



**PRISCILLA DUTRA TEIXEIRA**

**A SUBESPÉCIE E A DIETA AFETAM A  
EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO  
METABOLISMO LIPÍDICO E A COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DO MÚSCULO DE BOVINOS DE  
CORTE**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**PRISCILLA DUTRA TEIXEIRA**

**A SUBESPÉCIE E A DIETA AFETAM A EXPRESSÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NO METABOLISMO LIPÍDICO E A COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DO MÚSCULO DE BOVINOS DE CORTE**

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

Orientador

Dr. Márcio Machado Ladeira

**LAVRAS – MG**

**2015**

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

Teixeira, Priscilla Dutra.

A subespécie e a dieta afetam a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e a composição química do músculo de bovinos de corte / Priscilla Dutra Teixeira. – Lavras : UFLA, 2015.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Márcio Machado Ladeira.

Bibliografia.

1. SREBP. 2. Fatores de transcrição. 3. PPARs. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**PRISCILLA DUTRA TEIXEIRA**

**A SUBESPÉCIE E A DIETA AFETAM A EXPRESSÃO DE GENES  
ENVOLVIDOS NO METABOLISMO LIPÍDICO E A COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA DO MÚSCULO DE BOVINOS DE CORTE**

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

APROVADA em 15 de janeiro de 2015.

Dr. Daniel Rume Casagrande	UFLA
Dr. Mateus Pies Gionbelli	UFLA
Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto	UNESP/Botucatu

Dr. Márcio Machado Ladeira  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

*Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu chegasse onde cheguei.*

*Que abrem mão dos próprios ideais em busca dos meus, e que sabem me dar  
amor sem medidas*

*A meus irmãos pelo apoio, amor e companheirismo.*

*Aos meus anjos (Vô Zé Bico e Tio Jorge) por estarem sempre me protegendo e  
iluminando.*

*Ao Fabiano e sua família, pelo carinho e por que me alegrar nos momentos  
difíceis sem minha família*

*Amo vocês!*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e saúde para aproveitar todas as oportunidades e por proteger e guiar os meus passos.

Aos meus pais José Eugênio e Claudia, pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

Aos meus irmãos Igor e Felipe, pelo carinho e amizade.

À família “Dutra” e “Teixeira” por todo incentivo, torcida e carinho. Vocês são meus melhores amigos!

Ao Fabiano, pelo carinho, companheirismo e dedicação e, principalmente, pela paciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Machado Ladeira, pela confiança, dedicação, amizade e pelos conhecimentos transmitidos. Irei sempre me lembrar dos seus exemplos de vida como professor, pesquisador e pessoa.

Ao Prof. Dr. Mateus Pies Gionbelli, pelo apoio e sugestões em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Casagrande, pelo apoio e pela participação da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto, pela amizade, conselhos, confiança e ensinamentos repassados desde a graduação.

Aos amigos da UFLA, em especial Ciça e Patroa, pela amizade, dedicação e companheirismo.

À família NEPEC, pelos ensinamentos trocados ao longo desses anos, companheirismo e, principalmente, pelas amizades verdadeiras que fiz.

Aos meus amigos da pós – graduação, em especial, Cris e Adriano, pela amizade e companheirismo.

Ao José Rodolfo, pela amizade, atenção e dedicação ao transferir seus conhecimentos.

Ao mais novo Prof. Dalton, pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos que me auxiliaram em toda essa jornada. Sem você não teria resultados hoje.

Às estagiárias, em especial a Tamara e Aline pelas várias horas de dedicação e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

Ao laboratório de Ciência Animal do Departamento de Zootecnia, em nome de Márcio, Eliane e José Virgílio, pelo apoio, dedicação e amizade adquirida desde a graduação.

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

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa.

Aos demais amigos da graduação e pós-graduação em Zootecnia.

## RESUMO GERAL

O objetivo deste estudo foi analisar composição centesimal e expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* (LD) de tourinhos Nelore e Angus alimentados com grão de milho inteiro ou silagem de milho mais concentrado. Foram utilizados 34 animais, com peso vivo médio inicial de  $381,2 \pm 11,8$  kg, em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 (2 raças e 2 dietas). A dieta tradicional continha 30% de silagem de milho e 70% de um concentrado à base de milho e farelo de soja. A dieta com grão de milho inteiro continha 85% de grão de milho inteiro e 15% de um *pellet* comercial a base de farelo de soja e minerais. Após o abate, foram coletadas amostras do músculo LD entre 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas para análise da composição centesimal e expressão gênica. A expressão gênica foi analisada utilizando a técnica de RT-qPCR. A carne de animais Angus apresentou maior extrato etéreo em relação aos animais da raça Nelore ( $P < 0,05$ ). No entanto não houve efeito ( $P > 0,05$ ) das dietas sobre o teor de EE na carne. O músculo LD dos animais Nelore alimentados com silagem de milho apresentaram maior expressão dos genes lipoproteína lipase (*LPL*), proteína de ligação ao ácido graxo 4 (*FABP4*), Acetil coA carboxilase alfa (*ACACA*), estearoil coA dessaturase (*SCD1*) e carnitina palmitoil transferase 2 (*CPT2*) ( $P < 0,01$ ). Porém a expressão do gene ácido graxo sintase (*FAS*) foi maior no músculo LD de animais Nelore ( $P < 0,01$ ) e de animais recendo grão de milho inteiro ( $P < 0,01$ ), e a expressão do acil-coenzima A oxidase 1 (*ACOX1*) foi maior para os Angus alimentados com grão de milho inteiro ( $P = 0,04$ ). O músculo LD dos animais Nelore apresentaram maior expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissomas  $\alpha$  (*PPAR $\alpha$* ) ( $P < 0,01$ ) e menor expressão dos elementos reguladores de esterol ligados as proteínas (*SREBP-1c*) ( $P = 0,03$ ). Em relação às dietas, a expressão de *PPAR $\alpha$*  aumentou quando os animais foram alimentados com grão de milho inteiro e o inverso ocorreu para a expressão de *SREBP-1c*. Já os animais Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado apresentaram maior expressão do *PPAR $\gamma$*  ( $P < 0,01$ ). Animais da raça Angus apresentaram maior deposição de gordura intramuscular. Todavia, a dieta com grão de milho inteiro não foi capaz de aumentar a gordura de marmoreio devido à redução na expressão da *SREBP-1c*.

Palavras-chave: Alto grão. Fatores de transcrição. PPARs. Raça. RNAm. SREBP.



## GENERAL ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the centesimal composition and the expression of genes involved in the lipid metabolism of the *longissimus dorsi* (LD) muscle of Nellore and Aberdeen Angus young bulls fed whole shelled corn (WSC) and a maize silage diet. Thirty-four animals with average initial body weight of  $381.2 \pm 11.87$  kg, in a completely randomized design arranged in a  $2 \times 2$  factorial scheme (2 breeds and 2 diets). The traditional diet contained 30% of corn silage and 70% of a corn and soybean meal-based concentrate. The diet with WSC contained 85% whole shell corn and 15% of a soybean meal and mineral-based commercial *pellet*. After slaughter, we collected samples from the LD muscle, between the 12th and 13th ribs, for centesimal composition and gene expression analyses. Gene expression was analyzed using the qRT-PCR technique. The meat from Angus animals showed higher ether extract when compared to Nellore animals ( $P < 0.05$ ). However, there was no effect ( $P > 0.05$ ) of the diets over ether extract in the meat. The LD muscle of the Nellore animals fed corn silage presented higher expression of the lipoprotein lipase (*LPL*), fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), acetyl CoA carboxylase alpha (*ACACA*), stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and carnitine palmitoyltransferase 2 (*CPT2*) genes. However, the expression of the fatty acid synthase (*FAS*) gene was higher in the LD muscle of Nellore animals ( $P < 0.01$ ) and of animals fed WSC ( $P < 0.01$ ). The expression of acyl-coenzyme A oxidase 1 (*ACOX*) was higher for Angus animals fed WSC ( $P = 0.04$ ). The LD muscle of Nellore animals presented higher expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (*PPAR $\alpha$* ) ( $P < 0.01$ ), and lower expression of sterol regulatory element-binding protein-1c (*SREBP-1c*) ( $P = 0.03$ ). Regarding the diets, the expression of *PPAR $\alpha$*  increased when the animals were fed WSC and the opposite occurred for the expression of *SREBP-1c*. The Angus animals fed corn silage in addition to concentrate presented higher expression of the *PPAR $\gamma$*  ( $P < 0.01$ ). Animals of the Angus breed showed greater deposition of intramuscular fat. However, the diet with WSC was incapable of increasing fat marbling due to the decreased expression of *SREBP-1c*.

Keywords: Breed. mRNA. PPARs. SREBP. Transcription factors. Whole shelled.

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

- Figura 1 Expressão relativa dos genes PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e SREBP-1c no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)..... 73
- Figura 2 Expressão relativa dos genes LPL e FABP4 no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)..... 74
- Figura 3 Expressão relativa dos genes *ACACA*, *FAS* e *SCD1* no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)..... 75
- Figura 4 Expressão relativa dos genes *CPT1* e *ACOX* no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)..... 76

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Tabela 1	Composição percentual, química e proporção (%) dos principais ácidos graxos das dietas experimentais .....	68
Tabela 2	Sequência (5' para 3') e eficiência dos <i>primers</i> que foram usados na PCR quantitativa em tempo real .....	69
Tabela 3	Composição centesimal (%) da carne de tourinhos Nelore e Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI) .....	70
Tabela 4	Coefficiente de correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo <i>longissimus dorsi</i> em tourinhos Nelore e Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI).....	71
Tabela 5	Menor pH, pH médio, maior pH e porcentagem do tempo em relação a 24 horas que o pH ruminal permaneceu abaixo de 5,5 e 6,0 em tourinhos Nelores e Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI) .....	72
Tabela 6	Coefficiente de correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e o extrato etéreo (EE%) no músculo <i>longissimus dorsi</i> em tourinhos Nelore e Angus .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil coA carboxilase
ACOX	Acil-Coenzima A Oxidase
AGL	Ácido Graxo Livre
AGMI	Ácido Graxo Monoinsaturado
AGPI	Ácido Graxo Poli insaturado
AGS	Ácido Graxo Saturado
cDNA	Ácido Dextrribonucléico Complementar
CLA	Ácido Linoléico Conjugado
CPT	Carnitina Palmitoil Transferase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EE	Extrato Etéreo
FABP4	Proteína de Ligação ao Ácido Graxo
FAS	Ácido Graxo Sintase
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
LD	<i>Longissimus dorsi</i>
LPL	Lipoproteína Lipase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPAR $\alpha$	Receptor Ativador por Peroxissoma alfa
PPAR $\gamma$	Receptor ativado por peroxissoma gamma

RNA	Ácido Ribonucléico
RT-qPCR	Transcrição Reversa, seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SCD1	Estearoil coA dessaturase
SREBP-1c	Fatores de Transcrição de Proteínas Ligantes aos Esteróides

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> ..... 17
<b>2.1</b>	<b>Composição química</b> ..... 17
<b>2.2</b>	<b>Fatores de transcrição</b> ..... 19
<b>2.3</b>	<b>Captação de ácidos graxos nos tecidos</b> ..... 21
<b>2.4</b>	<b>Síntese de tecido adiposo</b> ..... 23
	<b>REFERÊNCIAS</b> ..... 27
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGO</b> ..... 36
	<b>ARTIGO 1 A subespécie e a dieta afetam a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e a composição química do músculo de bovinos de corte</b> ..... 36

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Os confinamentos, no Brasil, estão em franca expansão, sendo esse crescimento explicado, em parte, pelo aumento nas exportações de carne bovina, aumento no número de animais alojados nas unidades, aumento da produção agrícola do país e da entrada de grandes indústrias frigoríficas na atividade. Diante disso, dietas típicas de terminação, no Brasil, com relação volumoso: concentrado de 30:70 (MILLEN et al., 2009), começaram a dar lugar a dietas com maiores proporções de concentrado e, em algumas situações, sem a utilização de volumosos. Essas dietas podem acelerar a deposição de gordura e aumentar a participação de cortes nobres na carcaça, além de aumentar a maciez e melhorar os aspectos sensoriais da carne de bovinos (MAGGIONI et al., 2012; MISSIO et al., 2010).

