174076.3
$\beta$ -actin	$\beta$ -actina	F GTCCACCTTCCAGCAGATGT R CAGTCCGCCTAGAAGCATT	BC142413.1
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	F CGACTTCAACAGCGCACTC R TTGTCGTACCAGGAAATGAGC	NM_001034034.1

Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase DNA free (Ambion, Austin, TX, EUA), em uma reação contendo 0,1 volume do tampão DNase turbo 10X, 0,5 µL da enzima DNase turbo e água livre de DNase/RNase para completar o volume de 25 µL. Essa reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 2,5 µL do reagente de inativação da DNase e as amostras foram incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1,5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C.

Para a avaliação da integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UVITEC FireReader XS D-77Ls-20M para análise das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal (rRNA). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000) a 260 nm com o objetivo de determinar a quantidade (ng/µL) e qualidade (260/280 e 260/230) do RNA.

A síntese de cDNA foi feita com *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi preparado um *mix*, contendo 2 µL do tampão 10X da enzima, 2 µL do primer RT *Random Primers* 10X, 0,8 µL do *mix* dNTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador MultiGene™ Gradient (Labnet), programado com três etapas: 10 minutos a 25°C para o anelamento dos primers, 2 horas a 37°C para ação da enzima e 5 minutos a 85°C para inativá-la. Após o processo, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

Para a análise da expressão gênica quantitativa por RT-qPCR foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 *Real Time* PCR (Applied Biosystems), utilizando o sistema de detecção *SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o cDNA obtido a partir de RNA extraído do tecido muscular de bovinos. As condições térmicas de reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 minutos a 95°C e 1 minuto a 60°C e, finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa 7500 *Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação foi utilizado 1,0 µL de cDNA, 0,3 µL de cada primer (forward e reverse) e 5,0 µL de *Master Mix SYBR Green* para um volume final de 10,0 µL/amostra em uma placa de reação com 96 poços MicroAmp Optical (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os controles negativos e curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. Todo o experimento de RT-qPCR, para cada gene em estudo, foi conduzido a partir de cDNAs diferentes, obtidos a partir de sete repetições biológicas, com três réplicas técnicas para cada uma, sendo os resultados normalizados usando  $C_{T_s}$  (Ciclo *Threshold*) obtidos pela expressão dos genes de referência  $\beta$ -actina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

O CT foi determinado pelo número de ciclos utilizando-se o método  $C_T$  comparativo. Como um dos requisitos necessários para a utilização deste método, foi realizado um ensaio de validação para mostrar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referências são, aproximadamente, iguais (Tabela 3). Para isto foram realizadas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Este procedimento permite a definição da concentração de cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 10 ng/µL. A concentração de cada primer foi de 1,5 µM.



Tabela 3 Amplicon e eficiência dos primers utilizados na PCR quantitativa em tempo real

<b>Símbolo</b>	<b>Forward (F) e Reverse (R)</b>	<b>Amplicon (pb)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Eficiência</b>
PPAR- $\alpha$	F CAATGGAGATGGTGGACACA R TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	95	0,992	99,17
SREBP-1c	F GAGCCACCCTTCAACGAA R TGTCTTCTATGTCGGTCAGCA	88	0,985	94,61
SCD1	F TTATTCCGTTATGCCCTTGG R TTGTCATAAGGGCGGTATCC	83	0,981	95,79
ACC	F TGAAGAAGCAATGGATGAACC R TTCAGACACGGAGCCAATAA	88	0,994	96,63
LPL	F CTCAGGACTCCCGAAGACAC R GTTTTGCTGCTGTGGTTGAA	98	0,990	96,67
FABP <sub>4</sub>	F GATGATAAGATGGTGCTGGA R ATCCCTTGGCTTATGCTCTCT	73	0,994	92,60
GPX1	F GGAGATCCTGAATTGCCTGA R CCATTCACCTCGCACTTTTC	87	0,991	91,72
$\beta$ -actin	F GTCCACCTTCCAGCAGATGT R CAGTCCGCCTAGAAGCATTT	90	0,996	100,00
GAPDH	F CGACTTCAACAGCGACACTC R TTGTCGTACCAGGAAATGAGC	96	0,998	101,42

A normalização dos genes foi realizada utilizando-se a equação  $\Delta C_T = C_T$  (gene alvo) -  $C_T$  (gene referência). Para isso, a calibração foi determinada pela fórmula  $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (calibrador), em que o calibrador utilizado foi o da dieta que o gene apresentou a menor expressão.  $C_T$  do gene na dieta onde foi menos expresso. A avaliação da quantificação relativa foi realizada pela fórmula  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ .

#### **2.4 Análises estatísticas**

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e quando estes não apresentaram esta distribuição, realizou-se a transformação utilizando o PROC RANK do SAS 9.2 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2012). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi utilizado para determinar a diferença estatística entre as médias dos tratamentos, por meio do PROC GLM do SAS 9.2. Os coeficientes da correlação de Pearson foram calculados usando o PROC CORR do SAS 9.2. Consideraram-se, como significativos, valores de  $P < 0,05$ . As correlações feitas neste trabalho foram realizadas com o perfil de ácidos graxos publicado por Ladeira et al. (2013).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão do gene SREBP-1c não foi afetada, significativamente, pelas dietas utilizadas, já o PPAR- $\alpha$  foi mais expresso, no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja e monensina, em comparação ao músculo dos animais que receberam as demais dietas (Figura 1). A maior expressão do PPAR- $\alpha$  no tratamento com grão de soja e monensina pode estar associada às alterações na biohidrogenação ruminal dos AGI quando a monensina foi utilizada em conjunto com o grão de soja, já que o uso de oleaginosas moídas faz com que ocorra maior disponibilidade dos ácidos graxos (LADEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011), em comparação aos sabões de cálcio. Dessa forma, o uso desta dieta pode ter alterado as concentrações de ácidos graxos disponíveis para absorção no intestino delgado e, segundo Bionaz et al. (2013), diferentes ácidos graxos podem ativar mais ou menos os diferentes isotipos de PPAR. Dentre os ácidos graxos que apresentam forte efeito agonista sobre o PPAR destacam-se os ácidos palmítico e esteárico (BIONAZ et al., 2013) e este último estava em maior concentração no músculo LD dos animais que receberam o grão de soja na composição da dieta (15,6 vs 12,7%;  $P < 0,05$ ).

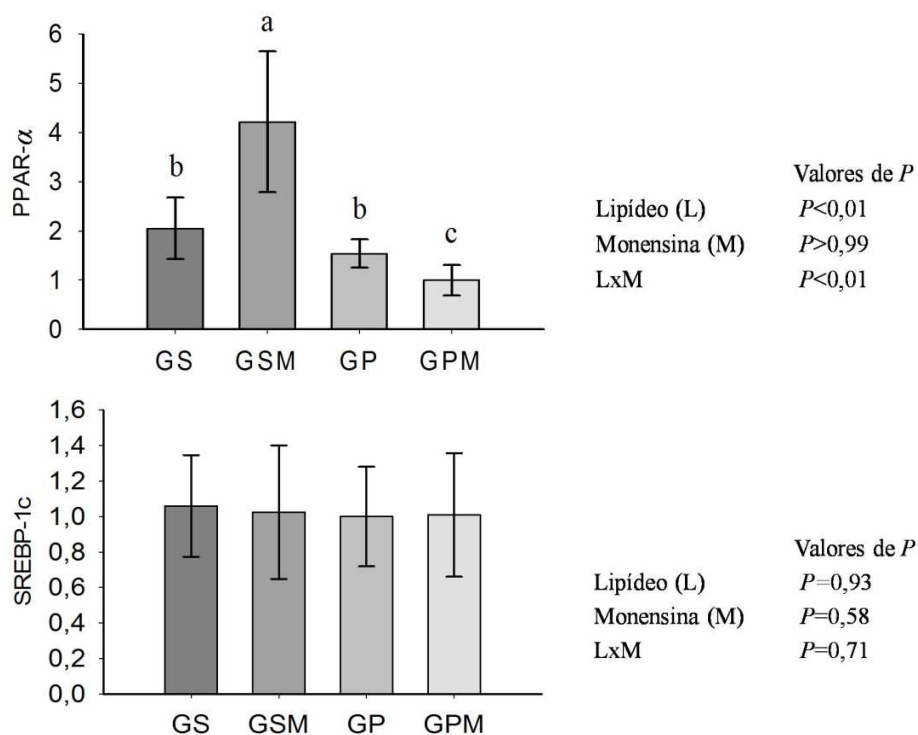


Figura 1 Expressão relativa dos genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-1c no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M)

Nota: Letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey

O mecanismo de ação dos ácidos graxos sobre receptores nucleares está associado ao fato de que estes agem diretamente no núcleo, ligando e regulando a sua atividade (JUMP, 2008), desempenhando papel vital na indução de genes que atuam na captação de ácidos graxos (NTAMBI; BENE, 2001). Vários genes que respondem de forma positiva ou negativa à concentração de alguns ácidos graxos são, também, responsivos ao PPAR- $\alpha$ , pois apresentam uma região para ligação destes em sua região promotora (DUPLUS; GLORIAN; FOREST,

2000). Assim, tem sido assumido que alguns ácidos graxos regulam o gene SCD1 via PPAR- $\alpha$ , no entanto, Bionaz et al. (2013) sugerem que a alteração da transcrição gênica gerada por ácidos graxos e ativadores, frequentemente, é desconexa, ou seja, alguns genes não respondem, mesmo possuindo região para sua ligação em seu promotor.

Para o gene SCD1 foi observada interação entre a monensina e a fonte lipídica, em que a quantidade de mRNA do gene SCD1 foi maior no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja e monensina e menor no músculo dos animais alimentados com gordura protegida e monensina, já a expressão do gene que codifica a enzima acetil CoA carboxilase (ACC), também, apresentou interação entre a monensina e a fonte lipídica (Figura 2), o que sugere que os primeiros passos da síntese *de novo* foram afetados pelas dietas. No caso das dietas com grão de soja, a maior expressão, quando se utilizou o aditivo ionóforo, pode ser explicada, em virtude da maior expressão gênica de PPAR- $\alpha$  nestas dietas, já que segundo Bionaz, Hering e Loores (2012), este receptor nuclear aumenta a expressão do gene SCD1.

Ao realizar um estudo de correlação entre os diferentes genes estudados, verificou-se, também, a correlação entre o PPAR- $\alpha$  e a SCD1 (Tabela 4). Já em relação às dietas com gordura protegida, o ionóforo aumentou a deposição de ácido araquidônico (0,08 vs 0,05%;  $P < 0,05$ ) e, segundo Flowers e Ntambi (2008), Jacobs et al. (2011) e Waters et al. (2009), os AGPI reduzem a expressão do gene SCD1 em diferentes espécies e tecidos animais. Além disto, entre os trabalhos que avaliaram o efeito de AGPI sobre a expressão da SCD1, a biohidrogenação é o principal obstáculo associado à resposta deste gene, no entanto, os ionóforos tendem a reduzir os passos finais desta etapa (NEVEL; DEMEYER, 1995). Os AGPI, presentes na composição das dietas, são extensivamente biohidrogenados (JENKINS et al., 1993). Quanto menor a biohidrogenação maior o teor de AGPI que chegam ao tecido, o que pode

reduzir a expressão do gene SCD1 em ruminantes (HERDMANN et al., 2010; PAVAN; DUCKETT, 2007).

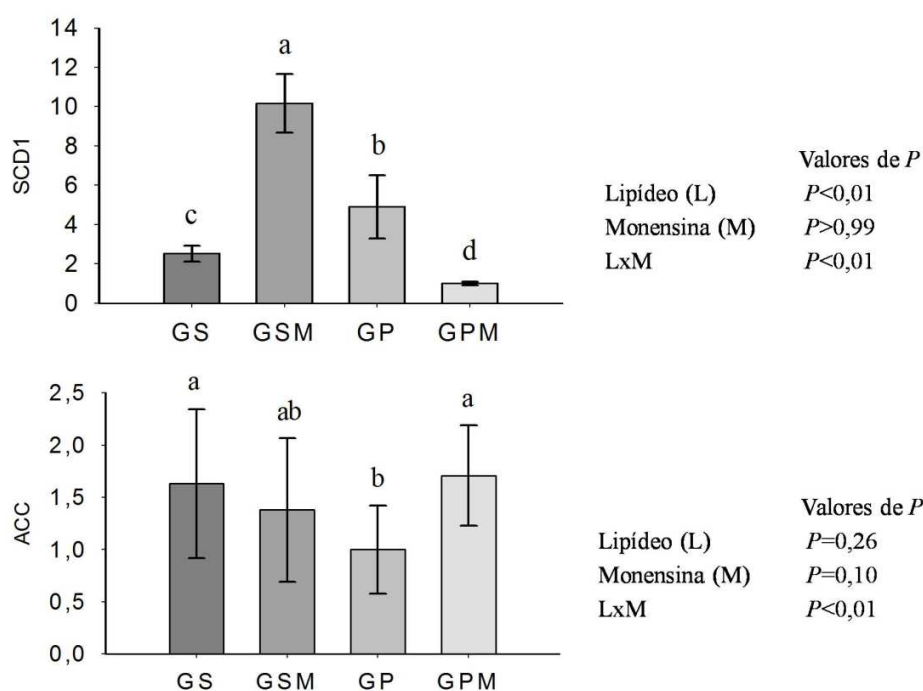


Figura 2 Expressão relativa dos genes SCD1 e ACC no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M)

Nota: Letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

A gordura protegida tem a função de aumentar o teor de AGPI disponível no intestino delgado e a monensina tem o potencial de reduzir a lipólise e alterar a biohidrogenação ruminal (FELLNER; SAUER; KRAMER, 1997; NEVEL; DEMEYER, 1995) é de se esperar que haja maior disponibilidade de AGPI no músculo dos animais alimentados com gordura

protegida e monensina, o que levou à redução da expressão da SCD1 em razão do efeito associativo dos dois ingredientes. Segundo Ladeira et al. (2013), o uso da gordura protegida elevou os teores de ácido linolênico e da monensina os teores de ácido araquidônico no músculo destes animais, comprovando, assim, o efeito negativo dos AGPI sobre a SCD1.

