



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES ÓLEOS NA DIETA SOBRE AS
EXPRESSÕES DOS GENES *MIOSTATINA* E DE SINALIZADORES DE
ADIPOCITOCINAS NO MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI* DE OVINOS.

PAULO HENRIQUE DE SOUZA

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES ÓLEOS NA DIETA SOBRE AS
EXPRESSÕES DOS GENES *MIOSTATINA* E DE SINALIZADORES DE
ADIPOCITOCINAS NO MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI* DE OVINOS.

Trabalho de Tese apresentado à
Universidade Federal Rural da Amazônia,
como parte das exigências do Curso de
Doutorado em Saúde e Produção Animal na
Amazônia: área de concentração Produção
Animal, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Faturi
Co-orientadores: Profs. Dr. Ednaldo da
Silva Filho e Dr. Anibal Coutinho do Rego

Belém – PA

JANEIRO-2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

Paulo Henrique de Souza

BANCA EXAMINADORA

Orientador

Prof^o. Dr. Cristian Faturi
Universidade Federal Rural da Amazônia

Examinador (Titular)

Prof^o. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho
Universidade Federal Rural da Amazônia

Examinador (Titular)

Prof^o. Dr. Igor Guerreiro Hamoy
Universidade Federal Rural da Amazônia

Examinadora (Titular)

Prof^a. Dra. Jamile Andrea Rodrigues da Silva
Universidade Federal Rural da Amazônia

Examinador (Suplente)

Prof^o. Dr. Felipe Nogueira Domingues
Universidade Federal do Pará

Ao meu tio: Pai José Antônio Henriques;

À minha mãe Tereza Henriques;

À minha irmã Estela Mary de Souza e Italo de Souza Delgado;

Aos meus finados avós Daniel e Conceição;

À minha esposa Amélia Nazaré Silva (Mel);

Ao meu irmão Ednaldo da Silva Filho (Chico Tuita) e sua esposa Taianara Tocantins
(Pretinha).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS pelo dom da vida e por mais está conquista. Obrigado, Senhor, pela sabedoria, paciência e por todas as bênçãos e graças em minha vida.

A realização do presente trabalho não seria possível sem a participação de várias pessoas e instituições, às quais agradeço:

À Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia – PPGSPAA por esse grau de Doutor;

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmico-Científica PROCAD/CASADINHO entre a UFRA/UECE/UNESP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho; CAPES/REUNI, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Cristian Faturi e Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho pelas orientações e dedicações às quais possibilitaram a conclusão deste trabalho, pessoas que eu admiro muito pelas suas capacidades, sabedorias e bondades.

Ao meu amigo Prof. Dr. Aníbal Coutinho do Rêgo, que eu admiro muito por ser uma pessoa extremamente apaixonada e dedicada ao que faz (pesquisa) e com uma sabedoria impar. Obrigado, por ter me ajudado e me ensinado tanto.

Ao meu amigo Prof^o. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho, que apesar do pouco convívio, tenho muito carinho e admiração.

Aos Professores, Dr. Felipe Nogueira Domingues; Dr^a. Jamile Andrea Rodrigues da Silva e Dr. Igor Guerreiro Hamoy, pela disponibilidade e sugestões que serão de suma importância para o enriquecimento desta tese de doutorado, é uma satisfação tê-los em minha banca, muito obrigado.

Ao meu irmão Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho a quem dedico esse trabalho. Nem sei como agradecer tudo que me fizeste. Obrigado mesmo, meu irmão, por tudo que você representa em minha vida.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia – PPGSPAA, pelos ensinamentos que foram de muita valia.

A todos meus colegas de turma, em especial a minha amiga Camila Paz (Juju) por me dar apoio nas horas difíceis tanto no profissional como no pessoal, abrigado mesmo por toda ajuda, te adoro e também ao meu amigo Revone Miranda (ReBone) por ser esse grande amigo e companheiro nas poucas horas de lazer.

A todos os estagiários do GERFAM e CPCOP que me ajudaram direta ou indiretamente, minhas Florzinhas e Tiquinhas que tanto adoro. Em especial aos meus amigos Antonio Marcos, Vitor Macedo, Deyvid Melo “os Cavalos” por toda ajuda e dedicação, eles não mediram esforços e foram incansáveis durante todo trabalho. E a Dra Edwana Monteiro pelo auxílio das amostras experimentais. Obrigado mesmo. Adoro vocês.

Aos funcionários Marta Valle, Jaime, dona Dalva e seu Raimundo, obrigado pelo carinho, apoio e por toda ajuda.

Nos momentos de dificuldade de minha vida,
lembrei-me que na história da humanidade
o amor e a verdade sempre venceram.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Título: INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES ÓLEOS NA DIETA SOBRE AS EXPRESSÕES DOS GENES *MIOSTATINA* E DE SINALIZADORES DE ADIPOCITOCINAS NO MÚSCULO *LONGISSIMUS DORSI* DE OVINOS.