A utilização de dietas com alta concentração energética é importante para a produção de carnes com maior grau de marmoreio, uma vez que, o conteúdo de gordura intramuscular da carne é um importante atributo de qualidade (PLATTER et al., 2003). Porém, pesquisas que avaliaram o efeito de dietas com alta proporção de grãos em animais zebuínos ainda são escassas, principalmente com a utilização de dietas sem volumoso. Diante disso, faz-se necessário ampliar os conhecimentos sobre o efeito da dieta sem volumoso na qualidade da carne de *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Em bovinos, assim como em outras espécies de animais, a deposição de gordura reflete a nutrição e o grupo genético utilizado. Com isso, há enorme interesse na manipulação da composição química da carne, por meio da regulação de sua biossíntese. Para melhor compreensão dos efeitos da nutrição

sobre o metabolismo lipídico, uma alternativa recente é a utilização da expressão gênica associada à nutrição, também conhecida como nutrigenômica.

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação contida na estrutura do DNA é transmitida para os RNAm e produtos proteicos (EGGEN; HOCQUETTE, 2003), sendo esta controlada pela ligação de determinados fatores de transcrição em sequências específicas do DNA. Os principais fatores de transcrição envolvidos no metabolismo lipídico são os elementos reguladores de esterol ligados as proteínas (*SREBP-1c*) (XU et al., 2001), o receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\gamma$  (*PPAR $\gamma$* ) e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\alpha$  (*PPAR $\alpha$* ). Sendo estes associados à síntese e oxidação dos ácidos graxos nos diferentes órgãos e tecidos do corpo do animal (BIONAZ et al., 2013; TAKADA; KOUZMENKO; KATO, 2009).

As interações entre os nutrientes que compõem a dieta e a síntese e atividade de enzimas lipogênicas podem ilustrar as inúmeras possibilidades no que diz respeito à deposição de lipídeos no tecido adiposo. Isso é possível, em razão da atividade biológica apresentada por certos ácidos graxos da dieta, que podem estimular ou inibir genes que codificam enzimas lipogênicas específicas (JUMP, 2002). Como, por exemplo, fontes ricas em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) têm a capacidade de aumentar a transcrição dos genes que codificam a enzima lipoproteína lipase (LPL), o transportador de ligação ao ácido graxo 4 (FABP4), *PPAR $\alpha$*  (KERSTEN, 2014) e *PPAR $\gamma$*  (BIONAZ et al., 2013) e diminuir a expressão do gene que codifica a esteroil coA dessaturase (SCD1) (HERDMANN et al., 2010) e os *SREBP-1c* (BOTOLIN et al., 2006).

Diante disso, hipotetizamos que os animais alimentados com a dieta com grão de milho inteiro apresentariam maior gordura intramuscular, pois dietas com altos teores de grãos proporcionariam maior produção de propionato no rúmen e maior aporte de glicose para o animal, elevando, assim, o teor de extrato etéreo na carne.



Dessa forma, neste estudo, objetivou-se avaliar como a expressão gênica influencia a composição química do músculo de tourinhos Nelore e Angus alimentados com uma dieta sem forragem e com grão de milho inteiro ou com uma dieta tradicional de confinamento no Brasil, com relação volumoso: concentrado de 30:70.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Composição química

Quatro componentes da carne são considerados substratos primários, pois, influenciam diretamente sua qualidade: umidade, gordura (EE), proteína (PB) e matéria mineral (MM). Nos músculos a composição química é relativamente constante (cerca de 75% de água, 19 a 25% PB e 1 a 2% MM), sendo que a maior variação encontrada se refere ao teor de gordura (GEAY et al., 2001). Uma vez aumentada a concentração de extrato etéreo no músculo, as proporções de umidade, proteína e minerais reduzirão (LAWRIE, 2004).

A gordura é fonte de energia, constituída, principalmente, por triglicerídeos, que contêm ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e glicerol. A gordura animal é fonte de ácidos graxos essenciais, atuando, também, como transportador de vitaminas lipossolúveis e isolante térmico (GALDINO, 2005). A deposição de gordura em uma carcaça obedece a uma cronologia: primeiramente ocorre a deposição de gordura interna, a seguir ocorre deposição da gordura subcutânea e, por último, a gordura intramuscular (LUCHIARI FILHO, 2000), a qual é importante para o desenvolvimento do sabor, suculência e maciez da carne (DODSON et al., 2010).

Andrade et al. (2010), avaliando animais Nelore e Red Norte, observaram ausência do efeito da raça no teor de lipídeos totais terminados a pasto ou em confinamento. Hadlich (2007) também não encontrou diferença no teor de EE do músculo *Longissimus thoracis* de animais Nelore (1,6%) e animais Brangus (1,2%), terminados em confinamento. Rubiano et al. (2009) encontraram que animais Canchim possuem maior teor de EE na carne, quando comparados com animais Nelore.

Porém, Bressan et al. (2011) constatou que animais *Bos indicus* apresentam maior teor de gordura que *animais Bos taurus* (5,7% e 5,0%). Moreira et al. (2003) também relataram níveis mais elevados de gordura intramuscular em bovinos da raça Nelore, quando comparados com animais cruzados *Bos indicus* x *Bos taurus*. O autor explica esse resultado, devido os animais Nelore estarem em um estágio fisiológico mais avançado, o que proporciona maior gordura intramuscular.

Comparando sistemas de produção, Bressan et al. (2011) verificaram 2,5 vezes mais gordura intramuscular nos bovinos terminados em confinamento, em relação aos terminados a pasto (7,65% e 3,16%). Comparativamente ao pasto, alta concentração energética da dieta à base de grãos determina um maior consumo de energia em animais terminados em confinamento, resultando em sua carne maior teor de gordura intramuscular.

O tecido adiposo intramuscular é mais sensível à insulina, quando comparado ao tecido adiposo subcutâneo (GILBERT et al., 2003). Sendo assim, alimentos que aumentam a produção de propionato, como o milho, têm maior capacidade glicogênica e insulínogênica, o que poderia aumentar a deposição de gordura intramuscular.

Em um trabalho realizado por Chung et al. (2007), os animais que foram alimentados com a dieta à base de milho, durante longo período, apresentaram declínio na biossíntese de ácidos graxos a partir do acetato de aproximadamente 75% nos tecidos adiposos subcutâneo e intramuscular. Segundo esses autores, a glicose assume um papel importante como fonte doadora de carbono para a síntese de *novo* de ácidos graxos, sendo esse efeito é mais sensível no tecido intramuscular, onde a taxa de incorporação de glicose nos ácidos graxos foi mais alta que a taxa de incorporação de acetato. Já, no tecido subcutâneo, a taxa de incorporação de acetato e glicose na síntese de ácido graxo foi semelhante.

## 2.2 Fatores de transcrição

A expressão dos genes, a síntese de RNAm, é controlada pela ligação de determinados fatores de transcrição em sequências específicas do DNA. A expressão desses 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.

O termo PPAR corresponde a uma família de receptores nucleares influenciados por ácidos graxos, que desempenham funções importantes na regulação do metabolismo de nutrientes e homeostase energética (LEMAY; HWANG, 2006). Suas formas funcionam como heterodímeros com receptor X de retinóide (RXR), em que os dois juntos ligam-se a uma sequência específica de DNA na região promotora do gene alvo que induz ou reprime a expressão deste (WAKU; SHIRAKI; OYAMA, 2009).

Existem basicamente três isoformas de PPAR, que se diferenciam pelo tecido alvo, propriedades fisiológicas e estágios de desenvolvimento do tecido (DESVERGNE; WAHLI, 1999). O PPAR $\gamma$  tem elevada expressão nos adipócitos e menor expressão no músculo (KERSTEN, 2014), sendo o mesmo crucial no controle da adipogênese (TAKADA; KOUZMENKO; KATO, 2009) e sensibilidade à insulina (OLEFSKY; SALTIEL, 2000). A expressão do PPAR $\alpha$  é mais elevada no fígado e no tecido adiposo, seguido do intestino delgado (BUNGER et al., 2007) e coração (GEORGIADI et al., 2012). O PPAR $\alpha$  atua na síntese e na  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos no músculo (BIONAZ et al., 2013). Já, o PPAR $\delta/\beta$  é expresso em, praticamente, todos os tecidos (KERSTEN, 2014).

Segundo Ji et al. (2014), o nível de expressão PPAR $\gamma$  é mais elevado no tecido adiposo, sendo mais expresso na gordura abdominal e gordura perirrenal,

do que na gordura subcutânea. Lee et al. (2011) também encontram maior atividade do PPAR $\alpha$  na gordura perirrenal de bovinos da raça Wagyu.

Sanosaka et al. (2008) demonstraram que o aumento da concentração de ácido oleico no meio de cultura aumentou a expressão do PPAR $\gamma$  em pré-adipócitos de suínos. Em humanos, Brown et al. (2003) constataram que o CLA (C18:2 trans-10, cis-12) reduz a expressão do PPAR $\gamma$  e, conseqüentemente, reduz absorção e oxidação de glicose e lipídeos e diferenciação de pré-adipócitos.

Oliveira et al. (2014) encontraram correlação positiva da expressão do PPAR $\alpha$  no músculo de bovinos com os genes que codificam as enzimas LPL e SCD1, assim como o transportador de ácidos graxos FABP4. Corazzin et al. (2013) avaliando o PPAR $\gamma$ , também constataram que a sua expressão é correlacionada positivamente com a SCD e LPL. Essas correlações positivas indicam que PPAR $\gamma$  aumenta a expressão de genes envolvidos na lipogênese.

Os SREBP são outros fatores de transcrição que possuem um papel fundamental na homeostase energética, promovendo a glicólise, lipogênese e adipogênese (MANNEN, 2011). Existem três membros da família de SREBP: 1a, 1c e 2. A SREBP-1 está mais relacionada com a regulação dos genes envolvidos na lipogênese (HARVATINE; BAUMAN, 2006), enquanto a SREBP-2 tem maior influência na regulação da expressão dos genes colesterogênicos (EBERLE et al., 2004). O SREBP regula a transcrição de genes de ativação através da ligação ao elemento de regulação de esterol (SRE) sequências (50-TCACNCCAC-30), contidos no promotor do seu gene (SHIMANO, 2001).

Segundo Sampathe Ntambi (2006), o SREBP regula a expressão da SCD e mudança nos níveis de sua expressão podem alterar a síntese da SCD e causar diferenças na composição de ácidos graxos no tecido adiposo dos animais (MANNEN et al., 2011). Lee et al. (2011) encontraram uma menor expressão

dos genes SCD e SREBP-1c na gordura perirenal de bovinos da raça Wagyu, o que caracterizou em maior teor de ácidos graxos saturados. Jenkins e Harvatine (2014) encontraram uma redução na expressão da SREBP na glândula mamária quando os animais foram alimentados com dietas ricas em grãos ou quando foram infundidos com CLA.

A SREBP-1 é a principal reguladora de genes envolvidos na lipogênese na glândula mamária (JENKINS; HARVATINE, 2014). Nesse tecido, sugere-se que o PPAR $\gamma$  regula a atividade da SREBP, por meio da regulação da expressão do gene induzido pela insulina 1 (BIONAZ; LOOR, 2008). Os autores ainda encontraram maior expressão da SREBP-2 durante a lactação, isso pode ocorrer, em decorrência do colesterol ser sintetizado de novo no tecido mamário, com isso, sua expressão pode ser necessária para atender às exigências para a formação de colesterol na membrana dos glóbulos de gordura (KEENAN; MATHER, 2006).