Nas dietas com inclusão de grão de soja, houve aumento no teor de CLA no LD (0,72 vs 0,61%;  $P < 0,05$ ), em relação às dietas com gordura protegida, independente do uso ou não do ionóforo, o que pode ter ocorrido, em consequência da maior ação da enzima SCD1 sobre os isômeros de C18:1 *trans*-11 (ácido vaccênico), um dos intermediários da biohidrogenação e que pode acumular com a adição da monensina na dieta, justificando, também, a maior expressão do gene SCD1 no tratamento com grão de soja e monensina. Mais de 80% do total de CLA no tecido resulta da dessaturação do ácido vaccênico por ação da enzima SCD1 no tecido bovino (PAVAN; DUCKETT, 2007). A regulação do gene SCD1 e as reduções nas concentrações de CLA não são resultantes apenas da baixa atividade da dessaturase, mas em vez disto, estão associados à menor disponibilidade do substrato (ácido vaccênico) presente no tecido (DUCKETT; PRATT; PAVAN, 2009). Portanto, na dieta com grão de soja sem monensina haveria maior produção de CLA entérico e menor absorção de ácido vaccênico pelo intestino delgado, o que reduziria a necessidade de ação da SCD1 no tecido muscular. Doran et al. (2006), ainda, concluem que diferentes respostas da SCD1, mediadas por manipulações dietéticas, sugerem a existência de mecanismos específicos do tecido e, possivelmente, expressão tecido-específica dos fatores de transcrição (SREBP) ou promotores (PPAR) relacionados à regulação do produto do gene SCD1 em ruminantes, ainda não conhecidos.

A alta correlação positiva entre as expressões dos genes SCD1 e PPAR- $\alpha$ , também, foi observada por Hebbachi et al. (2008) em estudo com ratos. No

entanto, resultados diferentes foram relatados em bovinos (WATERS et al., 2009). Cabe lembrar que estudos avaliando esse comportamento em bovinos são recentes e escassos na literatura, o mesmo pode ser discutido se for levado em consideração o gene SREBP-1c. Em células humanas já foi confirmado que a SCD1 pode estar sob o controle da SREBP-1c e PPAR- $\alpha$  (RENAVILLE et al., 2006). Já em bovinos, Waters et al. (2009) observaram que a redução na resposta da SCD1 está diretamente associada ao nível de expressão da SREBP-1c, algo não verificado neste trabalho.

Tabela 4 Coeficientes da correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* em bovinos

Genes	ACC	GPX1	FABP <sub>4</sub>	LPL	SCD1	SREBP-1c
PPAR- $\alpha$	-0,06	<b>0,67***</b>	<b>0,64***</b>	<b>0,60***</b>	<b>0,77***</b>	0,07
SREBP-1c	<b>0,46*</b>	-0,03	0,19	-0,02	0,04	
SCD1	-0,17	<b>0,70***</b>	<b>0,59***</b>	<b>0,40*</b>		
LPL	0,21	<b>0,45*</b>	<b>0,77***</b>			
FABP <sub>4</sub>	0,15	<b>0,39*</b>				
GPX1	-0,06					

P<0,001\*\*\*, P<0,01\*\* e P<0,05\*

A ação da enzima ACC define a velocidade de síntese dos ácidos graxos e pode ser controlada alostericamente, além de responder a estímulos hormonais e metabólicos em todas as espécies (MUNDAY et al., 1991). Segundo Oliveira et al. (2011), as quantidades de gordura no músculo, normalmente, resultam de um equilíbrio entre a energia da dieta e as necessidades metabólicas do animal. Além disso, a disponibilidade de substratos para sua síntese, como a glicose, também, influenciam a deposição de gordura intramuscular (GILBERT et al., 2003). Como a utilização de monensina aumenta a produção de propionato e,



consequentemente, a gliconeogênese, poderia ocorrer maior disponibilidade de glicose para a síntese *de novo* de ácidos graxos com a utilização do ionóforo, fato este observado neste trabalho já que a adição de monensina as fontes lipídicas aumentou a expressão do gene ACC.

As expressões gênicas da LPL e FABP<sub>4</sub> foram maiores nos músculos LD dos animais alimentados com as dietas, contendo grão de soja, em relação ao LD dos animais alimentados com gordura protegida (Figura 3). Além do mais, a utilização da monensina afetou a expressão desses genes. Apesar dos teores de ácidos graxos nas dietas terem sido similares, por volta de 6,6% de EE, a composição de ácidos graxos absorvidos no intestino delgado e disponíveis para captação pelo tecido muscular foi diferente, já que existe diferença na composição de ácidos graxos entre os alimentos estudados (LADEIRA et al., 2013), bem como na intensidade de ocorrência da biohidrogenação. Portanto, a maior quantidade de ácidos graxos com 18 carbonos no grão de soja e a maior concentração de ácido esteárico no músculo dos animais alimentados com esta oleaginosa podem ter sido responsáveis pela maior expressão destes genes, já que, conforme pode ser visto na Tabela 5, verificou-se correlação positiva entre a LPL e o ácido esteárico. Além disso, o músculo dos animais alimentados com grão de soja continha maiores teores de C17:0 e C17:1 que, também, apresentaram correlação com o gene LPL e FABP<sub>4</sub>.

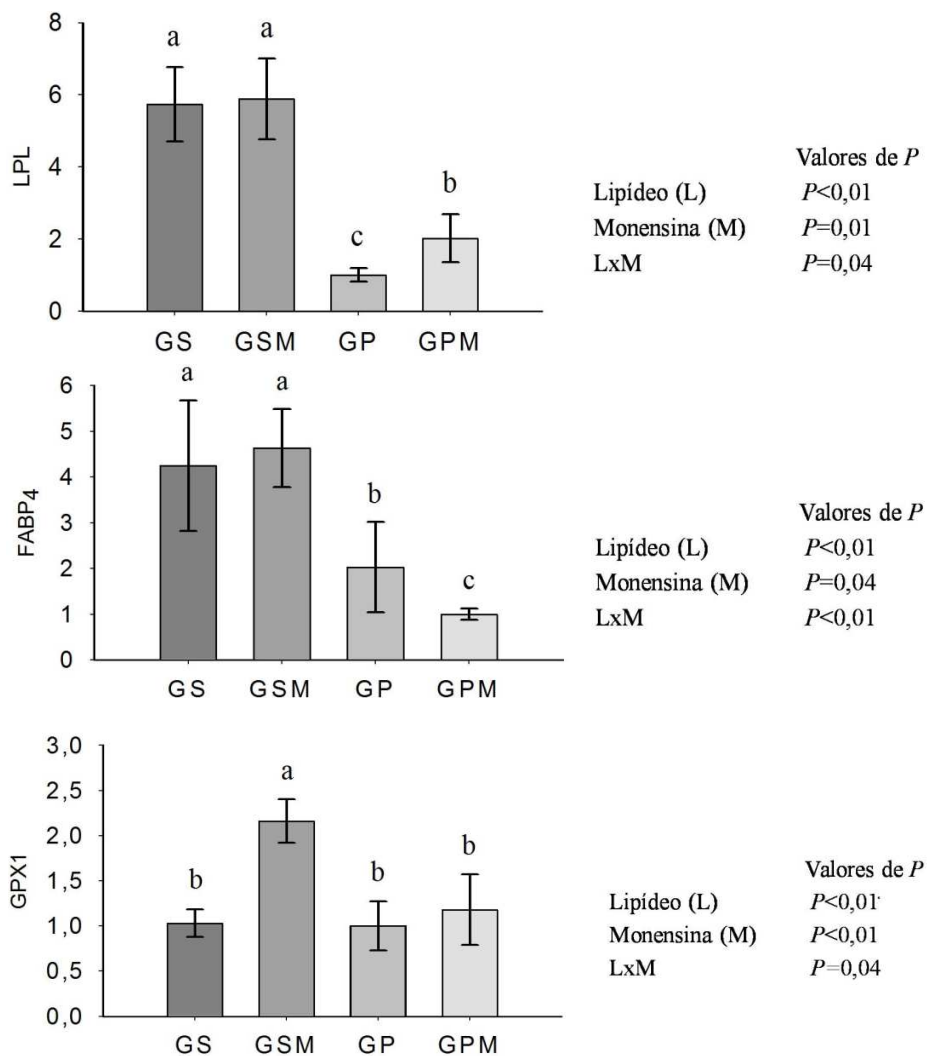


Figura 3 Expressão relativa dos genes LPL, FABP<sub>4</sub> e GPX1 no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou gordura protegida (GP), suplementados ou não com monensina (M)

Nota: Letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

Segundo Jurie et al. (2007), a maior quantidade de triacilglicéris circulantes no sangue resulta em maior atividade da enzima LPL, o que pode

ativar o carreador de membrana FABP<sub>4</sub>, que é responsável pelo transporte de ácidos graxos para o interior da célula. Portanto, os genes LPL e FABP<sub>4</sub> apresentam funções que se complementam, o que é comprovado nos dados deste trabalho e nos estudos de correlação (Tabela 4).

A SCD1, também, apresentou correlação positiva com a LPL e FABP<sub>4</sub>, demonstrando que a expressão desta no tecido muscular está diretamente associada a mecanismos anteriores que ocorrem no tecido, como a quebra do triacilglicerol pela LPL e, conseqüentemente, o carregamento da molécula de ácido graxo para o adipócito via o transportador de membrana FABP<sub>4</sub>.

Os efeitos sobre a expressão da FABP<sub>4</sub> também, podem estar associados diretamente ao PPAR- $\alpha$ , uma vez que, estes apresentaram correlação positiva (Tabela 4). Em trabalhos realizados por Hausman et al. (2008) e Shin et al. (2009), a análise comparativa da região promotora do gene FABP<sub>4</sub> em mamíferos revelou que existem dois sítios de ligação reservados ao PPAR- $\alpha$  em humanos, ratos, suínos, cães e bovinos. Com isso, de acordo com Wolfrum et al. (2001), a quantidade de mRNA da FABP<sub>4</sub> está correlacionada com a ativação dos receptores via PPAR- $\alpha$  em resposta a ácidos graxos de cadeia longa, como ácido linoleico, ácido linolênico e ácido araquidônico, bem como outros ligantes químicos.

Para o gene GPX1 foi observado efeito da interação entre fonte lipídica e monensina, sendo mais expresso no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja e monensina. A monensina tem a capacidade de aumentar a proporção de ácidos graxos insaturados que escapam do rúmen e que chegam ao intestino para absorção e deposição no tecido muscular (WANG et al., 2005) e quanto maior o número de insaturações, mais propensos à oxidação lipídica são os ácidos graxos. As dietas com grão de soja resultaram em maior deposição de AGPI no músculo, em relação às dietas com gordura protegida (12,9 vs 9,9%;  $P < 0,05$ ), o que refletiu em maior oxidação aos 21 dias de maturação da carne

(LADEIRA et al., 2013). Outra explicação possível seria a ativação deste gene pelo o PPAR- $\alpha$ , já que estes apresentaram correlação positiva (Tabela 4). Além disso, a maior expressão da SCD1 nestas dietas aumentaria a insaturação dos ácidos graxos.

Os teores dos ácidos araquidônico e  $\alpha$ -linolênico apresentaram correlações negativas tanto para a SCD1 quanto para o PPAR- $\alpha$  (Tabela 5), o que ajuda a explicar os resultados encontrados nas Figuras 1 e 2 e confirma que estes genes apresentam mecanismos de regulação relacionados.

Não houve correlação entre o perfil de ácidos graxos e o gene ACC ( $P>0,05$ ), assim como entre todos os genes avaliados e os ácidos graxos considerados hipercolesterolêmicos (C12:0, C14:0 e C16:0) (Tabela 5). Todavia, foram observadas correlações semelhantes entre os ácidos graxos e os genes da LPL e FABP<sub>4</sub>, demonstrando a complementaridade do mecanismo associado ao produto desses genes (Figura 3). Entre os ácidos graxos que apresentaram o maior número de correlações com os genes estudados, destacam-se os ácidos  $\alpha$ -linolênico (C18:3) e araquidônico (C20:4), sendo a maioria das correlações negativas, ou seja, estes ácidos graxos diminuiram a expressão da maioria dos genes, com exceção do SREBP-1c. No caso da GPX1, apenas o ácido  $\alpha$ -linolênico apresentou correlação significativa e positiva. O teor de ácidos graxos  $\omega$ -3 apresentou o maior número de correlações com a expressão dos genes avaliados, o que é reflexo das correlações apresentadas pelo ácido  $\alpha$ -linolênico.