A produção de ovinos no Brasil tem passado por expressivas transformações nos últimos anos devido ao aumento na exigência do mercado consumidor por produtos de qualidade, o que leva a necessidade de obter animais terminados mais jovens, associado à utilização de sistemas de produção adequados. A obtenção de carne de qualidade é dependente de vários fatores como genética, idade, sexo, manejo, nutrição e ambiente. Portanto, o objetivo desta tese é analisar os efeitos da adição de diferentes óleos nas dietas sobre as expressões dos genes: Miostatina e genes de sinalização de adipocitocinas no músculo *Longissimus dorsi* de ovinos. Quarenta animais foram selecionados e distribuídos em quatro blocos e quatro tratamentos, sendo um grupo controle. Todos os tratamentos eram constituídos de volumoso composto por capim-Elefante cv. Roxo e concentrado a base de milho moído, farelo de soja, sal mineral e calcário calcítico. A determinação de cada tratamento foi a adição de 4% de óleos, sendo o tratamento 1 com óleo de soja, tratamento 2 com adição de 4% de óleo de soja de fritura e tratamento 3 foi adicionado 4% de óleo de dendê. Os animais foram abatidos após 90 dias de confinamento e uma amostra de 5 g do músculo *Longissimus dorsi* de cada animal foi coletado e conservado no nitrogênio líquido. As análises de expressões gênicas foram realizadas a partir da extração de RNA, seguido por PCR em tempo real contendo fluorocromo *Sybr green* para os genes *Miostatina*, *FASN*, *ACLY*, *ALDOC*, *ENPPI* e *DUSP10*, mais o gene *GAPDH* como controle interno. Todas as expressões gênicas relativas foram submetidas à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett a 0,05. A expressão da *Miostatina* foi significativamente menor com a adição do óleo de soja em relação ao tratamento controle. Para os genes de sinalização de adipocitocinas, não houve diferença significativa entre os tratamentos para o gene *ACLY*, mas para o gene *ALDOC* todos os tratamentos com adições de óleos regularam a expressão para menos em relação ao grupo controle. O gene *DUSP10* apresentou o maior nível de expressão entre os genes, mas somente o tratamento com adição de óleo de soja foi significativamente baixa em relação ao controle. Para o gene *ENPPI*, as adições dos óleos de dendê e de soja de fritura regularam a expressão significativamente para cima e o gene *FASN*, foi significativamente regulado para menos somente com o tratamento contendo óleo de soja em relação ao grupo controle. Conclui-se que as adições dos diferentes óleos na dieta dos ovinos regularam as expressões da maioria dos genes para mais ou para menos, o que pode influenciar no desenvolvimento muscular e nas vias metabólicas responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos no músculo *Longissimus dorsi* de ovinos.

Palavras chave: Adipocitocinas, expressão gênica, miostatina, óleos, ovinos.

ABSTRACT

Title: INFLUENCE OF DIFFERENT OILS ADDITION IN THE DIET ON THE EXPRESSIONS ON MYOSTATIN AND ADIPOCYTOKINAL SIGNALS GENES IN LONGISSIMUS DORSI MUSCLE OF SHEEP.

The production of sheep in Brazil has undergone significant changes in recent years due to the increase in the demand of the consumer market for quality products, which leads to the need to obtain younger finished animals associated with the use of adequate production systems. Obtaining quality meat is dependent on several factors such as genetics, age, sex, handling, nutrition and environment. Therefore, the aim of this thesis is to analyze the effects of the addition of different oils in the diets on the gene expressions: Myostatin and adipocytokine signaling genes in the *Longissimus dorsi* muscle of sheep. Forty animals were selected and distributed in four blocks and four treatments, being a control group. All treatments were composed of voluminous elephant grass cv. Purple and concentrated based on ground corn, soybean meal, mineral salt and calcitic limestone. The determination of each treatment was the addition of 4% of oils, being the treatment 1 with soybean oil, treatment 2 with addition of 4% of frying soybean oil and treatment 3 was added 4% of palm oil. The animals were slaughtered after 90 days of confinement and a 5 g sample of the *Longissimus dorsi* muscle from each animal was collected and stored in liquid nitrogen. Gene expression analyzes were performed from RNA extraction, followed by real-time PCR containing *Sybr green* fluorochrome for the *Myostatin*, *FASN*, *ACLY*, *ALDOC*, *ENPPI* and *DUSP10* genes plus the *GAPDH* gene as internal control. All relative gene expressions were submitted to ANOVA and the means were compared by the Dunnett test at 0.05. The expression of *Myostatin* gene was significantly lower with the addition of soybean oil compared to the control treatment. For the adipocytokine signaling genes, there was no significant difference between treatments for the *ACLY* gene, but for the *ALDOC* gene all treatments with oil additions regulated the expression for less than the control group. The *DUSP10* gene showed the highest level of expression among the genes, but only the treatment with soybean oil addition was significantly low in relation to the control. For the *ENPPI* gene, the additions of the palm oil and fry soybean regulated the expression significantly up and the *FASN* gene was significantly down-regulated only with the soybean oil-containing treatment relative to the control group. It is concluded that the additions of the different oils in the sheep diet regulated the expressions of most genes for more or less, which may influence the muscle development and the metabolic pathways responsible for the fatty acid biosynthesis in the *Longissimus dorsi* muscle of sheep.