De acordo com Botolin et al. (2006), em ratos, os AGPI inibem a transcrição de genes envolvidos na lipogênese no fígado, por rapidamente reduzir os fatores transcricionais ligados a SREBP, o que reduz a ativação do gene que codifica a enzima Acetil coA carboxilase (ACC). O CLA parece ter um efeito mais pronunciado em relação a outros AGPI na redução da concentração de RNAm da SREBP-1 (WATERS et al., 2009).

### **2.3 Captação de ácidos graxos nos tecidos**

Ácidos graxos e uma pequena quantidade de triacilglicerol (TAG) que escapam do rúmen e chegam ao intestino delgado, sofrem ação de lipases e proteínas carreadoras específicas até a sua absorção no intestino e posterior deposição nos tecidos.

Ao chegarem aos adipócitos os triglicerídeos transportados pelos quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL), a qual é sintetizada pelos adipócitos e secretada nos capilares do tecido adiposo, produzindo ácidos graxos livre (AGL) (GOLDBERG; MERKEL, 2001). Partículas de lipoproteínas ricas em TAG são grandes demais para atravessar o endotélio capilar na maioria dos tecidos, com isso a LPL atua liberando AGL, que cruzam o endotélio chegando ao adipócito. A LPL é responsável ainda por controlar a divisão dos ácidos graxos entre o tecido adiposo e muscular (HOCQUETTE; GRAULET; OLIVECRONA, 1998), sendo, assim, de grande importância para os animais produtores de carne.

Por regular o metabolismo lipídico, a LPL também é influenciada pela ação da insulina. (WANG; ECKEL, 2009). A insulina tem um efeito importante sobre a atividade da LPL no tecido adiposo, durante a diferenciação dos adipócitos, aumentando a transcrição do gene da LPL (SEMENKOVICH et al., 1989). Já, em adipócitos maduros ou do tecido adiposo, a insulina aumenta o nível de RNAm da LPL, por meio da estabilização do RNAm e regula a atividade da enzima LPL estimulando a secreção da enzima ou tornando a enzima ativa (ALBALAT et al., 2007).

Após a liberação dos AGL na corrente sanguínea, estes serão removidos pelos tecidos que os utilizarão como combustível ou estoque energético. No entanto, a entrada desses AGL no adipócito exige processos específicos ou transportadores, que facilitam a entrada dessas moléculas, como a proteína de ligação ao ácido graxo (FABP) (JURIE et al., 2007). A importância da FABP4 no transporte de ácido graxo livre se dá pela sua atuação no e fluxo e influxo de ácidos graxos no adipócito, em resposta às condições anabólicas e catabólicas, respectivamente (VURAL et al., 2008).

Costa et al. (2013), trabalhando com animais taurinos submetidos à terminação com baixa e alta concentração de volumoso, constataram que aqueles

alimentados com alta proporção de volumoso tiveram tendência de maior síntese de RNAm de LPL no músculo, enquanto que os animais alimentados com baixa relação volumoso:concentrado (30:70) tiveram maior nível de expressão do FABP4. Já, Oliveira et al. (2014), encontraram maior expressão dos genes LPL e FABP4 no músculo de animais alimentados com dieta contendo grão de soja, em relação aos animais alimentados com gordura protegida, pois os genes apresentam funções que se complementam.

No tecido adiposo Costa et al. (2013), constataram que animais da raça Barrosã apresentaram maior nível de expressão da LPL que os da raça Alentejana, o que demonstra que o grupo genético influencia a expressão desse gene. Os mesmos autores encontraram correlação positiva entre a expressão dos genes LPL e FABP4 com lipídeos totais, 18:1 n-9, C18:2 cis-9 trans-11 e AGMI.

Um estudo que comparou os perfis de transcrição do tecido muscular de animais Wagyu x Hereford (alto marmoreio) e animais Piemontês x Hereford (baixo marmoreio) revelou aumento da expressão de alguns genes como FABP4 e SCD nos animais com maior marmoreio (WANG et al., 2008).

#### **2.4 Síntese de tecido adiposo**

A síntese de gordura em ruminantes pode ocorrer por duas vias bioquímicas diferentes, a partir da síntese de triglicerídeos, realizada através da reesterificação do glicerol e ácidos graxos provenientes da dieta ou via a síntese de novo de ácidos graxos (ROLLIN et al., 2003). As enzimas lipogênicas Acetil coA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS) estão associadas à síntese de novo de lipídeos 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, essas enzimas são consideradas regulatórias, pois mudanças nas suas atividades refletem em



alterações nas taxas de síntese dos ácidos graxos. 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. Esses resultados sugerem que a taxa de biossíntese de ácidos graxos pode ser um fator importante na determinação do perfil lipídico da gordura de marmoreio em ruminantes.

A ACC catalisa a carboxilação da acetil-CoA em malonil-CoA. O malonil-CoA, 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 papel importante na deposição de lipídeos em diferentes compartimentos do corpo, pelo 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).

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 maior taxa de ativação da ACC. Em contraste, os animais com baixo marmoreio tiveram maior taxa de fosforilação e inativação da ACC, o que resultou em menor nível da enzima ativa. O tecido adiposo intramuscular usa alta proporção de glicose para a síntese de novo de ácidos graxos e, em decorrência da glicose ser precursora da acetil-CoA, principal substrato da ACC, o aumento do marmoreio correlaciona-se, positivamente, com atividade dessa enzima (GILBERT et al., 2003).

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

Em relação à 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 a ocorrência de polimorfismos de DNA no gene FAS em bovinos, sugerindo a importância desse gene para a regulação da formação de ácidos graxos na composição da carne bovina.

Assim que os ácidos graxos de cadeia longa se encontram dentro do adipócito, outros processos metabólicos começam a desencadear uma série de reações, com a ação da enzima estearoil coA dessaturase (SCD), responsável pela conversão de AGS em AGMI, que estão associados à maciez e sabor da carne (MATSUISHI; FUJIMORI; OKITANI, 2001). Além disso, a mesma está associada à conversão do ácido vaccênico (C18:1 trans-11) a CLA (C18:2 cis- 9, trans-11) (SMITH et al., 2006), este último com características benéficas à saúde humana desencadeando estímulos de resposta imune contra a aterosclerose, apresentando propriedade hipocolesterolêmica e atuando na prevenção de diabetes mellitus e de obesidade, além de ser um poderoso antioxidante (FUKE et al., 2012).

Park et al. (2000) observaram que a redução do CLA foi diretamente proporcional à baixa atividade da enzima SCD, porém, a expressão gênica da mesma não foi alterada. Além disso, nenhuma alteração foi encontrada por

Wynn et al. (2006) nos níveis de mRNA de ovelhas alimentadas com gordura inerte. Já, em relação ao isômero do CLA C18:2 trans 10, cis 12, Smith et al. (2009), encontraram que o mesmo deprime a expressão gênica da SCD e, assim, diminui a síntese de AGMI.

Alguns estudos com bovinos de corte revelaram que o nível de expressão de RNAm da SCD está relacionado com o percentual de AGPI (DUCKETT; PRATT; PAVAN, 2009) e alterações da expressão gênica refletiram diferenças no teor de AGMI e na relação AGMI:AGS do tecido adiposo subcutâneo (MATSUHASHI et al., 2011).

Oliveira (2013) observou maior expressão da SCD no músculo dos animais alimentados com dieta à base de caroço de algodão. Isso, porque, o ácido estercúlico do caroço de algodão inibe a atividade da enzima sem afetar a expressão do gene responsável por sua codificação (KADEGOWDA et al., 2013), o que foi comprovado pelo menor teor de CLA no músculo desses animais.

Parece provável que alguma porção do aumento de AGMI ao longo do tempo em tecido adiposo subcutâneo é decorrente de um aumento da expressão gênica da SCD (DUCKETT; PRATT; PAVAN, 2009). Já, alimentação à base de forragem deprime fortemente a expressão da SCD (CHOI et al., 2014), resultando em uma elevação de AGS em carne bovina, além de diminuir a marmorização da carne (LUNT et al., 2005).

## 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. 5513, p. 2613-2616, Mar. 2001.

ALBALAT, A. et al. Insulin regulation of lipoprotein lipase (LPL) activity and expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, New York, v.148, n. 2, p.151-159, Oct. 2007.

ANDRADE, P.L. et al. Qualidade da carne maturada de bovinos Red Norte e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.39, n.8, p.1791-1800, 2010.

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, p. 1-28, 2013.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. **BMC Genomics**, London, v.9, p. 366, July 2008.

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. Docosahexaenoic 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.

BRESSAN, M.C. et al. Genotype × environment interactions for fatty acid profiles in *Bos indicus* and *Bos taurus* finished on pasture or grain. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p.221-232, Jan. 2011.

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 Transaction**, London, v. 34, n. pt2, p. 223-227, Apr. 2006.

BUNGER, M. et al. Genome-wide analysis of PPAR $\alpha$  activation in murine small intestine. **Physiological Genomics**, Bethesda, v.30, n. 2, p.192-204, July 2007.

CHOI, S.H. et al. Conjugated linoleic acid (t-10, c-12) reduces fatty acid synthesis de novo, but not expression of genes for lipid metabolism in bovine adipose tissue ex vivo. **Lipids**, Champaign, v.49, n. 1, p.15-24, Jan. 2014.

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.

CORAZZIN, M. et al. Effect of linseed addition on the expression of some lipid metabolism genes in the adipose tissue of young Italian Simmental and Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.91, n. 1, p. 405-412, Jan. 2013.

COSTA, A.S. et al. Expression of genes controlling fat deposition in two genetically diverse beef. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/118>>. Acesso em: 10 out. 2014.

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.

DODSON, M.V. et al. Allied industry approaches to alter intramuscular fat content and composition in beef animals. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 1, p.R1-R8, Jan./Feb. 2010.

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.1120-1128, Mar. 2009.

EBERLE, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, Paris, v.86, n. 11, p. 839-848, 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. 2003.

FUKE, G. et al. Teor de CLA em leites produzidos em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 19, n. 2, p. 109-113, maio/ago. 2012.

GALDINO, J. C. **Qualidade da carne de bovinos Sindi e búfalos Mediterrâneo em confinamento**. 2005. 42p. Dissertação(Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Soropédica, 2005.

GEAY, Y. et al. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 41, n. 1, p. 1-26, Jan./Feb. 2001.

GEORGIADI, A. et al. Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 44, n. 6, p.352-361, Mar. 2012.

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.

GOLDBERG, I.J.; MERKEL, M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 6, p. 388-405, Mar. 2001.

HADLICH, J. C. **Características do crescimento animal, do tecido muscular esquelético e da maciez da carne de bovinos Nelore e mestiços no modelo biológico superprecoce**. 2007. 87 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

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

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, 2010.

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.

JENKINS, T. C.; HARVATINE, K. J. Lipid feeding and milk fat depression. **Veterinary Clinics of Food Animal**, Philadelphia, v.30, n. 3, p.623-642, Nov. 2014.

JI, S. et al. Differential expression of PPAR $\gamma$ , FASN, and ACADM genes in various adipose tissues and longissimusdorsi muscle from yanbian yellow cattle and yan yellow cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 27, n. 1, p.10-18, Jan. 2014.

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.

KADEGOWDA, A.K.G. et al. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 reduces lipogenesis in primary bovine adipocytes. **Lipids**, Champaign, v. 48, n. 10, p. 967-976, Oct. 2013.

KEENAN, T. W.; MATHER, I. H. Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry: lipids**. New York: Springer, 2006. v. 2, p.137-171.

KERSTEN, S. Integrated physiology and systems biology of PPAR $\alpha$ . **Molecular Metabolism**, New York, v.3, n. 3, p.354-371, Mar. 2014.

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

LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 384 p.

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**, Berlin, 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.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: Ed. São Paulo, 2000. 134 p.

LUNT, D. K. et al. Production characteristics and carcass quality of Angus and Wagyu steers raised to US and Japanese endpoints. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Philadelphia, v. 4, n. 11, p. 949-953, 2005.



MAGGIONI, D. et al. Grupos genéticos e graus de acabamento sobre qualidade da carne de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 391-402, 2012.