Tabela 5 Coeficientes da Correlação de Pearson entre o perfil de ácidos graxos e a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* em bovinos

Ácido Graxo		Genes						
		PPAR- $\alpha$	SREBP-1c	SCD1	ACC	LPL	FABP <sub>4</sub>	GPX1
Cáprico	C10:0	-0,12	-0,13	-0,03	-0,22	-0,27	-0,22	-0,14
Láurico	C12:0	-0,27	-0,15	-0,22	-0,33	-0,32	-0,33	-0,25
Mirístico	C14:0	0,13	0,10	0,22	0,04	-0,10	0,04	0,07
Miristoleico	C14:1 c9	-0,30	-0,05	0,21	-0,35	<b>-0,55**</b>	<b>-0,38*</b>	-0,30
Pentadecanoico	C15:0	-0,32	-0,31	0,21	-0,23	-0,16	-0,23	-0,16
Palmítico	C16:0	0,11	0,12	0,22	0,01	-0,10	0,01	0,22
Palmitoleico	C16:1 c9	0,03	-0,05	0,13	-0,18	-0,19	-0,18	0,23
Margárico	C17:0	0,24	0,23	0,21	0,01	<b>0,38**</b>	<b>0,41*</b>	0,29
Heptadecenoico	C17:1	0,15	-0,19	0,06	0,18	<b>0,63**</b>	<b>0,39*</b>	0,25
Estearico	C18:0	0,27	0,32	0,17	0,13	<b>0,51**</b>	<b>0,56**</b>	0,11
Óleico	C18:1 c9	-0,03	0,26	-0,07	0,07	-0,31	-0,19	-0,21
CLA	C18:2 c9-t11	0,04	-0,19	-0,04	0,10	0,30	0,12	0,08
Linoleico	C18:2 c9-c12	-0,07	-0,15	-0,12	0,17	0,23	0,11	0,05
$\alpha$ -Linolênico	C18:3	<b>-0,45*</b>	-0,06	<b>-0,38*</b>	-0,05	<b>-0,65**</b>	<b>-0,67**</b>	<b>0,38*</b>

“Tabela 5, conclusão”

Ácido Graxo		Genes						
		PPAR- $\alpha$	SREBP-1c	SCD1	ACC	LPL	FABP <sub>4</sub>	GPX1
Araquidônico	C20:4	<b>-0,42*</b>	<b>0,37</b>	<b>-0,38*</b>	0,02	<b>-0,40*</b>	<b>-0,60**</b>	-0,04
$\Sigma$ Saturados		0,22	0,26	0,27	-0,09	0,19	0,32	0,26
$\Sigma$ Monoinsatura dos		-0,03	0,21	-0,04	0,04	-0,32	-0,22	-0,16
$\Sigma$ Poli- insaturados		-0,02	-0,19	-0,07	0,10	0,28	0,09	0,07
$\Sigma$ Ômega-3		<b>-0,45*</b>	-0,06	<b>-0,38*</b>	-0,05	<b>-0,65**</b>	<b>-0,67**</b>	<b>0,38*</b>
$\Sigma$ Ômega-6		0,03	-0,19	-0,04	0,10	0,30	0,12	0,08

P<0,01\*\* e P<0,05\*

De acordo com Hiller, Herdmann e Nuernberg (2011), menores valores de correlações significativas são encontradas no músculo, comparativamente à gordura subcutânea, provavelmente em razão da maior lipogênese na gordura subcutânea, o principal local de armazenamento energético e acúmulo de lipídios em ruminantes.

Nota-se que existe grande variação em relação à ação dos diferentes tipos de AGPI  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 sobre o receptor nuclear PPAR e o fator de transcrição SREBP-1c, o que contribui para os diferentes efeitos exercidos por ácidos graxos destas duas famílias (JUMP, 2008). Todavia, segundo os resultados deste trabalho, apenas os ácidos graxos  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) e o araquidônico ( $\omega$ -6) agiram inibindo a expressão do gene PPAR- $\alpha$ .

Todas as isoformas do gene PPAR, avaliadas em não ruminantes, principalmente suínos, são sensíveis a ácidos graxos saturados de cadeia longa, entretanto, respostas já foram observadas para AGPI (BIONAZ et al., 2013). Em geral, é seguro concluir que, na maioria das espécies de não ruminantes estudadas até o momento, o PPAR- $\alpha$  apresenta maior afinidade a ácidos graxos insaturados comparativamente a saturados. Bionaz et al. (2013) relataram que descobertas inesperadas em células de ruminantes devem ser mais bem estudadas, pois, pode ocorrer limitação na utilização de dados de animais não-ruminantes para animais ruminantes e especificidade na resposta entre diferentes tecidos, fato este que ilustra bem os resultados apresentados neste trabalho para o gene PPAR- $\alpha$ , pois o mesmo não apresentou correlação com nenhum AGS. Outra causa de discrepância podem ser as diferenças metodológicas entre os estudos, tais como os métodos utilizados para a realização RT-qPCR, em que a técnica baseia-se na identificação e utilização de genes referência adequados (KADEGOWDA et al., 2009).

Em algumas células do fígado, foi observada uma menor indução de genes alvo à medida que o grau de insaturação aumentava (BIONAZ; HERING;

LOOR, 2012), além disso, observou-se que palmitato e esteárico induziram uma forte ativação da transcrição dos receptores PPAR- $\alpha$  (BIONAZ; HERING; LOOR, 2012; KADEGOWDA et al., 2009), o que demonstra a resposta tecido-específica deste gene. Esses dados sugerem uma adaptação evolutiva do PPAR em ruminantes para responder aos ácidos graxos saturados de cadeia longa, que são os mais abundantes no sangue desses animais (OR-RASHID et al., 2009; ZACHUT et al., 2010), quando comparado com animais não-ruminantes (MA et al., 1995; PELTIER et al., 2008), em função do processo de hidrogenação ruminal.

Adicionalmente, neste trabalho sugere-se que a expressão dos genes ativados por ácidos graxos de cadeia longa é feita não só por meio da proteína PPAR, mas também por outros fatores de transcrição, como o SREBP-1c, já que em contraste aos resultados encontrados para a expressão de PPAR- $\alpha$ , o ácido araquidônico apresentou correlação positiva com a expressão do gene SREBP-1c. De acordo com Waters et al. (2009), a expressão do gene SREBP-1c é o principal responsável pela variação na expressão da SCD1, no entanto, como observado na Tabela 4, esses genes não apresentaram correlação entre si neste estudo.

O gene SCD1 é um dos que mais chama atenção da comunidade científica, em razão de seu mecanismo associado à formação de CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 nos tecidos a partir do ácido vaccênico. Portanto, as correlações negativas entre os ácidos  $\alpha$ -linolênico e araquidônico sobre a SCD1 são indicativos que o uso de fontes ricas nestes ácidos graxos podem reduzir a síntese de CLA no músculo e afetar negativamente suas concentrações.

Estes resultados contribuem com o relato de Bellinger et al. (2004), em que foi verificado que a alimentação com uma mistura de AGPI  $\omega$ -3, entre eles o ácido linolênico, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) resultou em supressão de 50% do mRNA da SCD1 em ratos. Da mesma



forma, Renaville et al. (2006) mostraram que a diminuição na taxa de conversão de ácido vaccênico a CLA em uma linhagem celular intestinal humana após adição de EPA foi atribuído a um efeito negativo deste AGPI sobre a expressão da SCD1. Esses resultados mostram a similaridade entre diferentes estudos, no entanto, apresenta para a comunidade científica uma nova hipótese, a de que nem todos os AGPI são inibidores da SCD1.

Verificou-se ausência de correlação entre o CLA e o gene SCD1, resultados semelhantes aos de Barton et al. (2011) e Ward et al. (2010). Portanto, apesar da importância da conversão de vaccênico em CLA nos tecidos, vários outros fatores podem influenciar a concentração deste ácido graxo no músculo de ruminantes, dentre eles: os níveis de lipídeos das dietas, os graus de insaturações das fontes utilizadas e a eficiência nos processos de biohidrogenação.

A correlação entre a expressão do gene SCD1 e concentração de AGPI na gordura subcutânea tem sido relatada em diversos trabalhos (CHUNG et al., 2007; DUCKETT; PRATT; PAVAN, 2009), enquanto que o mesmo resultado não foi descrito no músculo (BARTON et al., 2011; DANCE; MATTHEWS; DORAN, 2009; WARD et al., 2010), o que aponta para um mecanismo de regulação específico associado à expressão deste gene nos diferentes tecidos. Apesar das mudanças na expressão gênica do gene SCD1 se basearem nas proporções do teor de AGMI, a análise de correlação não conseguiu estabelecer uma associação significativa entre ambos neste trabalho. Archibeque et al. (2005) já demonstraram que o tecido adiposo subcutâneo tem, aproximadamente, o dobro da quantidade da SCD1 em relação ao tecido adiposo intramuscular, o que pode explicar a falta de correlação entre o teor de AGMI no tecido adiposo intramuscular deste trabalho.

O gene LPL não apresentou correlação com o teor de AGMI, semelhante aos dados publicados por Costa et al. (2013) onde a LPL não mostrou nenhuma

correlação com os principais ácidos graxos, no entanto, os autores observaram correlação entre a expressão do gene LPL e o teor de ácido oleico e CLA na gordura subcutânea de bovinos de corte, estes resultados destacam a importância do gene no controle da absorção de triacilglicerol e, conseqüentemente, sobre o perfil de ácidos graxos. Tendo em conta que a LPL é expressa no final da adipogênese, o aumento da expressão do gene seria consistente com adipócitos mais ativos na gordura subcutânea.

Não houve correlação entre a elongase e os genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo LD, enquanto o índice C18 dessaturase se correlacionou de forma negativa apenas com os genes LPL e FABP<sub>4</sub> e o índice C14 dessaturase com estes genes mais PPAR- $\alpha$ , SCD1 e GPX1 (Tabela 6). Alguns autores determinam a atividade enzimática das dessaturases no tecido muscular por índices que são calculados a partir de dados da composição de ácidos graxos, de modo a explicar a variabilidade observada na sua composição (COSTA et al., 2013; MALAU-ADULI et al., 1997). De acordo com os dados deste trabalho, o fato de extrapolar a atividade de dessaturases por índices matemáticos pode não ser uma boa alternativa, em função das correlações negativas observadas. Além disso, Archibeque et al. (2005) já argumentaram que os índices de dessaturação não refletem corretamente a atividade enzimática em bovinos.

Tabela 6 Coeficientes da correlação de Pearson dos índices de dessaturação e da elongase com a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo

	PPAR- $\alpha$	SREBP-1c	SCD1	ACC	LPL	FABP <sub>4</sub>	GPX1
C14 dessaturase index	<b>-0,45*</b>	-0,10	<b>-0,39*</b>	0,03	<b>-0,38*</b>	<b>-0,43*</b>	<b>-0,38*</b>
C16 dessaturase index	-0,09	-0,17	-0,01	-0,81	-0,31	-0,33	0,09
C18 dessaturase index	-0,24	-0,13	-0,18	-0,05	<b>-0,57**</b>	<b>-0,55**</b>	-0,19
Total dessaturase index	-0,21	-0,06	-0,24	0,09	<b>-0,40*</b>	<b>-0,41*</b>	-0,24
Elongase	-0,01	0,13	-0,15	0,20	0,16	0,13	-0,21

P<0,01\*\* e P<0,05\*

$$\text{C14 index: } 100 [(C14:1cis9)/(C14:1cis9 + C14:0)]$$

$$\text{C16 index: } 100 [(C16:1cis9)/(C16:1cis9 + C16:0)]$$

$$\text{C18 index 18: } 100 [(C18:1cis9)/(C18:1cis9 + C18:0)]$$

$$\text{Total dessaturase index: } 100 [(C14:1 + C16:1 + C18:1)/(C14:1 + C16:1 + C18:1 + C14:0 + C16:0 + C18:0)]$$

$$\text{Elongase: } 100 [(C18:0 + C18:1cis9)/(C16:0 + C16:1cis9 + C18:0 + C18:1cis9)]$$

Barton et al. (2011) observaram na gordura perirenal e subcutânea correlações positivas e não encontraram correlação no músculo entre a SCD1 e o índice C14, diferente do observado neste trabalho, para gordura intramuscular. Ainda, de acordo com o autor, as regiões onde se iniciam os depósitos de gordura no animal (gordura perirenal e subcutânea) apresentam tendência de sempre se correlacionarem de forma positiva e significativa, ou seja, em termos cronológicos a ação de dessaturases nessas regiões é mais acentuada e se inicia antes.

#### 4 CONCLUSÃO

O uso de grãos de soja ou gordura protegida, com ou sem monensina, mudou a expressão gênica do PPAR- $\alpha$  e de genes que codificam enzimas lipogênicas, sendo os principais a LPL, a FABP<sub>4</sub> e a SCD1.

O ácido araquidônico e  $\alpha$ -linolênico apresentaram o maior número de correlações com os genes estudados e, em sua maioria, estes ácidos graxos se correlacionam negativamente com os genes.

## REFERÊNCIAS

ARCHIBEQUE, S. L. et al. Fatty acid indices of stearoyl-CoA desaturase do not reflect actual stearoyl-CoA desaturase enzyme activities in adipose tissues of beef steers finished with corn, flaxseed, or sorghum based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 5, p. 1153-1166, May 2005.

BARTON, L. et al. Effect of sex and age on bovine muscle and adipose fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. **Meat Science**, Barking, v. 89, n. 4, p. 444-450, Dec. 2011.

BAUMAN, D. E. et al. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE, 3., 2003, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 2003. p. 175-189.

BELLINGER, L.; LILLEY, C.; LANGLEY-EVANS, S. Prenatal exposure to a maternal low- protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, n. 2, p. 513-520, Sept. 2004.

BIESALSKI, H. K. Meat as a component of a healthy diet: are there any risks or benefits if meat is avoided? **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 3, p. 509-524, 2005.

BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. **ExPASy**. Disponível em: <<http://www.expasy.ch>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

BIONAZ, M. et al. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR Research**, New York, v. 2013, n. 1, p. 1-28, Mar. 2013.

BIONAZ, M.; HERING, B. J.; LOOR, J. J. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient-gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR-alpha activation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 179-191, Jan. 2012.

CHUNG, K. Y. et al. Lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase gene expression and enzyme activity in adipose tissue of short- and long-fed Angus and Wagyu steers fed corn- or hay-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 380-387, Jan. 2007.

COSTA, A. S. et al. Expression of genes controlling fat deposition in two genetically diverse beef. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 118, p. 1-16, June 2013.

DANCE, L. J. E.; MATTHEWS, K. R.; DORAN, O. Effect of breed on fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase protein expression in the Semimembranosus muscle and subcutaneous adipose tissue of cattle. **Livestock Science**, New York, v. 125, n. 3, p. 291-297, Mar. 2009.

DERVISHI, E. et al. Effect of the feeding system on the fatty acid composition, expression of the  $\Delta 9$ -desaturase, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, gamma, and sterol regulatory element binding protein 1 genes in the semitendinosus muscle of light lambs of the Rasa Aragonesa breed. **BMC Veterinary Research**, London, v. 6, n. 40, p. 1-11, July 2010.

DORAN, O. et al. A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 95, n. 3, p. 609-617, Mar. 2006.

DUCKETT, S. K.; PRATT, S. L.; PAVAN, E. Corn oil or corn grain supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue: II., effects on subcutaneous fatty acid content and lipogenic gene expression. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 3, p. 1120-128, Mar. 2009.

DUPLUS, E.; GLORIAN, M.; FOREST, C. Fatty acid regulation of gene transcription. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 40, p. 30749-30752, Oct. 2000.

ELLIS, J. L. et al. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 2717-2726, Aug. 2012.

FELLNER, V.; SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. G. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 921-928, May 1997.