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

MATSUHASHI, T. et al. Effects of bovine fatty acid synthase, stearoylcoenzyme Adesaturase, 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**, Berlin, v. 72, n. 6, p. 498-504, 2001.

MILLEN, D. D. et al. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 10, p. 3427-3439, Oct. 2009.

MISSIO, R.L. et al. Características da carcaça e da carne de tourinhos terminados em confinamento, recebendo diferentes níveis de concentrado na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.39, n.7, p.1610-1617, 2010.

MOREIRA, F.B. et al. Evaluation of carcass characteristics and meat chemical composition of *Bosindicus* and *Bosindicus* x *Bostaurus* crossbred steers finished in pasture systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.46, n.4, p.607-614, 2003.

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

OLIVEIRA, D. M. de. **Expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo de bovinos de corte alimentados com fontes de lipídeos**. 2013. 145 p. Tese (Doutorado em Produção e Nutrição de Ruminantes) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

OLIVEIRA, D. M. de et al. Expression of genes involved in lipid metabolism in the muscle of beef cattle fed soybean or rumen-protected fat, with or without monens in supplementation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 12, p. 5426-5436, Dec. 2014.

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. 2/3, p. 285-292, July 2000.

PLATTTER, W.J. et al. Relationships of consumer sensory ratings, marbling score, and shear force value to consumer acceptance of beef strip loin steaks. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, n. 11, p. 2741-2750, 2003.

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.

RUBIANO, G.A.G. et al. Desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos superprecoces das raças Canchim, Nelore e seus mestiços. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.38, n.12, p.2490-2498, 2009.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Stearyl-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 and Metabolic Care**, London, v. 9, n. 2, p. 84-88, Mar. 2006.

SANOSAKA, M. et al. A combination of octanoate and oleate promotes in vitro differentiation of porcine intramuscular adipocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, New York, v.149, n. 2, p. 285-292, Feb. 2008.

SEMENKOVICH, C. F. et al. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.264, p. 9030-9038, 1989.

SHIMANO, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), transcriptional regulators of lipid synthetic genes. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 439-452, Nov. 2001.

SMITH, S. B. et al. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. **Animal Science Journal**, Berlin, 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, p. E72-E82, Apr. 2009. Supplement.

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.

TAKADA, I.; KOUZMENKO, A. P.; KATO, S. Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. **Nature Reviews Rheumatology**, London, v. 5, n. 8, p. 442-447, 2009.

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.

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

WAKU, T.; SHIRAKI, T.; OYAMA, T. Structural insight into PPAR $\gamma$  activation through covalent modification with endogenous fatty acids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 385, n. 1, p. 188-199, 2009.

WANG, R.; ECKEL, H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolic**, Bethesda, v. 297,n. 2, p. E271-E288, Aug. 2009.

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. 2008.

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, 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.

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 Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 13, p. 9800-9807, 2001.

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.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**ARTIGO 1 A subespécie e a dieta afetam a expressão de genes envolvidos  
no metabolismo lipídico e a composição química do músculo de  
bovinos de corte**

**Artigo formatado segundo as normas do periódico Journal of Animal  
Science.**

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar composição centesimal e expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* (LD) de tourinhos Nelore e Angus alimentados com grão de milho inteiro ou silagem de milho mais concentrado. Foram utilizados 34 animais, com peso vivo médio inicial de  $381,2 \pm 11,8$  kg, em um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 (2 raças e 2 dietas). A dieta tradicional continha 30% de silagem de milho e 70% de um concentrado à base de milho e farelo de soja. A dieta com grão de milho inteiro continha 85% de grão de milho inteiro e 15% de um *pellet* comercial a base de farelo de soja e minerais. Após o abate, foram coletadas amostras do músculo LD entre 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas para análise da composição centesimal e expressão gênica. A expressão gênica foi analisada utilizando a técnica de RT-qPCR. A carne de animais Angus apresentou maior extrato etéreo em relação aos animais da raça Nelore ( $P < 0,05$ ). No entanto não houve efeito ( $P > 0,05$ ) das dietas sobre o teor de EE na carne. O músculo LD dos animais Nelore alimentados com silagem de milho apresentaram maior expressão dos genes lipoproteína lipase (*LPL*), proteína de ligação ao ácido graxo 4 (*FABP4*), Acetil coA

carboxilase alfa (*ACACA*), esteroil coA dessaturase (*SCD1*) e carnitina palmitoil transferase 2 (*CPT2*) ( $P < 0,01$ ). Porém a expressão do gene ácido graxo sintase (*FAS*) foi maior no músculo LD de animais Nelore ( $P < 0,01$ ) e de animais recendo grão de milho inteiro ( $P < 0,01$ ), e a expressão do acil-coenzima A oxidase 1 (*ACOX*) foi maior para os Angus alimentados com grão de milho inteiro ( $P = 0,04$ ). O músculo LD dos animais Nelore apresentaram maior expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissomas  $\alpha$  (*PPAR $\alpha$* ) ( $P < 0,01$ ) e menor expressão dos elementos reguladores de esterol ligados as proteínas (*SREBP-1c*) ( $P = 0,03$ ). Em relação às dietas, a expressão de *PPAR $\alpha$*  aumentou quando os animais foram alimentados com grão de milho inteiro e o inverso ocorreu para a expressão de *SREBP-1c*. Já os animais Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado apresentaram maior expressão do *PPAR $\gamma$*  ( $P < 0,01$ ). Animais da raça Angus apresentaram maior deposição de gordura intramuscular. Todavia, a dieta com grão de milho inteiro não foi capaz de aumentar a gordura de marmoreio devido à redução na expressão da *SREBP-1c*.

Palavras-chave: alto grão, fatores de transcrição, PPARs, raça, RNAm, SREBP.

## ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the centesimal composition and the expression of genes involved in the lipid metabolism of the *longissimus dorsi* (LD) muscle of Nellore and Aberdeen Angus young bulls fed whole shelled corn (WSC) and a maize silage diet. Thirty-four animals with average initial body weight of  $381.2 \pm 11.87$  kg, in a completely randomized design arranged in a  $2 \times 2$  factorial scheme (2 breeds and 2 diets). The traditional diet contained 30% of corn silage and 70% of a corn and soybean meal-based concentrate. The diet with WSC contained 85% whole shell corn and 15% of a soybean meal and mineral-based commercial *pellet*. After slaughter, we collected samples from the LD muscle, between the 12th and 13th ribs, for centesimal composition and gene expression analyses. Gene expression was analyzed using the qRT-PCR technique. The meat from Angus animals showed higher ether extract when compared to Nellore animals ( $P < 0.05$ ). However, there was no effect ( $P > 0.05$ ) of the diets over ether extract in the meat. The LD muscle of the Nellore animals fed corn silage presented higher expression of the lipoprotein lipase (*LPL*), fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), acetyl CoA carboxylase alpha (*ACACA*), stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*)



and carnitine palmitoyltransferase 2 (*CPT2*) genes. However, the expression of the fatty acid synthase (*FAS*) gene was higher in the LD muscle of Nellore animals ( $P<0.01$ ) and of animals fed WSC ( $P<0.01$ ). The expression of acyl-coenzyme A oxidase 1 (*ACOX*) was higher for Angus animals fed WSC ( $P=0.04$ ). The LD muscle of Nellore animals presented higher expression of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (*PPAR $\alpha$* ) ( $P<0.01$ ), and lower expression of sterol regulatory element-binding protein-1c (*SREBP-1c*) ( $P= 0.03$ ). Regarding the diets, the expression of *PPAR $\alpha$*  increased when the animals were fed WSC and the opposite occurred for the expression of *SREBP-1c*. The Angus animals fed corn silage in addition to concentrate presented higher expression of the *PPAR $\gamma$*  ( $P<0.01$ ). Animals of the Angus breed showed greater deposition of intramuscular fat. However, the diet with WSC was incapable of increasing fat marbling due to the decreased expression of *SREBP-1c*.

Keywords: breed, mRNA, PPARs, SREBP, transcription factors, whole shelled

## 1 INTRODUÇÃO

Em bovinos, a deposição de lipídeos é reflexo da nutrição, do grupo genético utilizado e da biohidrogenação ruminal. Tem se observado que animais *Bos taurus* apresentam maior marmoreio comparado aos *Bos indicus* (Elzo et al., 2012). Já em relação à nutrição, dietas com grão de milho inteiro podem fornecer maior aporte de propionato e, conseqüentemente, glicose para a síntese de gordura intramuscular (Gilbert et al., 2003), elevando assim o teor de extrato etéreo na carne.

Porém dietas com baixa concentração de forragem podem causar redução no pH, o que pode alterar a microbiota do rúmen, causando mudanças nas vias da biohidrogenação, tendo como principal intermediário o ácido linoleico conjugado C18:2 trans10-cis12 (Bauman and Griinari, 2003). O aumento do C18:2 trans10-cis12 reduz os níveis de RNAm do *SREBP-1c* e *PPAR $\gamma$* , que conseqüentemente reduz a síntese de novo, por reduzir a atividade das enzimas chaves desse processo (Obsen et al., 2012), reduzindo assim o marmoreio da carne dos animais.

Com isso, há enorme interesse na manipulação da composição química da carne por meio da regulação de sua biossíntese. Para

compreensão desses mecanismos, a avaliação do efeito da nutrição sobre a expressão dos genes (nutrigenômica) é de grande relevância.

Diante disso, hipotetizamos que os animais alimentados com a dieta com grão de milho inteiro apresentariam maior gordura intramuscular, pois dietas com altos teores de grãos proporcionariam maior produção de propionato no rúmen e maior aporte de glicose para o animal, elevando assim o teor de extrato etéreo na carne.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar como a expressão gênica influencia a composição química do músculo de tourinhos Nelore e Angus alimentados com uma dieta sem forragem e com grão de milho inteiro ou uma dieta com silagem de milho mais concentrado na proporção de 30:70.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram submetidos à apreciação e aprovados pela Comissão de ética e Bem- Estar Animal da Universidade Federal de Lavras (protocolo é 002/2013).

## 2.1 Animais, dietas e abate

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. Foram utilizados 14 tourinhos da raça Nelore e 14 da raça Aberdeen Angus, com peso vivo médio inicial de  $378,4 \pm 8,7$  kg. Os animais foram confinados em baias individuais cobertas, com área de 6 m<sup>2</sup>, piso de concreto com camas de areia, comedouros individuais e bebedouros comuns a duas baias.

As dietas experimentais (Tabela 1) foram fornecidas *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 07h30 e 15h30. Metade dos animais de cada grupo genético recebeu a dieta com silagem de milho mais concentrado (30% de silagem de milho e 70% de concentrado) e a outra metade a dieta com grão de milho inteiro (85% de grão de milho inteiro e 15% de um pellet comercial, como fonte de proteína e minerais). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2, com quatro tratamentos e sete repetições por tratamento: Nelore recebendo dieta com silagem de milho mais concentrado (NSMC); Nelore recebendo dieta com grão de milho inteiro (NGMI); Aberdeen Angus recebendo dieta com silagem de milho mais concentrado (ASMC) e Aberdeen Angus recebendo dieta com grão de milho inteiro (AGMI).

O período experimental foi de 82 dias, precedidos de 28 dias de adaptação às instalações e dieta, no qual os animais receberam quantidades decrescentes de silagem de milho (sistema *step up*) até a sua retirada por completo.

O abate dos animais foi feito utilizando a técnica de concussão cerebral para insensibilização, seguida de secção da veia jugular, esfolagem e evisceração. Após a esfolagem foram retiradas amostras do músculo *Longissimus dorsi* da meia-carcaça esquerda na altura da 13<sup>a</sup> costela, em direção cranial, embaladas em papel alumínio e transportadas em nitrogênio líquido para análise de expressão gênica. Ao chegar ao laboratório essas amostras foram armazenadas a -80°C.