FLOWERS, M. T.; NTAMBI, J. M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 19, n. 3, p. 248-256, May 2008.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRENCH, P.; STANTON, C.; LAWLESS, F. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage or concentrate-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2849-2855, Nov. 2000.

GILBERT, C. D. et al. Carcass, sensory, and adipose tissue traits of brangus steers fed casein-formaldehyde-protected starch and/or canola lipid. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2457-2468, Oct. 2003.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 90, p. 420-426, 1978.

HAUSMAN, G. J. et al. The influence of thiazolidinediones on adipogenesis in vitro and in vivo: potential modifiers of intramuscular adipose tissue deposition in meat animals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 14, p. E236-E243, Apr. 2008.

HEBBACHI, A. M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency abolishes the response of lipogenic gene expression to re-feeding: restoration of the normal response by activation of liver X receptor alpha. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 8, p. 4866-4876, Feb. 2008.

HERDMANN, A. et al. Effect of dietary fatty acids on expression of lipogenic enzymes and fatty acid profile in tissues of bulls. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 755-762, Mar. 2010.

HILLER, B.; HERDMANN, A.; NUERNBERG, K. Dietary n-3 fatty acids significantly suppress lipogenesis in bovine muscle and adipose tissue: a functional genomics approach. **Lipids**, Champaign, v. 46, n. 7, p. 557-567, July 2011.

HOCQUETTE, J. F. et al. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 159-173, Jan. 2007.

KADEGOWDA, A. K. G. et al. Identification of internal control genes for quantitative polymerase chain reaction in mammary tissue of lactating cows receiving lipid supplements. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 5, p. 2007-2019, May 2009.

JACOBS, A. A. A. et al. Effects of feeding rapeseed oil, soybean oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 2, p. 874-887, Feb. 2011.

JENKINS, T. C. et al. Symposium: advances in ruminant lipid metabolism: lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, Sept. 1993.

JUMP, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 13, n. 2, p. 155-164, Apr. 2002.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2008.

JURIE, C. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein and mitochondrial enzyme activities in muscles as relevant indicators of marbling in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 10, p. 2660-2669, Oct. 2007.

LADEIRA, M. M. et al. Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. **Meat Science**, Barking, 2013. In press.

LEE, J. H. et al. Relationship between adipose maturity and fatty acid composition in various adipose tissues of Japanese Black, Holstein and Crossbred (F1) steers. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 82, n. 5, p. 689-697, Oct. 2011.

MA, J. et al. Short and long-term repeatability of fatty acid composition of human plasma phospholipids and cholesterol esters. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 62, n. 3, p. 572-578, Sept. 1995.

MALAU-ADULI, A. E. O. et al. A comparison of the fatty acid composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 48, n. 5, p. 715-722, Sept. 1997.



MUNDAY, M. R. et al. The short term regulation of hepatic acetyl-CoA carboxylase during starvation and re-feeding in the rat. **Biochemical Journal**, London, v. 280, n. 3, p. 733-739, Dec. 1991.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7<sup>th</sup> ed. Washington, 1996. 242 p.

NEVEL, C. J. van; DEMEYER, I. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 12, p. 2797-2806, Dec. 1995.

NTAMBI, J. M.; BENE, H. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Journal of Molecular Neuroscience**, Totowa, v. 16, n. 3, p. 273-278, June 2001.

NUERNBERG, K. et al. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 1, p. 63-74, May 2005.

OLIVEIRA, D. M. et al. Fatty acid profile and qualitative characteristics of meat from zebu steers fed with different oilseeds. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 2546-2555, Aug. 2011.

OR-RASHID, M. M. et al. Plasma fatty acid profile of gestating ewes supplemented with docosahexaenoic acid. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 89, n. 2, p. 138-138, Jan. 2009.

PAVAN, E.; DUCKETT, S. K. Corn oil supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue: II., effects on longissimus muscle and subcutaneous adipose fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase activity and expression. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 1731-1740, July 2007.

PELTIER, S. et al. Fatty acid profile of plasma and liver lipids in mice depleted in long-chain polyunsaturated (n-3) fatty acids. **International Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 559-563, Oct. 2008.

RENAVILLE, B. A. et al. Eicosapentaenoic acid and 3,10 dithia stearic acid inhibit the desaturation of trans-vaccenic acid into *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid through different pathways in Caco-2 and T84 cells. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 95, n. 4, p. 688-695, Apr. 2006.

SHIN, J. et al. Comparative analysis of fatty acid-binding protein 4 promoters: conservation of peroxisome proliferator-activated receptor binding sites. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 3923-3934, Dec. 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS user's guide:** statistics. Version 9.2. Cary, 2012. 373 p.

WANG, J. H. et al. Effect of monensin, fish oil or their combination on in vitro fermentation and conjugated linoleic acid (CLA) production by ruminal bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, n. 4, p. 341-349, 2005.

WANG, J. H. et al. Low protein diet up-regulate intramuscular lipogenic gene expression and down-regulate lipolytic gene expression in growth-finishing pigs. **Livestock Science**, New York, v. 148, n. 2, p. 119-128, Sept. 2012.

WARD, R. E. et al. Relationship between the expression of key lipogenic enzymes, fatty acid composition, and intramuscular fat content of Limousin and Aberdeen Angus cattle. **Livestock Science**, New York, v. 127, n. 1, p. 22-29, Jan. 2010.

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

WILLIAMSON, C. S.; FOSTER, R. K.; STANNER, S. A. Red meat in the diet. **Nutrition Bulletin**, Davis, v. 30, n. 4, p. 323-335, Dec. 2005.

WOLFRUM, C. et al. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, n. 5, p. 2323-2328, Feb. 2001.

XU, J. et al. Polynsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 13, p. 139-145, Mar. 2001.

ZACHUT, M. et al. Effects of increased supplementation of n-3 fatty acids to transition dairy cows on performance and fatty acid profile in plasma, adipose tissue, and milk fat. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 12, p. 5877-5889, Dec. 2010.

**CAPÍTULO 3 Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos de corte alimentados com grão de soja e caroço de algodão, suplementados ou não com vitamina E**

## RESUMO

Objetivou-se neste estudo analisar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* (LD) de bovinos alimentados com dietas, contendo grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E). Foram utilizados 28 tourinhos Red Norte, com idade média de 20 meses e peso vivo inicial médio de 339 kg, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado e em um arranjo fatorial 2 x 2. As dietas continham 20% de GS ou 24% de CA, 6,5% de extrato etéreo e a silagem de milho foi utilizada como volumoso. A suplementação diária de vitamina E para a metade dos animais alimentados com GS ou CA foi de 2.500UI/cabeça/dia. Os animais foram abatidos com peso médio de 455 kg ( $P>0,05$ ). 24h *post mortem*, amostras do músculo LD foram coletadas entre a 12ª e 13ª costelas e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Avaliaram-se as expressões dos genes: receptor ativador por peroxissomas  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), fator de transcrição de proteínas ligantes aos esteroides (SREBP-1c), estearoil CoA dessaturase (SCD1), acetil CoA carboxilase (ACC), lipoproteína lipase (LPL), proteína de ligação ao ácido graxo (FABP<sub>4</sub>) e glutathiona peroxidase (GPX1). A expressão gênica foi analisada utilizando a técnica de RT-qPCR sendo a quantificação relativa calculada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado, para analisar a normalidade dos dados e quando estes não apresentaram esta distribuição, realizou-se a transformação utilizando o PROC RANK do SAS 9.2. Posteriormente, os dados foram analisados no PROC GLM e no PROC CORR do SAS 9.2. Houve interação ( $P<0,05$ ) entre a oleaginosa e a vitamina E para os genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-1c, no entanto, fontes de ácidos graxos poli-insaturados apresentaram respostas inversas sobre a expressão destes genes, sendo os ácidos graxos  $\omega$ -3 potentes inibidores do segundo gene. Houve interação entre a oleaginosa e a vitamina E ( $P<0,05$ ) para o gene SCD1, entretanto, o gene foi mais expresso no tratamento com inclusão de caroço de algodão e ausência da vitamina E. Houve interação ( $P<0,05$ ) para o gene FABP<sub>4</sub> e não houve para o gene LPL, entretanto, nas dietas com inclusão de grão de soja, ambos foram mais expressos ( $P<0,05$ ). O gene SCD1 correlacionou-se de forma positiva apenas com os genes GPX1 e SREBP-1c. O ácido graxo linoleico correlacionou-se de forma negativa com o gene PPAR- $\alpha$  e de forma positiva ao gene SREBP-1c. Foi possível observar, também, que os ácidos graxos linoleico e oleico apresentaram correlações antagônicas para três genes: PPAR- $\alpha$ , ACC e FABP<sub>4</sub>. Em conclusão, a expressão gênica de genes envolvidos no metabolismo lipídico foi afetada pela oleaginosa e pela suplementação com vitamina E.

Palavras-chave: *Bos taurus*. Gordura intramuscular. Nutrigenômica. mRNA. Oleaginosa.

## ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the expression of genes involved in lipid metabolism in the *longissimus dorsi* (LD) muscle of beef cattle fed diets containing soybean grain (SB) or ground cottonseed (CS), with or without supplementation with vitamin E (E). Twenty eight Red Norte bulls, with an average age of 20 months and initial body weight of 339 kg were allotted in a completely randomized design using a 2 x 2 factorial arrangement. The diets contained 20% of SB or 24% of CS, 6.5% ether extract and corn silage was utilized as forage. Half of the animals fed with SB or CS was supplemented with 2,500 IU/head/day of vitamin E. The animals were slaughtered with an average BW of 455 kg ( $P>0.05$ ). At 24h *post-mortem*, samples of the *longissimus dorsi* muscle were collected between the 12 and 13th rib and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The evaluated genes were: peroxisome proliferator activator receptor  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), sterol regulatory element binding protein (SREBP-1c), stearoyl CoA desaturase (SCD1), acetyl CoA carboxylase (ACC), lipoprotein lipase (LPL), adipocyte-type fatty acid binding protein (FABP<sub>4</sub>) and glutathione peroxidase (GPX1). Gene expression was analyzed using the RT-qPCR technique, calculating the relative quantification using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . The Shapiro-Wilk test was used in order to verify data normality and, when the data did not show a normal distribution, they were transformed using the SAS 9.2PROC RANK. Posteriorly, data were analyzed using SAS 9.2 PROC GLM and PROC CORR. There was interaction ( $P<0.05$ ) between oilseed and vitamin E for genes PPAR- $\alpha$  and SREBP-1c. However, the sources of polyunsaturated fatty acids showed inverse relationship of the expression of these genes, being  $\omega$ -3 fatty acids potent inhibitors of the latter. There was interaction between oilseed and vitamin E ( $P<0.05$ ) for the SCD1 gene, however, the gene was more expressive in the treatment including cottonseed and no vitamin E. There was interaction ( $P<0.05$ ) for the FABP<sub>4</sub> gene but not for the LPL gene, however, in diets with inclusion of soybean grain, both were more expressive ( $P<0.05$ ). The SCD1 gene was positively correlated only with GPX1 and SREBP-1c genes. The linoleic fatty acid was negatively correlated with the PPAR- $\alpha$  gene and positively correlated with the SREBP-1c gene. We also observed that the linoleic and oleic fatty acids showed antagonistic correlations toward three genes: PPAR- $\alpha$ , ACC and FABP<sub>4</sub>. In conclusion, the gene expression of genes involved in lipid metabolism was affected by oilseed and by supplementation with vitamin E.

Key words: *Bos taurus*. Intramuscular fat. mRNA. Nutrigenomics. Oilseed.

## 1 INTRODUÇÃO

Ao analisar a fração lipídica dos produtos de origem animal, observa-se que a composição da gordura da carne de ruminantes é importante fonte de ácidos graxos benéficos à saúde humana, como os ácidos oleico e linoleico conjugado (C18:2 *cis*-9, *trans*-11; CLA) (FRENCH; STANTON; LAWLESS, 2000). Dessa forma, esta característica pode ser usada pela indústria da carne bovina para a promoção deste produto, pois certos consumidores estão conscientes das relações entre alimentação e saúde, o que pode impactar na demanda por alimentos que contenham componentes funcionais e que desempenham papel importante na melhoria da saúde e prevenção de doenças (SCOLLAN et al., 2006). Acerca disso, a manipulação do perfil de ácidos graxos na carne, com o intuito de aumentar a concentração, tanto de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), que podem diminuir as concentrações circulantes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SALTER; TARLING, 2007), ou ainda apresentarem outros benefícios metabólicos aos seres humanos, é um dos objetivos atuais das pesquisas com nutrição de bovinos de corte.

Concentrações elevadas de AGPI estão presentes no algodão e na soja, oleaginosas estas cultivadas em vários países, e que, em razão do elevado teor de ácido oleico e linoleico podem melhorar o perfil lipídico da carne bovina de animais submetidos à sua alimentação (MACHADO NETO, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; SHINGFIELD; BONNET; SCOLLAN, 2013). Todavia, há relativamente pouca informação sobre o efeito da adição de soja (WATERS et al., 2009) ou caroço de algodão (ARQUIBEQUE et al., 2005) na expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos em ruminantes. Ademais, os efeitos da suplementação com vitamina E, um antioxidante que pode manter as

características qualitativas da carne (CHEN et al., 2010), em conjunto com oleaginosas sobre a expressão desses genes, ainda, não foi relatado na literatura.

A interação dos nutrientes da dieta com os níveis de expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo sugere que a composição de ácidos graxos da carne pode ser controlada por fatores específicos. Segundo Clarke (2001) e Jump (2008), os efeitos são, ainda, mais acentuados com a suplementação de fontes lipídicas, principalmente fontes ricas em AGPI, que têm a capacidade de modular a transcrição de genes específicos. Nesse sentido, destaca-se o gene que codifica a enzima estearoil CoA dessaturase (SCD1), enzima importante na conversão do ácido vaccênico em CLA, e que apresenta menor expressão gênica à medida que o teor de AGPI aumenta no tecido muscular (HERDMANN et al., 2010; WATERS et al., 2009). Ainda, Juarez et al. (2010) mostraram que a vitamina E aumenta o teor de AGPI que escapa do rúmen, o que pode influenciar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo bovino, sendo os efeitos ainda desconhecidos. Além disso, o aumento no teor de AGPI, também, pode influenciar a vida de prateleira e os atributos sensoriais da carne (LEE et al., 2007) e a inclusão de vitamina E na dieta é alternativa que pode reduzir a oxidação dos AGPI (LEE et al., 2007; SCOLLAN et al., 2006), já que, de acordo com Jena, Chainy e Dandapat (2012), a expressão da glutathione peroxidase (GPX1) foi elevada em ratos suplementados com vitamina E. Isto indica que a suplementação com antioxidantes regula enzimas metabolizadoras de peróxidos, como a GPX1.

Outros estudos demonstraram (JUMP, 2008; PATON; NTAMBI, 2009) que os AGPI  $\omega$ -3 são capazes de coordenar a síntese e composição do tecido adiposo, por meio de fatores de transcrição e receptores nucleares e, até o momento, o número de trabalhos que avaliaram esta questão em ruminantes, ainda, é reduzido (BIONAZ et al., 2013; COSTA et al., 2013). Segundo dados da literatura, os AGPI podem suprimir a lipogênese inibindo o fator de



transcrição de proteínas ligantes aos esteroides (SREBP-1c) (SCHMITZ; ECKER, 2008; XU et al., 2002), e promoverem a oxidação de ácidos graxos por ligação e ativação do receptor ativado por peroxissomas  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) (BIONAZ et al., 2013).

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a expressão gênica do PPAR- $\alpha$ , SREBP-1c, GPX1 e de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos alimentados com dietas contendo grão de soja ou caroço de algodão, suplementados ou não com vitamina E. Além disso, objetivou-se estudar as correlações entre as diferentes expressões analisadas e o perfil de ácidos graxos na carne desses animais.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental, animais e dietas**

A pesquisa foi conduzida no setor de Bovinocultura de Corte e no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, ambos localizados na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Foram utilizados 28 tourinhos Red Norte, com idade inicial média de 20 meses e peso vivo inicial médio de 339 kg, em um delineamento inteiramente casualizado e arranjo fatorial 2 x 2, com 4 tratamentos e 7 repetições por tratamento. As dietas apresentavam a silagem de milho como volumoso e quatro diferentes tipos de concentrados foram utilizados, contendo grão de soja ou caroço de algodão moídos, como fontes de lipídeos, e a inclusão ou não de 2.500 UI de vitamina E (DL-alfa-tocoferol acetato, MCassab, São Paulo, Brasil) por dia. Portanto, cada tipo de dieta representou um determinado tratamento (Tabela 1). As dietas foram formuladas para atender as exigências de ganho de peso diário de 1,4 kg/dia, segundo o National Research Council - NRC (1996).

Tabela 1 Composição percentual de ingredientes, bromatológica e composição dos principais ácidos graxos das dietas experimentais: grão de soja sem vitamina E (GS), grão de soja + vitamina E (GSE), caroço de algodão sem vitamina E (CA) e caroço de algodão + vitamina E (CAE)

Ingredientes (%MS)	GS	GSE	CA	CAE
Silagem de Milho	40,0	40,0	40,0	40,0
Milho Integral	38,2	38,2	31,2	31,2
Farelo de Soja	-	-	3,0	3,0
Grão de Soja	20,0	20,0	-	-
Caroço de Algodão			24,0	24,0
Premix Mineral <sup>1</sup>	1,8	1,8	1,8	1,8
Vitamina E (UI)	-	2.500	-	2.500
<u>Nutrientes (%MS)</u>				
Matéria Seca	66,1	66,1	66,2	66,2
Proteína Bruta	12,9	12,9	12,7	12,7
Fibra em Detergente Neutro	27,0	27,0	36,0	36,0
Carboidrato não Fibroso	46,0	46,0	40,0	40,0
Extrato Etéreo	6,48	6,48	6,56	6,56
<u>Ácido Graxo (%MS)</u>				
Ácido mirístico	0,6	0,6	1,1	1,1
Ácido palmítico	17,3	17,3	23,3	23,3
Ácido esteárico	6,8	6,8	6,9	6,9
Ácido oleico	26,71	26,7	22,5	23,5
Ácido linoleico	44,5	44,5	42,3	42,3
Ácido linolênico	4,0	4,0	2,5	2,5

<sup>1</sup>Conteúdo de garantia por quilograma de produto é a seguinte: Ca, 170 g; Co, 15 mg; Cu, 396 mg; P, 31 g; I, 29 mg; Mg, 15 g; Mn, 515 mg; Se, 5,4 mg; Na, 155 g; Zn, 2,000 mg

A duração do experimento foi de 84 dias, precedido de um período de 28 dias para adaptação dos animais às dietas e instalações. Os animais foram confinados em baias coletivas, com 30 m<sup>2</sup> de área por animal e as dietas foram

fornecidas duas vezes ao dia, às 7h e 14h, na forma de ração total e ajustadas para manter as sobras em 5% do oferecido.

Os animais foram abatidos com peso vivo médio de 455 kg ( $P>0,05$ ), utilizando a técnica de concussão cerebral e secção da veia jugular, seguido de remoção do couro e evisceração. As carcaças foram identificadas, lavadas, divididas em duas metades, sendo estas pesadas individualmente e levadas à câmara fria, por aproximadamente 24 horas, à temperatura de 1°C. Após esse período, duas amostras foram extraídas do músculo *longissimus dorsi* (LD) entre a 12ª e 13ª costelas de cada animal. Para a coleta dos tecidos, todos os instrumentos utilizados foram esterilizados e as amostras de músculo colhidas foram lavadas com solução fisiológica de NaCl a 0,9%. A primeira amostra foi armazenada em sacos plásticos a uma temperatura de -20°C para posterior extração dos lipídeos e análise dos ácidos graxos, enquanto a segunda foi embrulhada em papel alumínio, congelada e transportada em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em *ultra-freezer* (-80°C).

## 2.2 Análises de ácidos graxos

A extração dos lipídeos do músculo foi realizada, de acordo com procedimentos estabelecidos por Folch, Less e Stanley (1957) e metilada segundo Hara e Radim (1978). As amostras transmetiladas foram analisadas em cromatógrafo a gás modelo Focus CG-Finnigan, com detector de ionização de chama, coluna capilar CP-Sil 88 (Varian), com 100 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e com espessura de 0,20 µm (Supelco, Bellefonte, PA). Foi utilizado o hidrogênio como gás de arraste, numa vazão de 1,8 mL/min. O programa de temperatura inicial do forno foi de 70°C, mantida por 4 min, elevação de 13°C/min até 175°C e mantida por 27 min, elevação de 4°C/min até 215°C e mantida por 9 min e, em seguida, aumentando 7°C/min até 230°C,

permanecendo por 5 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e a do detector 300°C.

A identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção com padrões de ácidos graxos de manteiga e a percentagem dos ácidos graxos foi obtida por meio do *software* Chromquest 4.1 (Thermo Electron, Italy).

As atividades das enzimas  $\Delta^9$  dessaturases e elongases foram determinadas, conforme descrito por Malau-Aduli et al. (1997), por meio de índices matemáticos. Os cálculos foram realizados da seguinte maneira:

$$\text{C14 index: } 100 [(C14:1cis9)/(C14:1cis9 + C14:0)]$$

$$\text{C16 index: } 100 [(C16:1cis9)/(C16:1cis9 + C16:0)]$$

$$\text{C18 index 18: } 100 [(C18:1cis9)/(C18:1cis9 + C18:0)]$$

$$\text{Total dessaturase index : } 100 [(C14:1 + C16:1 + C18:1)/(C14:1 + C16:1 + C18:1 + C14:0 + C16:0 + C18:0)]$$

$$\text{Elongase: } 100 [(C18:0 + C18:1cis9)/(C16:0 + C16:1cis9 + C18:0 + C18:1cis9)]$$

### 2.3 Análises de expressão gênica

O desenho dos primers alvos e de referência foi realizado, por meio de sequências cadastradas e publicadas no banco de dados público do *Genbank*, plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para a caracterização dos genes as ORFs (*Open Reading Frames*) das sequências selecionadas foram obtidas pela ferramenta *ORFinder* do NCBI e as sequências de proteínas codificadas obtidas a partir da ferramenta *translate*, encontrada no banco de proteínas ExPASy (BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL, 2013).

A sequência dos primers foi desenhada, utilizando o *software* Oligo Perfect™ Designer, considerando a sequência acessada no *Genbank*. Os primers para o tempo real (RT-qPCR) foram comercialmente sintetizados (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com suas sequências sendo apresentadas na Tabela 2.

Para a extração do RNA total as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de cadinho e pistilo. Do material macerado, 200 mg de tecido foram coletados, adicionados 1,2 mL de QIAzol (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) e misturados vigorosamente em vortex. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo, posteriormente, adicionados 200 µL de clorofórmio, agitadas e levadas à centrifuga por 15 minutos a 14.000 rpm à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionados mais 200 µL de clorofórmio para uma segunda lavagem. Novamente o sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionados 600 µL de isopropanol. As amostras foram mantidas por um período de 1 hora à temperatura de -20°C, em seguida, foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol a 75%, seguido de nova centrifugação por 8 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o etanol a 75% foi descartado, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água ultra pura. Após estes procedimentos as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

Tabela 2 Sequência dos primers (5' para 3') que foram usados na PCR quantitativa em tempo real

<b>Símbolo</b>	<b>Nome</b>	<b>Forward (F) e Reverse (R)</b>	<b>Número de Acesso</b>
PPAR- $\alpha$	Receptor ativado por peroxissomas $\alpha$	F CAATGGAGATGGTGGACACA R TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	NM_001034036.1
SREBP-1c	Fatores de transcrição de proteínas ligantes aos esteróides	F GAGCCACCCTTCAACGAA R TGTCTTCTATGTCGGTCAGCA	NM_001113302.1
SCD1	Estearoil CoA dessaturase	F TTATTCCGTTATGCCCTTGG R TTGTCATAAGGGCGGTATCC	NM_173959.4
ACC	Acetil CoA carboxilase	F TGAAGAAGCAATGGATGAACC R TTCAGACACGGAGCCAATAA	NM_174224.2
LPL	Lipoproteína lipase	F CTCAGGACTCCCGAAGACAC R GTTTTGCTGCTGTGGTTGAA	NM_001075120.1
FABP <sub>4</sub>	Proteína de ligação ao ácido graxo	F GGATGATAAGATGGTGCTGGA R ATCCCTTGGCTTATGCTCTCT	NM_174314.2
GPX1	Glutationa peroxidase	F GGAGATCCTGAATTGCCTGA R CCATTCACCTCGCACTTTTC	NM_174076.3
$\beta$ -actin	$\beta$ -actina	F GTCCACCTTCCAGCAGATGT R CAGTCCGCCTAGAAGCATT	BC142413.1
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	F CGACTTCAACAGCGACTC R TTGTCGTACCAGGAAATGAGC	NM_001034034.1

Todas as amostras de RNA foram tratadas com DNase DNA free (Ambion, Austin, TX, EUA), em uma reação contendo 0,1 volume do tampão DNase turbo 10X, 0,5 µL da enzima DNase turbo e água livre de DNase/RNase para completar o volume de 25 µL. Essa reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 2,5 µL do reagente de inativação da DNase e as amostras foram incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1,5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante transferido para novos tubos. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80°C.

Para a avaliação da integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UVITEC Fire Reader XS D-77Ls-20M para análise das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal (rRNA). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000) a 260 nm com o objetivo de determinar a quantidade (ng/µL) e qualidade (260/280 e 260/230) do RNA.

A síntese de cDNA foi feita com *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1 µg em um volume final de 10 µL. Após essa etapa, foi preparado um *mix* contendo 2 µL do tampão 10X da enzima, 2 µL do primer RT *Random Primers* 10X, 0,8 µL do *mix* dNTP (100 mM), 1 µL *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1 µg, foram acrescentados 10 µL desse *mix*. Os tubos foram submetidos ao termociclador MultiGene™ Gradient (Labnet), programado com três etapas: 10 minutos a 25°C para o anelamento dos primers, 2 horas a 37°C para ação da enzima e 5 minutos a 85°C para inativá-la. Após o processo, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.



Para a análise da expressão gênica quantitativa por RT-qPCR foi utilizado o modelo ABI PRISM 7500 *Real Time* PCR (Applied Biosystems), utilizando o sistema de detecção *SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o cDNA obtido a partir de RNA extraído do tecido muscular de bovinos. As condições térmicas de reação foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 minutos a 95°C e 1 minuto a 60°C e, finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa 7500 *Fast Software* (Versão 2.1). Para cada reação foi utilizado 1,0 µL de cDNA, 0,3 µL de cada primer (forward e reverse) e 5,0 µL de *Master Mix SYBR Green* para um volume final de 10,0 µL/amostra em uma placa de reação com 96 poços MicroAmp Optical (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os controles negativos e curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. Todo o experimento de RT-qPCR, para cada gene em estudo, foi conduzido, a partir de cDNAs diferentes, obtidos a partir de sete repetições biológicas, com três réplicas técnicas para cada uma, sendo os resultados normalizados usando  $C_{T_s}$  (Ciclo *Threshold*) obtidos pela expressão dos genes de referência  $\beta$ -actina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

O CT foi determinado pelo número de ciclos utilizando-se o método  $C_T$  comparativo. Como um dos requisitos necessários, para a utilização deste método, foi realizado um ensaio de validação para mostrar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referências são aproximadamente iguais (Tabela 3). Para isto foram realizadas curvas padrões para os genes em estudo nas seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Este procedimento permite a definição da concentração de cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 10 ng/µL. A concentração de cada primer foi de 1,5 µM.