Após 24 horas de refrigeração das carcaças, foram retiradas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, com 2,54 cm de espessura, da meia-carcaça esquerda na altura da 13<sup>a</sup> costela, em direção cranial. As amostras foram armazenadas a temperatura de -20°C e posteriormente utilizadas para avaliação da composição centesimal.

## 2.2 Composição centesimal

Para a avaliação da composição centesimal, as amostras de carne foram liofilizadas até a obtenção de amostras homogêneas e livres de

umidade. A análise de proteína bruta foi quantificada pela análise de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (método 920,87;(AOAC, 1990)) o extrato etéreo extraído pelo método de Soxhlet ( método 920,85; (AOAC, 1990)), a umidade em estufa a 105°C ( método 9341,01; (AOAC, 1990)) até a obtenção de peso constante e as cinzas, em mufla, à 600°C( método 924,05; (AOAC, 1990)) .

### 2.3 pH ruminal

O pH ruminal foi mensurado utilizando o sistema Kahnebolus (KB1000; KahneLtd., Auckland, New Zealand) no dia anterior ao abate. O sistema foi composto por sondas de Kahnebolus e um receptor sem fio (433 MHz) conectado ao computador e operado pelo sistema KahneV5.2.3 software (KahneLtd.), como descrito por Kaur et al. (2010). O aparelho foi calibrado em pH 4.0 e 7.0 a 40°C e em seguida ajustado para aferir o pH a cada 10 minutos, no total de 24 horas (144 mensurações). As probes foram inseridas ao rúmen via oral, onde a cada 10 minutos os dados foram transmitidos para o computador através de um receptor (Kahne Receiver KR2002). Em seguida os dados foram exportados do software (Kahne System V5.2.4) para planilhas de Excel.

Após o abate dos animais, as sondas foram coletadas e lavadas. Os dados de pH foram analisados da seguinte forma: média de pH, pH mínimo, pH máximo, tempo total abaixo de pH 6,0 e tempo total abaixo de pH 5,5.

#### 2.4 Análises de expressão gênica

O desenho dos *primer* dos genes alvos e de controle endógeno foi realizado através de sequências cadastradas e publicadas no banco de dados público do *Genbank*, plataforma do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (Tabela 2). 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 (<http://www.expasy.ch>). As sequências dos *primers* foram desenhadas utilizando o *software* Oligo Perfect<sup>TM</sup> Designer com base nas sequências obtidas no *Genbank*. Os *primers* para a qPCR (RT-qPCR) foram comercialmente sintetizados (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), com suas sequências.

Para a extração do RNA total as amostras foram homogeneizadas em nitrogênio líquido. Do material homogeneizado, 200 mg de tecido foram coletadas, nas quais adicionou-se 1,2 mL de QIAzol (QIAGEN,

Valencia, CA, EUA), com posterior agitação em vortex. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, sendo posteriormente adicionado 240  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, agitadas e levadas a centrífuga por 15 minutos a 14.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para uma segunda lavagem. Novamente o sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol. As amostras foram mantidas por um período de 1 hora à temperatura de -20°C, em seguida, foram centrifugadas por 25 minutos a 14.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol a 75%, seguido de nova centrifugação por 8 minutos à 10.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o etanol a 75% foi descartado, o *pellet* foi seco a temperatura ambiente e ressuscitado em 20  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. Após estes procedimentos as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

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  $\mu\text{L}$  da enzima DNase turbo e água livre de DNase/RNase para completar o volume de 25  $\mu\text{L}$ . Essa reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente adicionou-se 2,5  $\mu\text{L}$  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 A260 nm com o objetivo de avaliar a quantidade (ng/μL) e qualidade (260/280 e 260/230) do RNA.

A síntese de cDNA foi feita com *Kit High-Capacity DNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Primeiramente, o RNA foi preparado a uma concentração de 1μg 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<sup>TM</sup> Reverse*

*Transcriptase* e água para um volume final de 10 µL/amostra. Para cada solução preparada de 10 µL de RNA a 1µg, foram acrescentados 10 µL desse mix. Os tubos foram submetidos ao termociclador MultiGene<sup>TM</sup>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 segundos 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 CTs (Ciclo *Threshold*) obtidos pela expressão dos genes de controle endógeno  $\beta$ -actina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

O CT foi avaliado 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 foram aproximadamente iguais (Tabela 2). 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 permitiu a definição da concentração de cDNA utilizada em cada reação, a qual foi de 10 ng/ $\mu$ L. A concentração de cada *primer* foi de 1,5  $\mu$ M.

Os níveis de expressão relativos foram calculados de acordo com o método descrito por Pfaffl(2001) que se baseia nos valores de Ct que são corrigidos para a eficiência de amplificação para cada par de *primers*.

## 2.5 Análise estatística

Os dados de composição química foram analisados utilizando o procedimento GLM do Software SAS versão 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC), com tratamentos como efeito fixo. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para analisar a normalidade dos dados. Quando os dados de expressão gênica não apresentaram distribuição normal, os dados foram transformados utilizando o procedimento RANK do SAS 9.3. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para determinar as diferenças estatísticas entre as médias dos diferentes tratamentos, por meio do procedimento GLM do SAS 9.3. Os coeficientes da correlação de Pearson foram calculados utilizando o procedimento CORR do SAS 9.3. A correlação foi baseada em valores individuais de cada animal, independente dos tratamentos submetidos. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Consumo, ganho de peso e pH ruminal

Animais da raça Angus apresentaram maior consumo de matéria seca (13,7 e 9,9 kg/dia  $P < 0,01$ ) e maior peso de abate (543,4 e 456,6  $P < 0,01$ ) que aos animais Nelore. Os animais alimentados com grão de milho inteiro apresentaram menor pH ruminal ( $P < 0,04$ ) em relação aos animais alimentados com silagem de milho mais concentrado, porém os tourinhos Angus alimentados com grão de milho inteiro permaneceram menos tempo em pH menor que 5,5 quando comparados aos Nelore alimentados com grão de milho inteiro.

#### 3.2 Composição centesimal

O músculo LD dos animais Angus apresentaram maior teor de extrato etéreo em relação ao músculo dos animais Nelore (Tabela 3), o que caracteriza um maior marmoreio para essa raça. Em relação aos outros componentes do músculo: umidade, cinzas e proteína; tanto as dietas quanto as raças estudadas não influenciaram suas concentrações.

### 3.3 Expressão gênica

Observou-se maior expressão de *PPAR $\alpha$*  (Figura 1A) no músculo LD dos animais Nelore e menor expressão da *SREBP-1c* (Figura 1C). Em relação às dietas, a expressão de *PPAR $\alpha$*  aumentou quando os animais foram alimentados com grão de milho inteiro e o inverso ocorreu para a expressão de *SREBP-1c*. Dessa forma, fica demonstrado um antagonismo entre estes dois genes, o que pode ser comprovado pela alta correlação negativa entre os dois (Tabela 4). Houve interação entre raça e dieta sobre a expressão de *PPAR $\gamma$* , sendo que a dieta com grão de milho resultou em maior expressão deste gene nos animais Angus e menor expressão nos Nelore (Figura 1B). Dos três fatores de transcrição avaliados o *SREBP-1c* foi aquele que apresentou maior correlação com os outros genes envolvidos no metabolismo lipídico.

As expressões gênicas de *LPL* e *FABP4* foram maiores nos músculos LD dos animais Nelore alimentados com dieta contendo volumoso (Figuras 2A e 2B), não havendo diferenças na expressão destes genes no músculo dos animais Angus. Portanto, os genes *LPL* e *FABP4* apresentam funções que se complementam, o que é comprovado com a forte correlação entre os dois (Tabela 4). Todavia, apesar dos efeitos

semelhantes sobre a expressão destes genes, verifica-se que a magnitude nas diferenças das expressões foi superior para o gene *FABP4*. Os genes *ACACA*, *SCD1* e *SREBP-1c* também apresentaram correlação positiva com a *LPL* e *FABP4*. Além disso, o gene *FABP4* apresentou correlação positiva com o *PPAR $\gamma$* .

As expressões dos genes *ACACA* e *SCD1* foram maiores no músculo LD dos animais Nelore alimentados com silagem de milho mais concentrado e menores para os animais Nelore alimentados com grão de milho inteiro (Figura 3A e 3C), resultados estes semelhantes às expressões de *LPL* e *FABP4*. Por outro lado, a expressão do gene *FAS* apresentou resultado diferente, tendo sido maior no músculo LD dos animais alimentados com a dieta com grão de milho inteiro (Figura 3B). Além disso, animais Nelore, independente da dieta, apresentaram maior expressão de *FAS*, o que demonstra que a regulação da síntese de RNAm que codificará as enzimas envolvidas na síntese “*de novo*” de ácidos graxos é diferente.

Similar aos resultados da *ACACA* e da *SCD*, a expressão do gene que codifica a *CPT2* foi maior em animais Nelore alimentados com silagem de milho mais concentrado (Figura 4A). Por outro lado, a

expressão de *ACOX* foi maior no músculo LD dos Angus alimentados com grão de milho inteiro (Figura 4B).

#### 4 DISCUSSÃO

O maior teor de extrato etéreo na carne dos animais da raça Angus pode ser explicado pelo fato desses animais terem apresentado maior consumo de matéria seca (13,7 e 9,9 kg/dia  $P < 0,01$ ) e maior peso de abate que os tourinhos Nelore (543,4 e 456,6  $P < 0,01$ ), ou seja, animais que apresentam elevado consumo de nutrientes e energia apresentam altas taxas de crescimento, que resultarão em maior deposição de gordura. Outra explicação tem relação com o porte dos animais, sendo a raça Angus de pequeno porte e o Nelore uma raça de médio porte. Com isto, os animais Angus começam a depositar gordura mais cedo (Diniz, 2013).

O extrato etéreo possui correlação positiva com o marmoreio, com isso, à medida que se aumenta o escore de marmoreio, aumenta-se o teor de extrato etéreo na carne (Savell et al., 1986; Moore et al., 2010). Portanto, de acordo com Dow et al. (2011) e com base nos valores de extrato etéreo, as carnes dos animais Angus e Nelore seriam classificadas como carnes com pequeno marmoreio.



Di Constanzo (2004) avaliando a qualidade da carne de diferentes raças de corte encontrou, para as raças britânicas Angus e Hereford, elevada espessura de gordura subcutânea e grau de marmoreio. Já as raças zebuínas apresentaram boa espessura de gordura subcutânea, mas a carne bem menos marmorizada que as raças britânicas.

Segundo Paulino, et al. (2013), o uso de raças de maturidade precoce torna-se alternativa para favorecer o acúmulo de gordura intramuscular, uma vez que, o teor de gordura intramuscular da carne é um fator altamente desejável pelo mercado consumidor por apresentar relação direta com sabor e suculência (Emerson et al., 2013).

Apesar dos músculos LD dos animais Nelore apresentarem menor extrato etéreo que os Angus, os mesmo ainda apresentam maior teor comparado com os resultados médios da literatura que são em torno de 2% (Vaz et al., 2001; Moreira et al., 2003; Rubiano et al., 2009; Andrade et al., 2010).

Era hipótese deste estudo que os animais alimentados com a dieta de grão de milho inteiro apresentariam maior teor de gordura intramuscular, pois segundo Smith et al. (2009), dietas com elevada concentração energética são importantes para a produção de carnes com

alto grau de marmoreio, já que o tecido adiposo intramuscular parece ser mais sensível à insulina, quando comparado ao tecido adiposo subcutâneo. Sendo assim, alimentos que aumentam a produção de propionato, como o milho, tem maior capacidade glicogênica e insulinogênica, o que poderia aumentar a deposição de gordura intramuscular (Gilbert et al., 2003). Todavia, esta hipótese não pôde ser comprovada e uma explicação seriam os resultados de expressão gênica.

Os animais alimentados com grão de milho inteiro apresentaram menor expressão da *SREBP-1c* devido essas dietas causarem redução no pH do rúmen (Tabela 5), o que pode resultar em alteração na microbiota do rúmen e mudança nas vias da biohidrogenação, tendo como principal intermediário o ácido linoleico conjugado C18:2 trans10-cis12, ao invés do C18:2 cis9-trans11 (Jenkins and Harvatine, 2014). O aumento do C18:2 trans10-cis12 reduz os níveis de RNAm do *SREBP-1c*, que consequentemente reduz a síntese de novo, por reduzir a atividade das enzimas chaves desse processo (Obsen et al., 2012). Corroborando com esta explicação, o gene *SREBP-1c* apresentou correlação positiva com *ACACA* e *SCD1* (Tabela 4), genes estes responsáveis por codificar as enzimas chave da síntese “*de novo*” (Vyas et al., 2014), e agir na

dessaturação dos ácidos graxos captados na corrente sanguínea. Além da redução da expressão de *SREBP-1c*, a dupla ligação na configuração cis-12 parece ser estrutura chave característica na inibição da atividade da SCD, principalmente quando associada a uma ligação trans-10 (Park et al., 2000). Portanto, a redução no pH ruminal e alterações na rota da biohidrogenação explicam porque a hipótese da dieta com grão de milho inteiro não proporcionar maior marmoreio no músculo LD.

Jenkins and Harvatine (2014) também encontraram redução na expressão da *SREBP-1c* na glândula mamária quando os animais foram alimentados com dietas ricas em grãos. Da mesma forma, em pré-adipócitos de suínos, o C18:2 trans10-cis12 diminuiu a síntese de RNAm do *SREBP-1c* (Brandebourg and Hu, 2005).

Além de provocar menor pH ruminal, a dieta com grão de milho inteiro apresentou maior teor de AGPI e segundo Botolin et al. (2006), os AGPI inibem a transcrição de genes envolvidos na lipogênese no fígado, por rapidamente reduzir os fatores transcricionais ligados ao gene *SREBP*, o que conseqüentemente reduz a ativação do gene que codifica as enzimas lipogênicas.

Animais da raça Angus apresentaram maior expressão da *SREBP-1c* o que resultou em maior porcentagem de gordura intramuscular. A maior síntese de gordura no músculo dos animais Angus pode ser também devido ao aumento da expressão do *PPAR $\gamma$* , uma vez que este gene foi o único que apresentou correlação positiva com o teor de extrato etéreo no músculo LD (Tabela 6). A maior expressão do *PPAR $\gamma$*  no músculo LD dos tourinhos Angus alimentados com grão de milho inteiro, pode ser devido ao menor tempo em pH ruminal abaixo de 5,5 desses animais, quando comparado aos Nelore alimentados com grão de milho inteiro (Tabela 5), que apresentaram menor expressão do *PPAR $\gamma$* . O maior tempo dos animais Nelore em pH mais baixo pode ter favorecido a produção do CLA trans10-cis12 que age de forma antagônica ao *PPAR $\gamma$*  (Ramiah et al., 2014). O *PPAR $\gamma$*  é um fator de transcrição essencial para adipogênese (Obsen et al., 2012), portanto, redução na sua expressão, assim como de *SREBP-1c*, pode diminuir a expressão dos genes relacionados à síntese “*de novo*” (Vyas et al., 2014) e com isso reduzir a gordura intramuscular. Porém, no presente estudo, não houve correlação significativa de *PPAR $\gamma$*  com os genes *ACACA* e *SCD*, e verificou-se apenas uma correlação negativa com o gene *FAS*. Isso pode estar associado à correlação negativa

entre o *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$* , já que a *FAS* teve correlação positiva com *PPAR $\alpha$*  (Tabela 4). Outro fator importante é que a dieta de alto grão teve maior concentração de AGPI, sendo este ativador do *PPAR $\gamma$*  (Bionaz et al., 2012). Graugnard et al. (2010) encontraram que Angus alimentados com alto amido por 56 dias em confinamento apresentaram diferenciação dos pré-adipócitos e aumentou a síntese “*de novo*”, por aumentar a expressão do *PPAR $\gamma$* .

A maior concentração de AGPI na dieta de grão de milho inteiro também explica o aumento na expressão de *PPAR $\alpha$*  (König et al., 2008; Kersten, 2014). 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, sendo os AGPI com maior afinidade ao *PPAR $\alpha$*  (Oswal et al., 2013). A maior taxa de passagem dessa dieta pelo rúmen também reduziria a biohidrogenação e favoreceria o maior escape de AGPI para o intestino delgado.

A correlação negativa entre as isoformas *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  pode ser explicado devido ao local de atuação de cada um, sendo o *PPAR $\gamma$*

mais expresso nos adipócitos (Kersten, 2014), e o *PPAR $\alpha$*  no fígado e no músculo (Bionaz et al., 2013).

A maior expressão dos genes *LPL* e *FABP4* no músculo LD dos animais Nelore alimentados com silagem de milho mais concentrado pode ser devido à diferença na composição de ácidos graxos absorvidos no intestino delgado e disponíveis para captação pelo tecido muscular, pois os teores de EE na dieta foram semelhantes (Tabela 1). Portanto, a menor concentração de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) presentes na dieta com a silagem de milho pode ter sido responsável pela maior expressão destes genes no músculo dos animais Nelore. Oliveira et al. (2014) encontraram que a síntese de RNAm que codifica a *LPL* e *FABP4* correlaciona-se positivamente com o ácido esteárico e este ácido graxo estava em maior concentração na dieta com silagem de milho mais concentrado. Além disso, a dieta com silagem de milho mais concentrado apresenta, devido ao teor de FDN, maior tempo de retenção no rúmen, o que favorece a biohidrogenação e a absorção de ácidos graxos saturados.

O gene *SCD1* apresentou correlação positiva com a *LPL* e *FABP4* (Tabela 6), demonstrando que a expressão deste no tecido muscular está diretamente associada a mecanismos como a quebra de triglicerídeos pela

LPL e, conseqüentemente, o carreamento da molécula de ácido graxo para o adipócito via FABP4 (Jurie et al., 2007).

A maior quantidade de triglicérides no sangue aumenta a atividade da enzima LPL, o que pode ativar a FABP4, que é responsável por facilitar a entrada destas moléculas na célula (Yang et al., 2011), mostrando que a LPL e FABP4 apresentam funções que se complementam como comprovado nos dados de expressão gênica e no estudo de correlação realizado (Tabela 4). Os efeitos sobre a expressão de *FABP4* também podem estar associados diretamente à expressão de *PPAR $\gamma$* , uma vez que, estes apresentaram correlação positiva (Tabela 4). Em análise comparativa da região promotora do gene *FABP4*, Shin et al. (2009) revelaram que existem dois sítios de ligação reservados ao *PPAR $\gamma$*  em humanos, ratos, suínos, cães e bovinos. Todavia os resultados da expressão deste gene não foram similares ao *PPAR $\gamma$* , o que demonstra que há outros mecanismos atuando na ação dos fatores de transcrição.

A expressão de *FAS* apresentou resultado semelhante à expressão de *PPAR $\alpha$*  e os dois genes apresentaram correlação positiva entre eles, o que confirma que o *PPAR $\alpha$*  atua na síntese de ácidos graxos no músculo (Bionaz et al., 2013). Segundo Dong et al. (2014), as expressões da *FAS*

e da *ACACA* não são reguladas coordenadamente, o que é comprovado pelos resultados deste estudo, em que a expressão destes genes tiveram comportamento diferentes dependendo das raças e dietas estudadas.

A deposição de lipídeos nos animais resulta do equilíbrio entre o lipídeo absorvido a partir da dieta (*LPL* e *FABP4*), síntese de novo (*ACACA* e *SCD*) e o catabolismo lipídico através da  $\beta$ -oxidação (*CPT2* e *ACOX*) (Dong et al., 2014). Portanto, mudanças no equilíbrio entre síntese e degradação pode ocasionar aumento ou redução na gordura intramuscular (Gondret and Hocquette, 2006). Animais Nelore alimentados com silagem de milho apresentaram maior expressão dos genes ligados à síntese (*ACACA* e *SCD*) e à degradação (*CPT2*), caracterizado em animais com maior *turnover* lipídico, o que impossibilitou esses animais de apresentarem maior deposição de gordura intramuscular.

Bionaz et al. (2012) sugerem que a oxidação de ácidos graxos está relacionada à maior entrada destes no citoplasma pela ação da *FABP4* e consequentemente nas mitocôndrias pela *CPT*. Pode-se observar esse efeito através da correlação positiva (Tabela 4) entre *FABP4* e *CPT2*.



Os animais Angus alimentados com a dieta com grão de milho inteiro apresentaram maior quantidade de RNAm do gene *ACOX*. Uma explicação possível seria a ativação deste gene pelo o *PPAR $\gamma$* , já que estes apresentaram correlação positiva (Tabela 4) e descreve uma possível ação deste gene em mecanismos de oxidação de ácidos graxos no músculo. O aumento da expressão gênica do *ACOX* indica maior nível de oxidação celular presente no tecido. Portanto, fica evidente que o *PPAR $\gamma$*  atua tanto em processo de adipogênese, como no catabolismo de ácidos graxos.

## 5 CONCLUSÃO

Animais da raça Angus apresentam maior deposição de gordura intramuscular. Todavia, a dieta com grão de milho inteiro não foi capaz de aumentar a gordura de marmoreio devido a redução na expressão da *SREBP-1c*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, P. L. et al. 2010. Qualidade da carne maturada de bovinos Red Norte e Nelore. Revista Brasileira de Zootecnia 39: 1791-1800.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analysis Chemists, Arlington, VA.

- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review Nutrition* 23: 203-227.
- Bionaz, M., S. Chen, M. J. Khan, and J. J. Loo. 2013. Functional Role of PPARs in Ruminants: Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation. *PPAR Research*: 28 págs.
- Bionaz, M., B. J. Thering, and J. J. Loo. 2012. Fine metabolic regulation in ruminants via nutrient–gene interactions: saturated long-chain fatty acids increase expression of genes involved in lipid metabolism and immune response partly through PPAR- $\alpha$  activation. *British Journal of Nutrition* 107: 179-191.
- Botolin, D., Y. Wang, B. Christian, and D. B. Jump. 2006. Docosahexaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. *Journal of Lipid Research* 47: 181-192.
- Brandebourg, T. D., and C. Y. Hu. 2005. Isomer-specific regulation of differentiating pig preadipocytes by conjugated linoleic acids. *J. Anim. Sci.* 83: 2096-2105.
- DiConstanzo, A. 2004. Fatores nutricionais e de manejo que afetam a qualidade da carcaça. In: *Novos enfoques na nutrição e reprodução de bovinos.*, Uberlândia - MG. p 231-246.
- Diniz, F. B. 2013. Desempenho, características de carcaça e da carne de bovinos confinados de diferentes grupos genéticos. Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri Diamantina - MG.
- Dong, G.-F. et al. 2014. Conjugated linoleic acid differentially modulates growth, tissue lipid deposition, and gene expression involved in the lipid metabolism of grass carp. *Aquaculture* 432: 181-191.
- Dow, D. L., B. R. Wiegand, M. R. Eilersieck, and C. L. Lorenzen. 2011. Prediction of fat percentage within marbling score on beef longissimus muscle using 3 different fat determination methods. *J. Anim. Sci.* 89: 1173-1179.
- Elzo, M. A., D. D. Johnson, J. G. Wasdin, and J. D. Driver. 2012. Carcass and meat palatability breed differences and heterosis effects in an Angus–Brahman multibreed population. *Meat Science* 90: 87-92.
- Emerson, M. R., D. R. Woerner, K. E. Belk, and J. D. Tatum. 2013. Effectiveness of USDA instrument-based marbling measurements for categorizing beef carcasses according to differences in longissimus muscle sensory attributes. *J. Anim. Sci.* 91: 1024-1034.
- Gilbert, C. D., D. K. Lunt, R. K. Miller, and S. B. Smith. 2003. Carcass, sensory, and adipose tissue traits of Brangus steers fed casein-formaldehyde-protected starch and/or canola lipid. *J. Anim. Sci.* 81: 2457-2468.