Tabela 3 Amplicon e eficiência dos primers utilizados na PCR quantitativa em tempo real

Símbolo	Forward (F) e Reverse (R)	Amplicon (pb)	R <sup>2</sup>	Eficiência
PPAR- $\alpha$	F CAATGGAGATGGTGGACACA R TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	95	0,992	99,17
SREBP-1c	F GAGCCACCCTTCAACGAA R TGTCTTCTATGTCGGTCAGCA	88	0,985	94,61
SCD1	F TTATTCCGTTATGCCCTTGG R TTGTCATAAGGGCGGTATCC	83	0,981	95,79
ACC	F TGAAGAAGCAATGGATGAACC R TTCAGACACGGAGCCAATAA	88	0,994	96,63
LPL	F CTCAGGACTCCCGAAGACAC R GTTTTGCTGCTGTGGTTGAA	98	0,990	96,67
FABP <sub>4</sub>	F GATGATAAGATGGTGCTGGA R ATCCCTTGGCTTATGCTCTCT	73	0,994	92,60
GPX1	F GGAGATCCTGAATTGCCTGA R CCATTCACCTCGCACTTTTC	87	0,991	91,72
$\beta$ -actin	F GTCCACCTTCCAGCAGATGT R CAGTCCGCCTAGAAGCATTT	90	0,996	100,00
GAPDH	F CGACTTCAACAGCGACACTC R TTGTCGTACCAGGAAATGAGC	96	0,998	101,42

A normalização dos genes foi realizada utilizando-se a equação  $\Delta C_T = C_T$  (gene alvo) -  $C_T$  (gene referência). Para isso, a calibração foi determinada pela fórmula  $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (calibrador), em que o calibrador utilizado foi o da dieta que o gene apresentou a menor expressão.  $C_T$  do gene na dieta onde foi menos expresso. A avaliação da quantificação relativa foi realizada pela fórmula  $2^{-\Delta \Delta C_T}$ .

#### **2.4 Análises estatísticas**

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e, quando estes não apresentaram esta distribuição, realizou-se a transformação utilizando o PROC RANK do SAS 9.2 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2012). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi utilizado para determinar a diferença estatística entre as médias dos tratamentos, por meio do PROC GLM do SAS 9.2. Os coeficientes da correlação de Pearson foram calculados, usando o PROC CORR do SAS 9.2. Consideraram-se como significativos valores de  $P < 0,05$ . As correlações feitas neste trabalho foram realizadas com o perfil de ácidos graxos publicado por Machado Neto (2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão gênica do PPAR- $\alpha$  foi maior no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja (Figura 1). Por outro lado, o gene SREBP-1c apresentou maior expressão no músculo dos animais alimentados com caroço de algodão. Além disso, a suplementação com vitamina E aumentou a expressão gênica do PPAR- $\alpha$  apenas quando se utilizou a dieta com caroço de algodão. Em relação ao gene SREBP-1c, a vitamina E reduziu sua expressão com esta dieta, mas teve efeito contrário quando a dieta utilizada foi o grão de soja. Em alguns estudos têm-se demonstrado que a adição de fontes ricas em AGPI promove a oxidação de ácidos graxos por sua ligação e ativação associada ao PPAR- $\alpha$  (PAWAR; JUMP 2003; SCHMITZ; ECKER, 2008). Por outro lado, os AGPI reduzem a lipogênese inibindo o SREBP-1c (SCHMITZ; ECKER, 2008; XU et al., 2002), o que também explica os resultados encontrados neste estudo. O ácido oleico, também, pode aumentar a expressão do gene PPAR- $\alpha$  (FANG; KANG; WONG, 2010), o que pode estar associado à sua maior concentração no grão de soja comparativamente ao caroço de algodão (26,71 vs 22,46%; respectivamente).

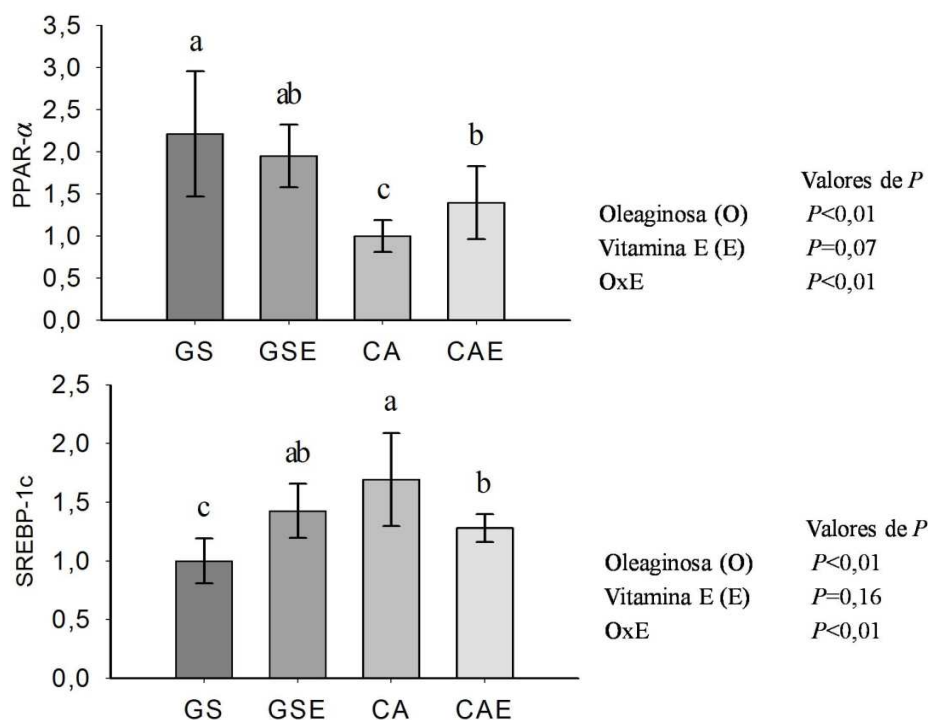


Figura 1 Expressão relativa dos genes PPAR- $\alpha$  e SREBP-1c no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E)

Nota: Letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

Todavia, a maior expressão do gene SREBP-1c na dieta com caroço de algodão pode estar associada à maior concentração de ácidos graxos  $\omega$ -6 no músculo dos animais alimentados com esta oleaginosa, em comparação com o grão de soja (16,9 vs 13,0%, respectivamente;  $P = 0,05$ ), já que, de acordo com Schmitz e Ecker (2008), os AGPI  $\omega$ -6 são os inibidores menos potentes da SREBP-1c, comparativamente aos AGPI  $\omega$ -3. Além disso, observou-se correlação positiva do gene SREBP-1c com os ácidos graxos  $\omega$ -6, com destaque para o ácido linoleico (Tabela 5). Somado a isso, os animais alimentados com

caroço de algodão apresentaram o menor teor do ácido graxo linolênico no músculo LD ( $\omega$ -3) (0,56 vs 0,29%;  $P < 0,05$ ), o que pode ter estimulado a expressão deste gene neste tratamento.

De acordo com Juarez et al. (2010), a vitamina E reduz a lipólise e a biohidrogenação o que pode aumentar as concentrações de ácidos graxos insaturados (AGI) que chegam ao intestino, o que afetaria diretamente a resposta dos genes no músculo LD dos animais e explicaria os efeitos positivos dessa vitamina sobre a expressão gênica do PPAR- $\alpha$  nos animais alimentados com caroço de algodão.

O gene SCD1 apresentou expressão semelhante ao SREBP-1c, sendo mais expresso no músculo LD dos animais alimentados com caroço de algodão sem vitamina E (Figura 2). De acordo com Waters et al. (2009), o gene SREBP-1c é o principal responsável pela variação na expressão do gene SCD1, o que também pode ser observado na Tabela 4, em que ambos apresentaram correlação positiva. Como o fator de transcrição SREBP-1c regula o gene SCD1, sugere-se que o efeito da dieta com alto teor de AGPI sobre a expressão do gene SCD1 é controlada pela menor expressão do SREBP-1c. Além disso, existe evidência a partir do estudo corrente que ácidos graxos da série  $\omega$ -6 (linoleico) são ativadores do gene SCD1 (Tabela 5).

O grão de soja rico em AGPI inibiu a expressão do gene SCD1, possivelmente fatores associados à biohidrogenação incompleta que ocorre no rúmen foram intensificados com a participação desta oleaginosa na composição da dieta, somado a isto, a forma triturada destes ingredientes fornecidos na dieta pode ter influenciado ainda mais a biohidrogenação, o que foi observado por Oliveira et al. (2011). O aumento destes AGPI no tecido pode inibir a ação da SCD1 de acordo com relatos anteriores (HERDMANN et al., 2010; PAVAN; DUCKETT, 2007).

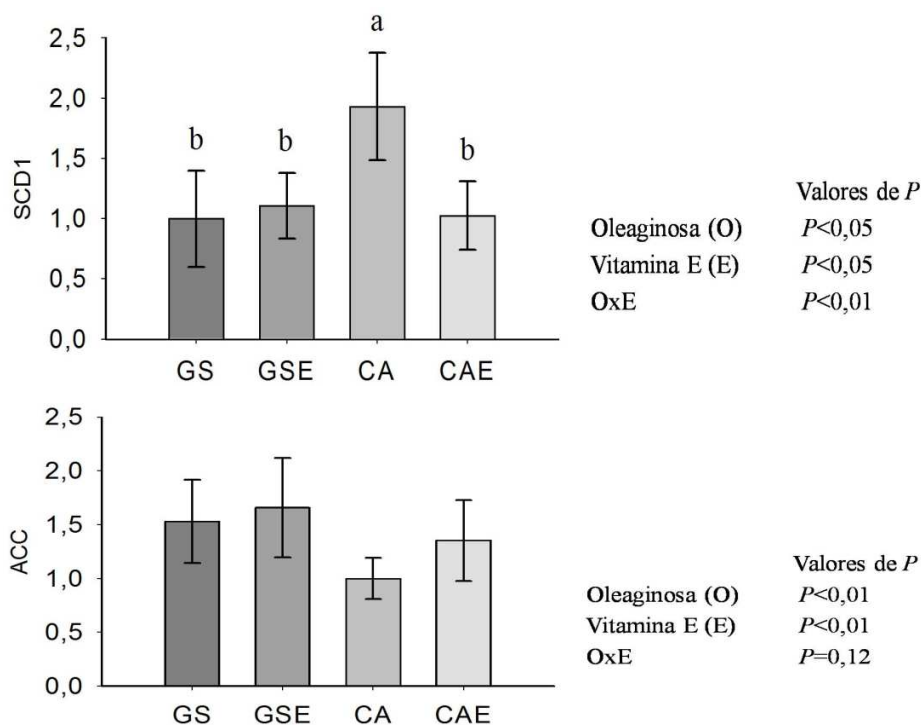


Figura 2 Expressão relativa dos genes SCD1 e ACC no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E)

Nota: Letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

A maior expressão da SCD1 nas dietas com caroço de algodão sem vitamina E poderia ir a contra-mão de trabalhos anteriores, que verificaram menor atividade da enzima SCD1 em função da presença do ácido estercúlico no caroço de algodão (YANG; LARSEN; SMITH, 1999). Todavia, Gomez et al. (2003) e Kadegowda et al. (2013) mostraram que o ácido estercúlico inibe diretamente a atividade da enzima SCD1 sem afetar a expressão do gene responsável por sua codificação, o que foi comprovado pelo menor teor de CLA no músculo LD dos animais que receberam o caroço de algodão na composição

de sua dieta, em relação ao grão de soja (0,34 vs 0,43%,  $P < 0,05$ ; respectivamente). Portanto, a maior síntese de RNAm para a produção de SCD1 na dieta com caroço de algodão não foi suficiente para compensar os efeitos negativos do ácido estercúlico presente nesta oleaginosa.

É importante ressaltar que, diferente de trabalhos anteriores que avaliaram o caroço de algodão (ARQUIBEQUE et al., 2005) ou a soja (WATERS et al., 2009), neste estudo foi realizada a análise destas dietas nas mesmas condições experimentais. Esses fatores levam à conclusão de que o maior teor de AGPI no grão de soja, em comparação com o caroço de algodão (57,3 vs 46,6%, respectivamente) pode ter sido o principal responsável pela inibição da expressão gênica da SCD1.

Em relação à vitamina E, verifica-se que apenas na dieta com caroço de algodão este aditivo influenciou, negativamente, a expressão da SCD1, o que pode ser explicado pelo efeito inibidor da vitamina E sobre a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados no rúmen (JUAREZ et al., 2010; POTTIER et al., 2006), que favoreceria a maior absorção de AGPI. Além disso, Chen et al. (2010) mostraram que a suplementação com óleo de soja ou vitamina E podem diminuir as concentrações de ácido graxo esteárico (C18:0), um dos principais substratos ativadores da SCD1.



Tabela 4 Coeficientes da correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* em bovinos

Genes	ACC	GPX1	FABP <sub>4</sub>	LPL	SCD1	SREB P-1c
PPAR- $\alpha$	<b>0,64***</b>	<b>0,48**</b>	<b>0,38*</b>	<b>0,57**</b>	-0,30	<b>-0,41*</b>
SREBP-1c	-0,18	-0,29	<b>-0,63***</b>	-0,19	<b>0,67***</b>	
SCD1	<b>-0,38*</b>	<b>0,55**</b>	<b>-0,42*</b>	<b>-0,53**</b>		
LPL	<b>0,63***</b>	<b>0,54**</b>	0,09			
FABP <sub>4</sub>	<b>0,43*</b>	0,32				
GPX1	<b>0,46*</b>					

P<0,01\*\*\*, P<0,01\*\* e P<0,05\*

A quantidade de mRNA da acetil CoA carboxilase (ACC) foi menor no músculo dos animais alimentados com as dietas, contendo caroço de algodão (Figura 2), em comparação ao músculo dos animais que receberam grão de soja na composição de suas dietas, o que pode ser explicado pelas maiores concentrações de ácido mirístico (0,6 vs 1,1%) e ácido palmítico (17,3 vs 23,3%) na dieta total onde os animais foram alimentados com caroço de algodão. Dessa forma, a síntese *de novo* estaria sendo inibida pela maior presença de seus produtos finais no tecido. A menor utilização da síntese *de novo* para produção de ácido palmítico pode gerar economia de energia pelo animal, caracterizando-se em vantagem fisiológica.

O uso de vitamina E fez com que o gene ACC fosse mais expresso, independente da fonte de lipídeo utilizada. Em trabalho realizado por Chen et al. (2008), a suplementação de vitamina E reduziu as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta e média depositados no tecido muscular de ruminantes, o que poderia, portanto, potencializar a expressão do gene ACC.