- Gondret, F., and J.-F. Hocquette. 2006. La teneur en lipides de la viande: une balance métabolique complexe. *INRA Prod. Anim.* 19: 327-338.
- Graugnard, D. E., L. L. Berger, D. B. Faulkner, and J. J. Loo. 2010. High-starch diets induce precocious adipogenic gene network up-regulation in longissimus lumborum of early-weaned Angus cattle. *British Journal of Nutrition* 103: 953-963.
- Jenkins, T. C., and K. J. Harvatine. 2014. Lipid Feeding and Milk Fat Depression. *Vet Clin Food Anim* 30: 623-642.
- Kaur, R., S. C. Garcia, A. Horadagoda, and W. J. Fulkerson. 2010. Evaluation of rumen probe for continuous monitoring of rumen pH, temperature and pressure. *Anim. Prod. Sci.* 50: 98-104.
- Kersten, S. 2014. Integrated physiology and systems biology of PPAR $\alpha$ . *Molecular Metabolism* 3: 354-371.
- König, B. et al. 2008. Effects of fish oil and conjugated linoleic acids on expression of target genes of PPAR $\alpha$  and sterol regulatory element-binding proteins in the liver of laying hens. *British Journal of Nutrition* 100: 355-363.
- Moore, C. B. et al. 2010. Establishing an appropriate mode of comparison for measuring the performance of marbling score output from video image analysis beef carcass grading systems. *J. Anim. Sci.* 88: 2464-2475.
- Moreira, F. B., N. E. d. Souza, M. Matsushita, I. N. d. Prado, and W. G. d. Nascimento. 2003. Evaluation of Carcass Characteristics and Meat Chemical Composition of *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* Crossbred Steers Finished in Pasture Systems. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY* 46: 609-616.
- Obsen, T. et al. 2012. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases de novo lipid synthesis in human adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23: 580-590.
- Oliveira, D. M. et al. 2014. Expression of genes involved in lipid metabolism in the muscle of beef cattle fed soybean or rumen-protected fat, with or without monensin supplementation. *J. Anim Sci.*
- Oswal, D. P. et al. 2013. Divergence between human and murine peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand specificities. *Journal of Lipid Research* 54: 2354-2365.
- Park, Y. et al. 2000. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486: 285-292.
- Paulino, P. V. R., M. S. Duarte, and I. M. d. Oliveira. 2013. Aspectos zootécnicos determinantes da qualidade de carne. In: *II Simpósio Brasileiro de Produção de Ruminantes*, Itapetinga - Bahia. p 8-37.

- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Ramiah, S. K., G. Y. Meng, T. Sheau Wei, Y. Swee Keong, and M. Ebrahimi. 2014. Dietary Conjugated Linoleic Acid Supplementation Leads to Downregulation of PPAR Transcription in Broiler Chickens and Reduction of Adipocyte Cellularity. *PPAR Research* 2014: 10.
- Rubiano, G. A. G. et al. 2009. Desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos superprecoces das raças Canchim, Nelore e seus mestiços. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38: 2490-2498.
- Savell, J. W., H. R. Cross, and G. C. Smith. 1986. Percentage ether extractable fat and moisture content of beef longissimus muscle as related to USDA marbling score. *Journal of Food Science* 51: 838-839.
- Shin, J., B. Li, M. E. Davis, Y. Suh, and K. Lee. 2009. Comparative analysis of fatty acid-binding protein 4 promoters: Conservation of peroxisome proliferator-activated receptor binding sites. *J. Anim. Sci.* 87: 3923-3934.
- Smith, S. B. et al. 2009. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J. Anim. Sci.* 87: E72-E82.
- Vaz, F. N. et al. 2001. Qualidade e Composição Química da Carne de Bovinos de Corte Inteiros ou Castrados de Diferentes Grupos Genéticos Charolês x Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30: 518-525.
- Vyas, D., B. B. Teter, P. Delmonte, and R. A. Erdman. 2014. Rosiglitazone, a PPAR- $\gamma$  agonist, fails to attenuate CLA-induced milk fat depression and hepatic lipid accumulation in lactating mice. *Lipids* 49: 641-653.
- Yang, R. et al. 2011. RNAi-mediated germline knockdown of FABP4 increases body weight but does not improve the deranged nutrient metabolism of diet-induced obese mice. *Int J Obes* 35: 217-225.

Tabela 1 Composição percentual, química e proporção (%) dos principais ácidos graxos das dietas experimentais

Ingredientes	Composição (%MS)	
	Silagem de milho + concentrado	Grão de milho inteiro
Milho Grão Inteiro	-	85,0
Premix Proteico <sup>1</sup>	-	15,0
Silagem de Milho	30,0	-
Milho moído	58,0	-
Farelo de Soja	10,0	-
Núcleo Mineral <sup>2</sup>	2,00	-
<b>Nutrientes</b>		
Matéria Seca <sup>3</sup>	57,3	87,8
Proteína Bruta <sup>4</sup>	12,7	14,6
FDN <sup>4</sup>	32,3	23,3
CNF <sup>4</sup>	48,3	54,6
Amido <sup>4</sup>	39,2	49,6
Extrato Étéreo <sup>4</sup>	2,10	2,60
EM <sup>4</sup> (Mcal/Kg MS)	2,54	2,88
<b>Ácidos graxos</b>		
Mirístico (C14:0)	0,54	0,17
Palmitico (C16:0)	17,3	15,8
Estearico (C18:0)	6,13	3,35
Oleico (C18:1 cis 9)	27,3	29,4
Linoleico (C18:2)	42,2	48,3
Linolenico(C18:3)	3,30	2,98
AGS	22,6	16,8
AGI	74,9	83,1
AGMI	28,8	30,9
AGPI	46,2	52,3

PB: 32,0%; NDT: 50,0%; Ca: 45 g/kg; Mg: 7,5 g/kg; P: 11 g/kg; Cu 104 mg/kg; Zn: 344 mg/kg; Se: 0,83 mg/kg; Virginiamicina: 140 mg/kg; Monensina: 120 mg/kg.

<sup>2</sup>Níveis de garantia por quilograma do produto: Ca: 170 g; P 31 g; Na: 155 g; Zn: 2 mg; Cu: 396 mg; Mn: 515 mg; Co: 15 mg; I: 29 mg; Se: 5,4 mg; Vit. A: 111.000 UI; Vit. D3: 22.000 UI; Vit. E: 265 UI; <sup>3</sup> - base da matéria natural, <sup>4</sup> - base da matéria seca.

Tabela 2 Sequência (5' para 3') e eficiência dos *primers* 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>	<b>Amplicon (pb)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Eficiência</b>
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	<i>Receptor ativado por proliferador deperoxissomas <math>\alpha</math></i>	F CAATGGAGATGGTGGACACA R TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	NM_001034036.1	95	0,992	99,2
<i>PPAR <math>\gamma</math></i>	<i>Receptor ativado por proliferador deperoxissomas <math>\gamma</math></i>	F CGACCAACTGAACCCAGAGT R TCAGCGGAAGGACTTTATG	NM_181024.2	83	0,986	99,9
<i>SREBP-1c</i>	<i>Elementos reguladores de esteroil ligados a proteína</i>	F GAGCCACCCTTCAACGAA R TGTCTTCTATGTCGGTCAGCA	NM_001113302.1	88	0,985	94,6
<i>SCD1</i>	<i>EsteroilCoAdessaturase</i>	F TTATTCCGTTATGCCCTTGG R TTGTCATAAGGGCGGTATCC	NM_173959.4	83	0,981	95,8
<i>ACC</i>	<i>Acetil coA carboxilase</i>	F TGAAGAAGCAATGGATGAACC R TTCAGACACGGAGCCAATAA	NM_174224.2	88	0,994	96,6
<i>LPL</i>	<i>Lipoproteína lipase</i>	F CTCAGGACTCCCAGACAC R GTTTTGCTGCTGTGGTTGAA	NM_001075120.1	98	0,990	96,7
<i>FABP4</i>	<i>Proteína de ligação ao ácido graxo</i>	F GGATGATAAGATGGTGCTGGA R ATCCCTTGGCTTATGCTCTCT	NM_174314.2	73	0,994	92,6
<i>FAS</i>	<i>Ácido graxo sintase</i>	F ATCAACTCTGAGGGGCTGAA R CAACAAAACCTGGTGCTCACG	U34794.1	83	0,974	99,5
<i>ACOX</i>	<i>Acil-coenzima A oxidase 1</i>	F GCTGTCCTAAGGCGTTTGTG R ATGATGCTCCCCTGAAGAAA	BC102761.2	83	0,994	99,0
<i>CPT2</i>	<i>Carnitinaipalmitoiltransferase2</i>	F CATGACTGTCTCTGCCATCC R ATCACTTTTGGCAGGGTTCA	BC105423.1	91	0,914	99,9
$\beta$ -actin	$\beta$ -actina	F GTCCACCTTCCAGCAGATGT R CAGTCCGCCTAGAAGCATT	BC142413.1	90	0,996	100,0
<i>GAPDH</i>	<i>Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase</i>	F CGACTTCAACAGCGACTC R TTGTCGTACCAGGAAATGAGC	NM_001034034.1	96	0,998	101,4

Tabela 3 Composição centesimal (%) da carne de tourinhos Nelore e Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)

Variáveis	Nelore		Angus		EPM	P		
	SMC <sup>1</sup>	GMI <sup>2</sup>	SMC <sup>1</sup>	GMI <sup>2</sup>		Raça	Dieta	R <sup>2</sup> D
Umidade (%)	73,7	74,4	73,9	73,5	1,08	0,77	0,88	0,56
Cinzas (%)	1,21	1,23	1,22	1,26	0,15	0,81	0,61	0,87
Proteína (%)	17,1	16,7	17,0	17,2	0,20	0,82	0,88	0,67
Extrato etéreo (%)	4,51	4,11	4,79	5,10	0,39	0,05	0,89	0,27

<sup>1</sup> Dieta contendo 30% de forragem e 70% de concentrado (SMC); <sup>2</sup> dieta com 85% com grãos de milho inteiro e 15% pellete comercial (GI); <sup>3</sup> média dos dias 0, 7, 14 e 21 de maturação

Tabela 4 Coeficiente de correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico no músculo *longissimus dorsi* em tourinhos Nelore e Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)

Genes	<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	<i>SREBP-1c</i>	<i>LPL</i>	<i>FABP4</i>	<i>ACACA</i>	<i>FAS</i>	<i>SCD</i>	<i>CPT</i>
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	<b>-0,33*</b>								
<i>SREBP-1c</i>	<b>-0,62*</b>	0,10							
<i>LPL</i>	0,08	-0,04	<b>0,47*</b>						
<i>FABP4</i>	-0,32	<b>0,54*</b>	<b>0,61*</b>	<b>0,70**</b>					
<i>ACACA</i>	-0,13	-0,10	<b>0,67**</b>	<b>0,73**</b>	<b>0,64*</b>				
<i>FAS</i>	<b>0,80**</b>	<b>-0,47*</b>	<b>-0,46*</b>	0,20	-0,27	0,08			
<i>SCD1</i>	-0,11	0,22	<b>0,62*</b>	<b>0,77**</b>	<b>0,80**</b>	<b>0,70**</b>	-0,01		
<i>CPT2</i>	0,14	0,14	<b>0,51*</b>	<b>0,72**</b>	<b>0,71**</b>	<b>0,76**</b>	0,22	<b>0,78**</b>	
<i>ACOX</i>	0,29	<b>0,80**</b>	-0,02	-0,29	0,25	-0,25	<b>-0,59*</b>	-0,06	-0,11

P<0,001\*\* e P<0,01\* Correlação de Pearson de todos os tratamentos. Número de observações= 28