A expressão gênica da lipoproteína lipase (LPL) foi maior no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja, em relação aos animais que receberam o caroço de algodão, independente do uso ou não de vitamina E. Além disso, o uso de vitamina E fez com que o gene da LPL fosse mais expresso, independente da fonte de lipídeo utilizada (Figura 3), semelhante ao que ocorreu com o gene ACC.

A maior quantidade de ácidos graxos com 18 carbonos no grão de soja, comparativamente ao caroço de algodão, pode ter sido responsável pela maior expressão da LPL no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja, além disso, Wang, Kuksis e Manganaro (1982) suportam esta afirmação ao avaliar o grau de especificidade em ácidos graxos com 18 carbonos. Além do mais, de acordo com Juarez et al. (2010), a vitamina E pode influenciar as rotas da biohidrogenação ruminal de AGPI, aumentando as concentrações de ácidos graxos com 18 carbonos da série  $\omega$ -3, o que resultaria em maior expressão do gene LPL quando se utilizou este aditivo.

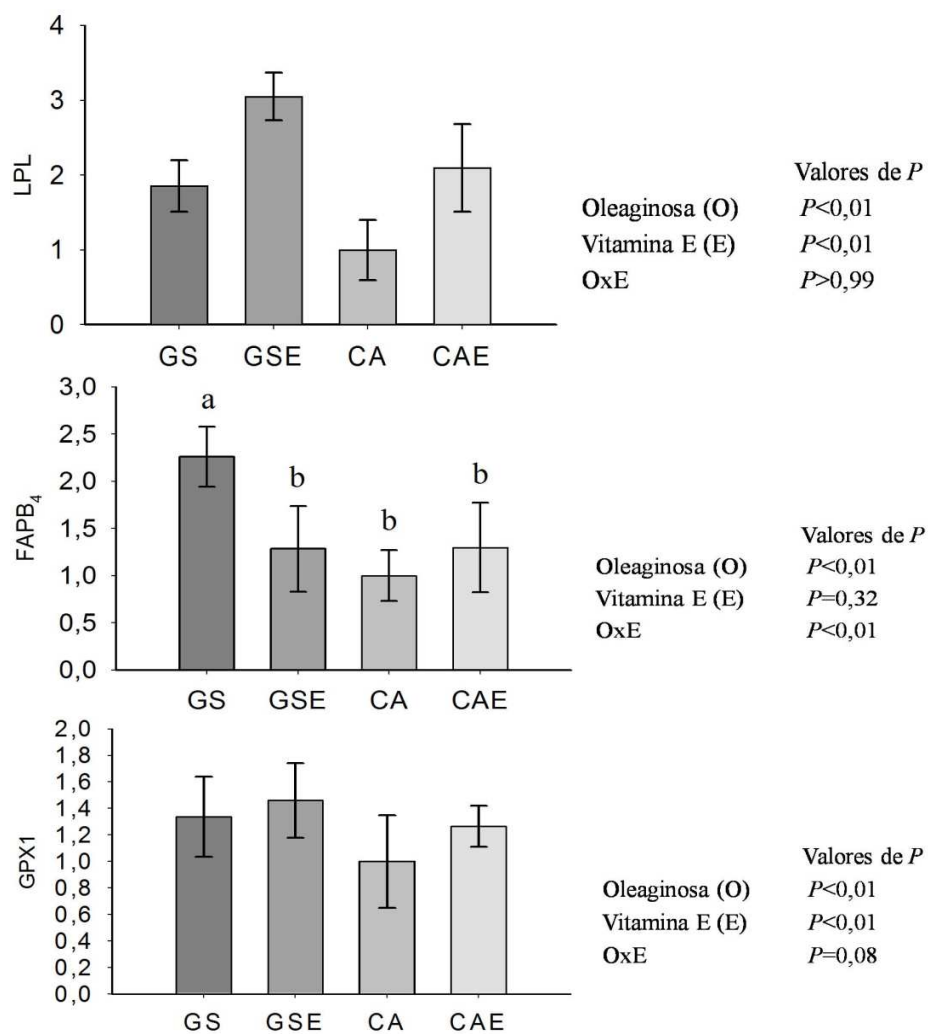


Figura 3 Expressão relativa dos genes LPL, FABP<sub>4</sub> e GPX1 no músculo *longissimus dorsi* de bovinos alimentados com grão de soja (GS) ou caroço de algodão (CA), suplementados ou não com vitamina E (E)

Nota: Letras diferentes no mesmo gráfico diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

A expressão do FABP<sub>4</sub> foi maior no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja sem vitamina E. O gene FABP<sub>4</sub> parece não responder ao aumento de ácido graxo  $\omega$ -6 ocorrido no músculo LD dos animais alimentados com as dietas, contendo caroço de algodão, em comparação aos que receberam a soja grão na composição de sua dieta (16,9 vs 13,0 %,  $P=0,05$ ; respectivamente) onde o gene foi menos expresso. Já o ácido oleico parece ser um potente ativador deste gene já que apresentou concentração elevada no músculo LD dos animais alimentados com grão de soja em comparação ao caroço de algodão (33,45 vs 28,05;  $P<0,05$ , respectivamente), além disso, a sua correlação foi positiva com o gene FABP<sub>4</sub> (Tabela 5).

Ademais, os efeitos sobre a expressão da LPL e FABP<sub>4</sub> podem estar associados diretamente ao PPAR- $\alpha$  (Tabela 4), o que justifica a maior expressão no músculo LD dos animais que receberam o grão de soja na composição da dieta. Tal fato foi observado por Wang et al. (2012), ao perceber que o gene LPL está envolvido na via de sinalização do PPAR- $\alpha$ . Em trabalhos realizados por Shin et al. (2009) e Zhao et al. (2009), a análise comparativa dos promotores da FABP<sub>4</sub> em mamíferos revelou que existem dois sítios de ligação reservados ao PPAR- $\alpha$  em humanos, ratos, suínos, cães e bovinos e que estes são seus ativadores de transcrição.

A expressão gênica da GPX1 foi maior no músculo LD dos animais alimentados com as dietas, contendo grão de soja, em relação aos animais alimentados com caroço de algodão. Essa menor expressão pode estar associada ao teor de AGPI presente no caroço de algodão, comparativamente à composição no grão de soja (46,6 vs 57,3%, respectivamente). O aumento da expressão gênica da GPX1 indica maior nível de oxidação celular presente no tecido, sendo o principal determinante a sua composição em AGPI. Era esperado que a inclusão de vitamina E potencializasse o efeito antioxidante da GPX1, o que aumentaria a eliminação dos radicais livres, conferindo maior efeito protetor

sobre a célula. Essa hipótese é confirmada por Jena et al. (2012), que observaram que a atividade da GPX1 foi elevada em ratos suplementados com vitamina E. Isto indica que a suplementação com antioxidantes regula enzimas metabolizadoras de peróxidos, como a glutathione peroxidase.

Outro fato interessante associado a este trabalho é a correlação positiva entre os genes GPX1 e PPAR- $\alpha$  (Tabela 4), pois, alguns estudos têm demonstrado que a adição de fontes ricas em AGPI aumenta a oxidação destes por meio de sua ligação e ativação associada ao gene PPAR- $\alpha$  (SCHMITZ; ECKER, 2008). Essas interações são potencializadas, principalmente, quando o ligante é o ácido linoleico (KERSTEN et al., 1999; STAELS et al., 1998). Em geral, a ativação do PPAR- $\alpha$  leva à indução de vários genes que codificam proteínas envolvidas na oxidação e no transporte de lipídeos (HUANG et al., 2013).

O ácido graxo linoleico correlacionou-se de forma negativa com o gene PPAR- $\alpha$  e de forma positiva ao gene SREBP-1c (Tabela 5). Além disso, outras correlações entre este ácido graxo e os genes SCD1, ACC e FABP<sub>4</sub> também foram verificadas no músculo LD de bovinos, demonstrando que, junto com o ácido oleico, estes ácidos graxos apresentaram maior influência neste estudo sobre os genes envolvidos no metabolismo lipídico. É possível observar, também, que estes dois ácidos graxos apresentaram correlações antagônicas para três genes: PPAR- $\alpha$ , ACC e FABP<sub>4</sub>.

Podia-se esperar que o gene SCD1 se correlacionasse com o ácido oleico, que compõe a maior parte dos AGMI presentes na carne, ou com o CLA, já que boa parte deste ácido graxo nos tecidos é obtida a partir do ácido vaccênico (C18:1 *trans*-11) pela ação da enzima SCD1. No entanto, a suplementação lipídica pode reduzir esta reação, pois, alguns AGPI, incluindo o CLA, são considerados inibidores da SCD1, em virtude do mecanismo de regulação sobre a expressão do gene responsável pela sua codificação (YANG;

LARSEN; SMITH, 1999). Trabalhos com outras espécies mostraram que o  $\alpha$ -linolênico e o ácido eicosapentaenóico (EPA) em ratos (BELLINGER; LILLEY; LANGLEY-EVANS, 2004) e humanos (RENAVILLE et al., 2006) são os principais inibidores da atividade da SCD1. Entretanto, neste estudo não foi encontrada correlação entre o ácido linolênico e a SCD1, mas, sim, correlação positiva entre o ácido linoleico e este gene. Portanto, esses resultados apresentam a hipótese de que nem todos os AGPI são inibidores da SCD1. De acordo com Dervishi et al. (2010), o efeito regulatório de AGPI, pode ser em razão da possível existência de um mecanismo regulador pós-transcricional sobre o gene SCD1.

A composição de ácidos graxos no músculo LD é dependente da ação da enzima SCD1 sobre o ácido esteárico e palmítico, que refletirá sobre as concentrações de seus respectivos produtos, o ácido oleico e o ácido palmitoleico. No entanto, a análise de correlação de Pearson entre os produtos da enzima e a expressão do gene responsável por sua codificação não foram significativa.

Tabela 5 Coeficientes da correlação de Pearson entre o perfil de ácidos graxos e a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* em bovinos

Perfil lipídico		Genes						
		PPAR- $\alpha$	SREBP-1c	SCD1	ACC	LPL	FABP <sub>4</sub>	GPX1
Láurico	C12:0	-0,04	0,01	0,26	-0,03	-0,27	0,26	0,15
Mirístico	C14:0	-0,02	-0,18	<b>-0,38*</b>	0,23	0,04	0,22	0,18
Miristoleico	C14:1 c9	0,17	0,01	-0,18	0,22	0,11	0,22	0,23
Pentadecanoico	C15:0	-0,22	-0,04	-0,10	-0,02	-0,13	-0,02	0,03
Palmitico	C16:0	-0,05	0,21	0,01	0,05	0,04	0,05	0,24
Palmitoleico	C16:1 c9	0,31	-0,16	-0,21	<b>0,41*</b>	0,20	0,32	<b>0,45*</b>
Margárico	C17:0	-0,20	-0,17	-0,03	-0,16	-0,20	-0,16	-0,19
Esteáric	C18:0	-0,27	0,02	0,15	<b>-0,39*</b>	-0,25	-0,14	-0,33
Oleico	C18:1 c9	<b>0,46*</b>	-0,30	-0,28	<b>0,45*</b>	0,17	<b>0,50**</b>	0,29
CLA	C18:2 c9-	0,32	-0,03	0,01	0,33	0,10	0,27	0,29
Linoleico	C18:2 c9-	<b>-0,38*</b>	<b>0,38*</b>	<b>0,39*</b>	<b>-0,38*</b>	-0,05	<b>-0,51**</b>	-0,21
$\alpha$ -Linolênico	C18:3 $\omega$ 3	<b>0,55**</b>	-0,30	-0,22	0,34	<b>0,52**</b>	0,21	0,33
Araquidônico	C20:4 $\omega$ 6	-0,07	0,21	0,26	-0,22	0,07	<b>-0,47*</b>	-0,06
$\Sigma$ Saturados		-0,30	0,19	-0,04	-0,19	-0,27	0,09	-0,21

“Tabela 5, conclusão”

Perfil lipídico	Genes						
	PPAR- $\alpha$	SREBP-1c	SCD1	ACC	LPL	FABP <sub>4</sub>	GPX1
$\Sigma$ Monoinsaturados	<b>0,44*</b>	-0,27	-0,28	<b>0,47*</b>	0,16	<b>0,50**</b>	<b>0,38*</b>
$\Sigma$ Poli-insaturados	-0,20	0,23	<b>0,39*</b>	-0,30	0,01	<b>-0,49**</b>	-0,15
$\Sigma$ Ômega-3	0,30	-0,05	0,08	0,10	0,30	-0,14	0,16
$\Sigma$ Ômega-6	-0,24	<b>0,38*</b>	<b>0,40*</b>	<b>-0,38*</b>	-0,02	<b>-0,51**</b>	-0,18

P<0,01\*\* e P<0,05\*



A síntese de mRNA do gene que codifica a FABP<sub>4</sub> apresentou correlação positiva com os ácidos graxos monoinsaturados e o ácido oleico, mas se correlacionou negativamente com os AGPI da série  $\omega$ -6. De acordo com Costa et al. (2013), maior resposta da FABP<sub>4</sub> seria esperado no tecido adiposo da gordura subcutânea pela maior adipogênese apresentada neste tecido, o que justificam as correlações negativas apresentadas neste estudo. O teor de ácidos graxos  $\omega$ -6, também, apresentou correlação, mas positiva, com os genes SCD1 e SREBP-1c, em decorrência de efeito significativo e positivo do ácido linoleico.

Quanto à afinidade e à potência da ação de diferentes tipos de AGPI  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 sobre os receptores nucleares e fatores de transcrição, observa-se que existe grande variação, o que contribui para os diferentes efeitos exercidos por ácidos graxos destes dois grupos. Em geral, tanto ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 ativam as três isoformas de PPAR, mas a afinidade dos diferentes ácidos graxos com cada receptor apresenta variação (JUMP, 2008). Entretanto, o que pode levar a correlações não significativas, como observado para o ácido araquidônico, e até mesmo correlações negativas, como encontrado para o ácido linoleico.

Todas as isoformas do gene PPAR avaliadas em não-ruminantes, principalmente suínos, ativam ácidos graxos saturados de cadeia longa, todavia, respostas positivas já foram observadas para os AGPI linoleico, linolênico e araquidônico (BIONAZ et al., 2013). Em geral, é seguro concluir que, nas espécies de não-ruminantes estudadas até o momento, o PPAR- $\alpha$  apresenta maior afinidade a ácidos graxos insaturados comparativamente aos saturados. No entanto, neste estudo com bovinos de corte, observa-se que os ácidos graxos saturados de cadeia longa não apresentaram nenhum tipo de correlação com o PPAR- $\alpha$  (Tabela 5).

Dietas ricas em AGPI tendem a inibir a síntese *de novo* em ruminantes (HILLER; HERDMANN; NUERNBERG, 2011; SMITH et al., 2009;

UNDERWOOD et al., 2007), em consequência de reduções na ação da enzima ACC, o que está em acordo com a correlação negativa entre o ácido linoleico e que reflete na falta de correlação com o ácido palmítico, principal produto deste processo metabólico. Encontrou-se, também, correlação negativa entre o ácido esteárico e o gene ACC, o que demonstra que, além do número de duplas ligações, o tamanho da cadeia dos ácidos graxos, também, pode ter influência sobre a expressão deste gene.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, o metabolismo energético dos animais deste estudo pode ter sido menor, o que poderia ter refletido em menor teor de gordura intramuscular. Um dos fatores associados a este mecanismo pode ser a correlação negativa do gene FABP<sub>4</sub> com a concentração de AGPI. Além do mais, o comportamento do gene FABP<sub>4</sub> no tecido muscular pode estar associado à falta de resposta destes mesmos ácidos graxos com a expressão gênica da LPL, onde a maior quantidade de triglicérides circulantes resulta em maior atividade da LPL (HOCQUETTE et al., 2001) e, conseqüentemente, correlacionaria positivamente com o gene FABP<sub>4</sub>, o que não foi observado neste estudo. A única correlação observada para o mRNA da LPL foi com o ácido linolênico. Estes resultados, segundo Wang, Kuksis e Manganaro (1982), estão associados à especificidade posicional da LPL na liberação de ácidos graxos em humanos (18:1> 18:3> 18:2> 14:0> 16:0> 18:00).

A correlação entre a expressão do gene SCD1 e concentração de AGPI foi positiva, diferente de relatos onde o aumento de AGPI presente no tecido inibe a expressão deste gene (HERDMANN et al., 2010; PAVAN; DUCKETT, 2007). Entretanto, esta correlação positiva se deve apenas à concentração do ácido linoleico, o que aponta para um mecanismo de regulação específico associado a este ácido graxo. Além disto, mudanças na expressão do gene SCD1, muitas vezes, estão associadas ao teor e concentração de AGMI no tecido

muscular, no entanto, a análise de correlação não conseguiu estabelecer uma associação significativa entre ambos neste trabalho.

Alguns autores determinam a atividade enzimática das dessaturases no tecido muscular por índices que são calculados a partir de dados da composição de ácidos graxos, de modo a explicar a variabilidade observada na sua composição (MALAU-ADULI et al., 1997). Todavia, não houve correlação ( $P > 0,05$ ) do índice C14 com os genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo LD, enquanto o índice C16 se correlacionou com os genes PPAR- $\alpha$ , ACC, FABP<sub>4</sub> e GPX1 e o índice C18 com os genes PPAR- $\alpha$ , ACC e GPX1, já a elongase não se correlacionou com nenhum gene estudado (Tabela 6). A correlação positiva entre o índice de dessaturação total e a expressão dos genes PPAR- $\alpha$ , ACC, FABP<sub>4</sub>, GPX1 está associado à correlação positiva apresentada entre estes na Tabela 5, já que o cálculo do índice leva em consideração o valor específico de AGMI de 16 ou 18 carbonos.

Tabela 6 Coeficientes da correlação de Pearson dos índices de dessaturação e da elongase com a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo

	PPAR- $\alpha$	SREBP-1c	SCD1	ACC	LPL	FABP <sub>4</sub>	GPX1
C14 dessaturase index	0,17	0,05	-0,03	0,13	0,09	0,13	0,15
C16 dessaturase index	<b>0,39*</b>	-0,19	-0,32	<b>0,42*</b>	0,28	0,27	<b>0,40*</b>
C18 dessaturase index	<b>0,45*</b>	-0,25	-0,33	<b>0,51**</b>	0,26	<b>0,41*</b>	<b>0,47*</b>
Total dessaturase index	<b>0,37*</b>	-0,32	-0,25	<b>0,38*</b>	0,14	<b>0,45*</b>	<b>0,45*</b>
Elongase	0,33	-0,27	0,01	0,07	0,10	0,38	0,01

P<0,01\*\* e P<0,05\*

$$\text{C14 index: } 100 \left[ \frac{\text{C14:1cis9}}{\text{C14:1cis9} + \text{C14:0}} \right]$$

$$\text{C16 index: } 100 \left[ \frac{\text{C16:1cis9}}{\text{C16:1cis9} + \text{C16:0}} \right]$$

$$\text{C18 index 18: } 100 \left[ \frac{\text{C18:1cis9}}{\text{C18:1cis9} + \text{C18:0}} \right]$$

Total dessaturase index :  $100 [(C14:1 + C16:1 + C18:1)/(C14:1 + C16:1 + C18:1 + C14:0 + C16:0 + C18:0)]$

Elongase:  $100 [(C18:0 + C18:1cis9)/(C16:0 + C16:1cis9 + C18:0 + C18:1cis9)]$

As correlações negativas não foram significativas, no entanto, respostas semelhantes observadas para os genes SREBP-1c e SCD1 comprovam a existência de mecanismos associativos entre estes e, um possível parâmetro a ser utilizado na avaliação de índices de dessaturação futuros. O mesmo não ocorreu para o gene PPAR- $\alpha$ .

#### 4 CONCLUSÃO

O caroço de algodão aumentou a expressão do gene que codifica a enzima SCD1. Já os genes ACC, LPL e FABP<sub>4</sub> foram mais expressos no músculo LD dos animais que receberam o grão de soja na composição da dieta, em virtude do maior teor de AGPI deste ingrediente. Além disto, os AGPI podem suprimir a lipogênese inibindo o SREBP-1c enquanto que promovem a oxidação de ácidos graxos por meio de ligação e ativação do PPAR- $\alpha$ . Já a suplementação de vitamina E, associada às fontes de oleaginosas, alterou a expressão dos genes PPAR- $\alpha$ , SREBP-1c, SCD1 e FABP<sub>4</sub>.

O ácido graxo linoleico e oleico apresentaram o maior número de correlações com os genes estudados e o ácido oleico apresentou apenas correlações positivas.

## REFERÊNCIAS

ARCHIBEQUE, S. L. et al. Fatty acid indices of stearoyl-CoA desaturase do not reflect actual stearoyl-CoA desaturase enzyme activities in adipose tissues of beef steers finished with corn, flaxseed, or sorghum based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 5, p. 1153-1166, May 2005.

BELLINGER, L.; LILLEY, C.; LANGLEY-EVANS, S. Prenatal exposure to a maternal low- protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 513-520, Sept. 2004.

BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. **ExPASy**. Disponível em: <<http://www.expasy.ch>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

BIONAZ, M. et al. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. **PPAR Research**, New York, v. 2013, n. 1, p. 1-28, Mar. 2013.

CHEN, X. J. et al. Effects of dietary corn oil and vitamin E supplementation on fatty acid profiles and expression of acetyl CoA carboxylase and stearoyl-CoA desaturase gene in Hu sheep. **Animal Science Journal**, Edinburgh, v. 81, n. 2, p. 165-171, Apr. 2010.

CHEN, X. J. et al. Effects of supplemental soybean oil and vitamin E on carcass quality and fatty acid profiles of meat in Huzhou lamb. **Animal Science**, Edinburgh, v. 58, n. 2, p. 129-135, Apr. 2008.

CLARKE, S. D. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis: I., molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 281, n. 4, p. G865-G869, Oct. 2001.

COSTA, A. S. et al. Expression of genes controlling fat deposition in two genetically diverse beef. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 118, p. 1-16, June 2013.

DERVISHI, E. et al. Effect of the feeding system on the fatty acid composition, expression of the  $\Delta 9$ -desaturase, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, gamma, and sterol regulatory element binding protein 1 genes in the semitendinous muscle of light lambs of the Rasa Aragonesa breed. **BMC Veterinary Research**, London, v. 6, n. 40, p. 1-11, July 2010.

FANG, F.; KANG, Z.; WONG, C. Vitamin E tocotrienols improve insulin sensitivity through activating peroxisome proliferator-activated receptors. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 54, n. 3, p. 345-352, Mar. 2010.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRENCH, P.; STANTON, C.; LAWLESS, F. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage or concentrate-based diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2849-2855, Nov. 2000.

GOMEZ, E. F. et al. Effects of sterculic acid on stearoyl-CoA desaturase in differentiating 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 2, n. 2, p. 316-326, Jan. 2003.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 90, p. 420-426, 1978.

HERDMANN, A. et al. Effect of dietary fatty acids on expression of lipogenic enzymes and fatty acid profile in tissues of bulls. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 755-762, May 2010.

HILLER, B.; HERDMANN, A.; NUERNBERG, K. Dietary n-3 fatty acids significantly suppress lipogenesis in bovine muscle and adipose tissue: a functional genomics approach. **Lipids**, Champaign, v. 46, n. 7, p. 557-567, July 2011.

HOCQUETTE, J. F. et al. Weaning affects lipoprotein lipase activity and gene expression in adipose tissues and in masseter but not in other muscles of the calf. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 86, n. 4, p. 433-441, Oct. 2001.

HUANG, L. L. et al. Suppression of acute ethanol-induced hepatic steatosis by docosahexaenoic acid is associated with down regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 and inflammatory cytokines. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 88, n. 5, p. 347-353, May 2013.

JENA, S.; CHAINY, G. B. N.; DANDAPAT, J. Expression of antioxidant genes in renal cortex of PTU-induced hypothyroid rats: effect of vitamin E and curcumin. **Molecular Biology Reports**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 1193-1203, Feb. 2012.

JUAREZ, M. et al. Dietary vitamin E inhibits the trans 10-18:1 shift in beef back fat. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 90, n. 1, p. 9-12, Dec. 2010.

JUMP, D. B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 19, n. 3, p. 242-247, June 2008.

KADEGOWDA, A. K. G. et al. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 reduces lipogenesis in primary bovine adipocytes. **Lipids**, Champaign, v. 9, n. 10, p. 967-976, Oct. 2013.

KERSTEN, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 103, n. 11, p. 1489-1498, June 1999.

LEE, J. H. et al. Effect of feeding rumen-protected dietary protein-oil supplements on fatty acid composition and a-tocopherol content of blood serum and muscle lipids of lambs. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 101-110, Oct. 2007.

MACHADO NETO, O. R. **Desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de tourinhos red norte alimentados com oleaginosas e vitamina E**. 2011. 113 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

MALAU-ADULI, A. E. O. et al. A comparison of the fatty acid composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 48, n. 5, p. 715-722, Sept. 1997.



NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle.** 7<sup>th</sup> ed. Washington, 1996. 242 p.

OLIVEIRA, D. M. et al. Fatty acid profile and qualitative characteristics of meat from zebu steers fed with different oilseeds. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 2546-2555, Aug. 2011.

PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of Stearoyl-CoA desaturase. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 297, n. 1, p. E28-37, July 2009.

PAVAN, E.; DUCKETT, S. K. Corn oil supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue: II., effects on longissimus muscle and subcutaneous adipose fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase activity and expression. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 1731-1740, July 2007.

PAWAR, A.; JUMP, D. B. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 38, p. 35931-35939, Sept. 2003.

POTTIER, J. et al. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 2, p. 685-692, Sept. 2006.

RENAVILLE, B. A. et al. Eicosapentaenoic acid and 3,10 dithia stearic acid inhibit the desaturation of trans-vaccenic acid into *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid through different pathways in Caco-2 and T84 cells. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 95, n. 4, p. 688-695, Apr. 2006.

SALTER, A. M.; TARLING, E. J. Regulation of gene transcription by fatty acids. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 1314-1320, July 2007.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 147-155, Mar. 2008.

SCOLLAN, N. et al. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality: review. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 1, p. 17-33, Sept. 2006.

SHIN, J. et al. Comparative analysis of fatty acid-binding protein 4 promoters: conservation of peroxisome proliferator-activated receptor binding sites. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 3923-3934, Dec. 2009.

SHINGFIELD, K. J.; BONNET, M.; SCOLLAN, N. D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 132-162, 2013. Supplement.

SMITH, S. B. et al. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 14, p. E72-E82, Apr. 2009.

STAELS, B. et al. The effects of fibrates and thiazolidinediones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). **Biochimie**, Paris, v. 79, n. 2, p. 95-99, Feb. 1998.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS user's guide:** statistics. Version 9.2. Cary, 2012. 373 p.

UNDERWOOD, K. R. et al. Relationship between kinase phosphorylation, muscle fiber typing, and glycogen accumulation in Longissimus muscle of beef cattle with high and low intramuscular fat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 23, p. 9698-9703, Nov. 2007.

WANG, C. S.; KUKSIS, A.; MANGANARO, F. Studies on the substrate specificity of purified human milk lipoprotein lipase. **Lipids**, Cambridge, v. 17, n. 4, p. 278-284, Apr. 1982.

WANG, J. H. et al. Low protein diet up-regulate intramuscular lipogenic gene expression and down-regulate lipolytic gene expression in growth-finishing pigs. **Livestock Science**, New York, v. 148, n. 2, p. 119-128, Sept. 2012.

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

XU, J. et al. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanisms. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 11, p. 3333-3339, Nov. 2002.

YANG, A.; LARSEN, T. W.; SMITH, S. B.  $\Delta^9$  desaturase activity in bovine subcutaneous adipose tissue of different fatty acid composition. **Lipids**, Champaign, v. 34, n. 9, p. 971-978, Sept. 1999.

ZHAO, S. M. et al. Differential expression of lipid metabolism related genes in porcine muscle tissue leading to different intra-muscular fat deposition. **Lipids**, Champaign, v. 44, n. 11, p. 1029-1037, Nov. 2009.