Tabela 5 Menor pH, pH médio, maior pH e porcentagem do tempo em relação a 24 horas que o pH ruminal permaneceu abaixo de 5,5 e 6,0 em tourinhos Nelores e Angus alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)

pH	Nelore		Angus		SEM	P		
	SMC <sup>1</sup>	GMI <sup>2</sup>	SMC <sup>1</sup>	GMI <sup>2</sup>		Raça	Dieta	B*D
Menor	5,66	5,33	5,29	5,47	0,68	0,39	0,02	0,09
Médio	6,52	5,73	5,92	5,77	0,24	0,19	0,04	0,15
Maior	7,18	6,14	6,53	6,36	0,22	0,58	0,70	0,20
<b>Tempo</b>								
< 5,5	1,29	38,19	24,65	28,84				
< 6,0	20,83	67,01	57,18	60,76				

<sup>1</sup> Dieta contendo 30% de forragem e 70% de concentrado; <sup>2</sup> Dieta com 85% milho grão e 15% pellet comercial

Tabela 6 Coeficiente de correlação de Pearson entre a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e o extrato etéreo (EE%) no músculo *longissimus dorsi* em tourinhos Nelore e Angus

	<i>ACC</i>	<i>ACOX</i>	<i>CPT</i>	<i>FABPP4</i>	<i>FAS</i>	<i>LPL</i>	<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	<i>SCD</i>	<i>SREBP</i>
EE (%)	0,17	0,2	0,12	0,28	-0,31	0,12	-0,21	<b>0,33*</b>	-0,004	0,19

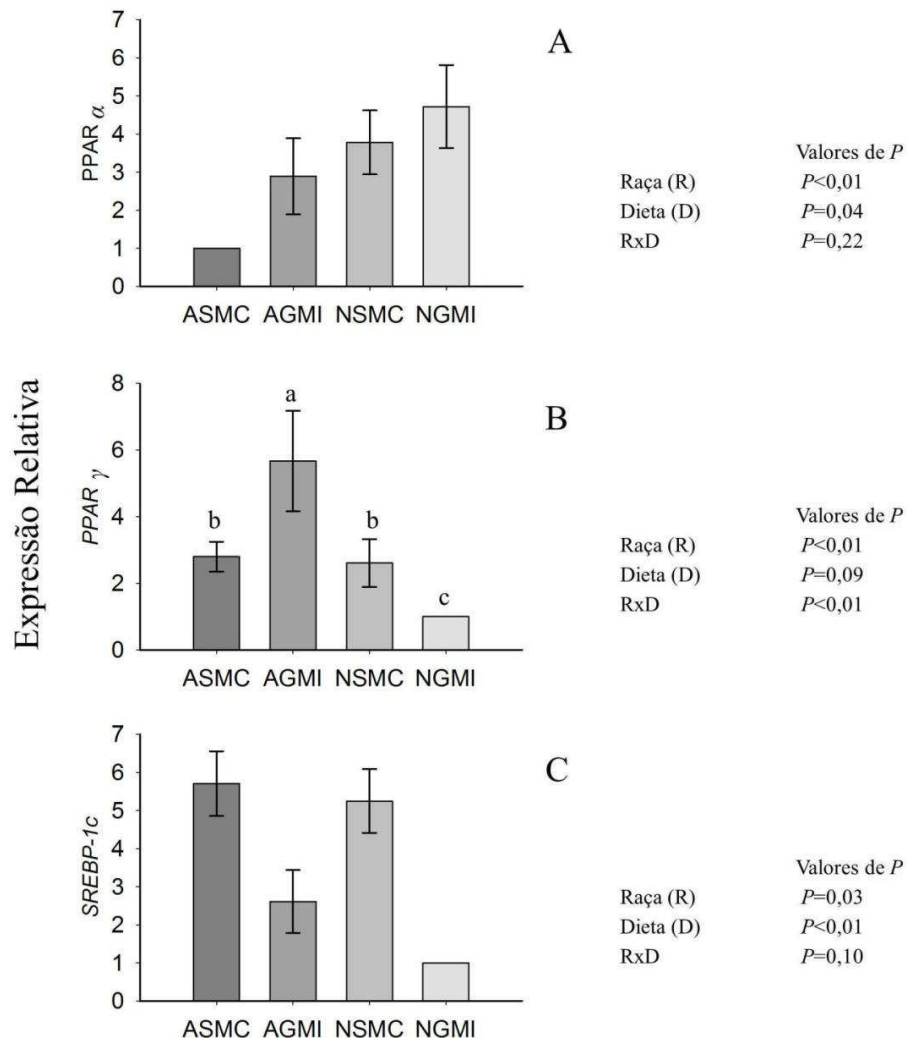


Figura 1 Expressão relativa dos genes PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e SREBP-1c no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)

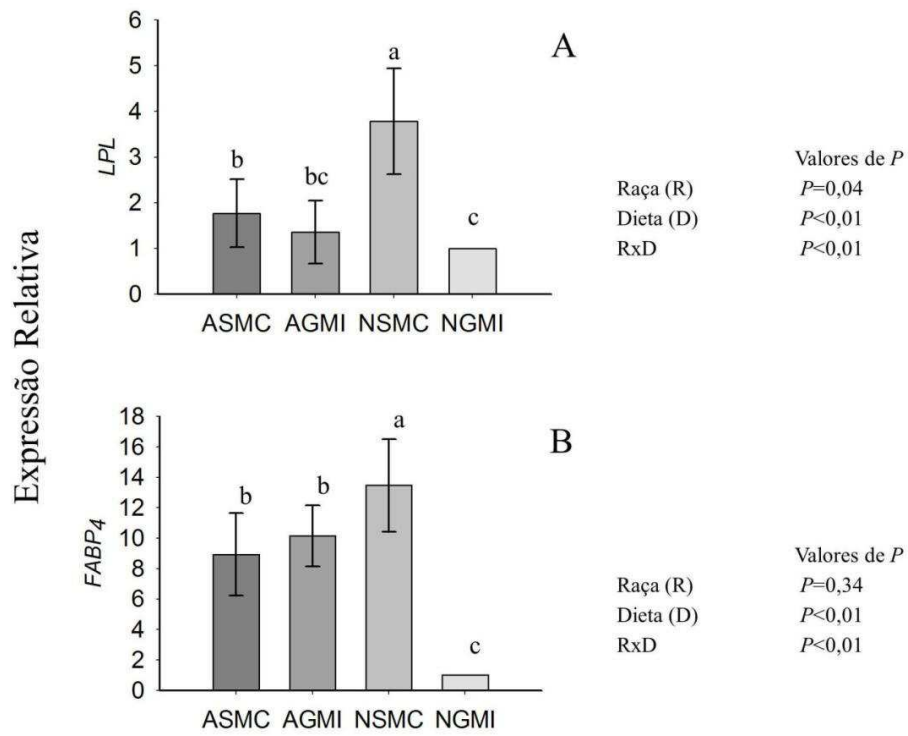


Figura 2 Expressão relativa dos genes LPL e FABP4 no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)

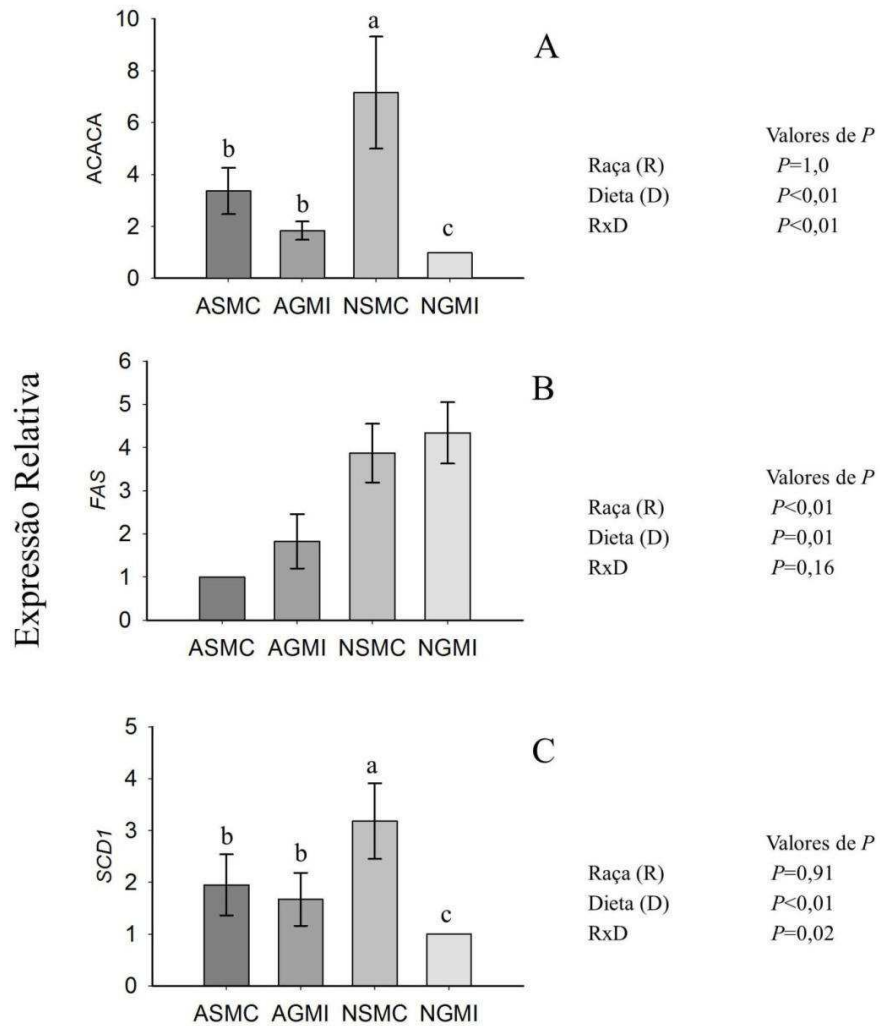


Figura 3 Expressão relativa dos genes *ACACA*, *FAS* e *SCD1* no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)

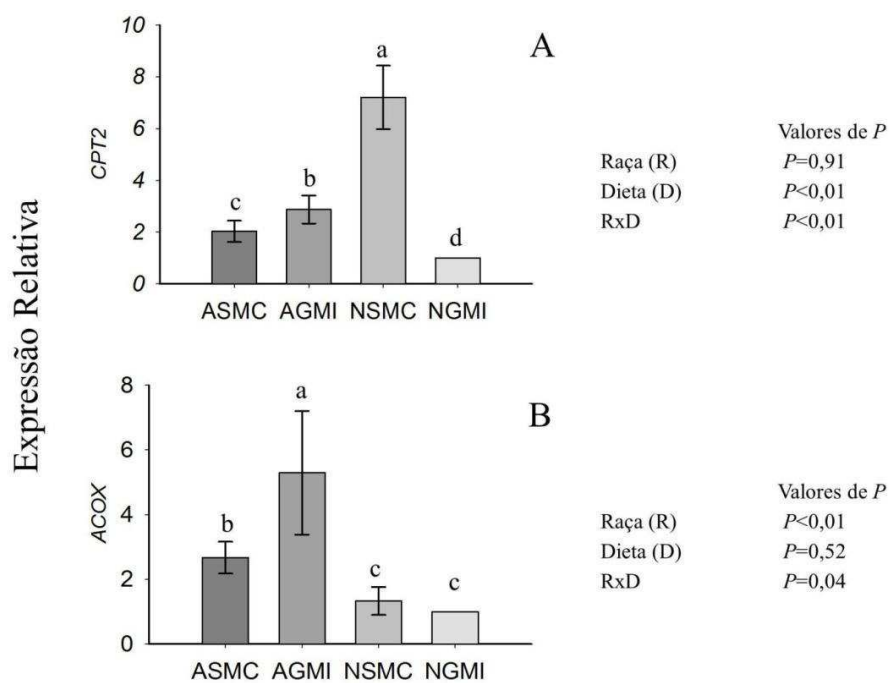


Figura 4 Expressão relativa dos genes *CPT1* e *ACOX* no músculo *longissimus dorsi* de tourinhos da raça Angus (A) e Nelore (N), alimentados com silagem de milho mais concentrado (SMC) e grão de milho inteiro (GMI)

(VERSÃO PRELIMINAR)