Key words: Adipocytokines, gene expression, myostatin, oils, sheep.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1. Lipídios na alimentação de ruminantes.....	12
3.2. Gordura na qualidade de carcaça.....	15
3.3. Gene Envolvido na Formação das Fibras Musculares.....	17
3.3.1. Miostatina.....	17
3.4. Genes de Sinalização de Adipocitocinas.....	19
3.4.1. Ácido Graxo Sintetase (Fattyacidsynthase-FAS).....	19
3.4.2. ATP citrato liase (ATP citartelyase-ACLY).....	19
3.4.3. Aldolase C (aldolase, fructose-bisphosphate C-ALDOC).....	20
3.4.4. Ectonucleotide pirofosfatase/fosfodiesterase 1 (ectonucleotidepyrophos- phatase/phosphodiesterase 1-ENPP1).....	20
3.4.5. Fosfatase de Especificidade Dupla 10 (dual specificityphosphatase 10- DUSP10).....	20
3.5. Expressão Gênica.....	21
4. ARTIGO 1.....	23
4.1. Title: Influence of oil addition to the diet on <i>Myostatin</i> gene expression in <i>Longissimus lumborum</i> muscle of sheep.....	23
4.2. Abstract.....	24
4.3. Introduction.....	24
4.4. Material and Methods.....	25
4.5. Results.....	27
4.6. Discussion.....	28
4.7. References.....	29
5. ARTIGO 2.....	33
5.1. Título: A adição de diferentes óleos na dieta regulam a expressão de genes sinalizadores de adipocitocinas no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de ovinos.....	33
5.2. Resumo.....	33

5.3. Introdução.....	33
5.4. Material e Métodos.....	34
5.5. Resultados.....	36
5.6. Discussão.....	37
5.7. Referências.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a ovinocultura é destinada tanto para a exploração econômica como de subsistência. O rebanho ovino possuía mais de 16 milhões de animais em 2006, passando para mais de 17.6 milhões em 2014, apresentando crescimento de 10%. Em 2014, o Rio Grande do Sul (4.223.266 animais), Bahia (2.815.438 animais), Ceará (2.229.327 animais), Pernambuco (1.924.342 animais) e Piauí (1.210.967 animais) foram os estados com maior rebanho de ovinos no país. O Nordeste possui destaque com relação à ovinocultura no Brasil, sendo o detentor do maior efetivo de ovinos, com mais de 10.126.799 de animais em 2014, seguido das regiões Sul (5.166.225 animais), Centro Oeste (982.434 animais) Sudeste (704.831 animais) e Norte (634.165 animais) (ANUALPEC, 2016).

A produção de ovinos no Brasil tem passado por expressivas transformações nos últimos anos devido ao aumento na exigência do mercado consumidor por produtos de qualidade. Isto leva a necessidade de obter animais terminados mais jovens, associado à utilização de sistemas de produção adequados (GARCIA et al., 2003).

A obtenção de carne de qualidade é dependente de vários fatores como genética, idade, sexo, manejo, nutrição e ambiente (SILVA SOBRINHO, 2001), o conjunto destes fatores é que irão definir qualidade físico-química, tecnológica e sensorial da carne.

No prato do consumidor, a qualidade da carne é avaliada por dois grupos de fatores: aparência e composição. A aparência é determinada, especialmente, pela forma do pedaço de carne que vai ser consumido, pela massa ou peso do corte e pela coloração. Em relação a composição, o consumidor considera a importância de músculo, gordura e osso (OSÓRIO et al., 2008).

Para obter uma carne de melhor qualidade faz-se necessário a compreensão de fatores que exercem influência sobre as características qualitativas da carne. Esses fatores são de origens intrínsecas ao animal e extrínsecas, podendo-se citar influências desde o manejo até as reações físicas e químicas ocorridas na carcaça, sendo fundamental a implantação de técnicas racionais de criação, visando maior produtividade e qualidade, para atender a um mercado consumidor mais exigente (SILVA SOBRINHO et al., 2005).

Diversos fatores interferem na qualidade da carne e podem estar relacionados ao animal, ao meio, ao genótipo e à nutrição, a exemplo, os níveis protéicos e

energéticos da dieta. Entre esses fatores, a nutrição é determinante da qualidade da carne, pois as mudanças na dieta podem melhorar tanto a quantidade como a qualidade do produto final (JOHNSON &McGOWAN, 1998; GEAY et al., 2001;BATISTA et al., 2010).

Segundo Jaeger et al. (2004), gorduras e óleos têm sido utilizados na alimentação de ruminantes em substituição às altas proporções de grãos, com o intuito de aumentar a densidade energética da dieta e melhorar a eficiência alimentar.

A quantidade de energia consumida pelo animal na fase de terminação é um fator que afeta a quantidade de gordura presente na carcaça. Segundo Smith et al. (2003) e Gomes et al. (2009), quanto mais energia o animal consumir, maior será a porcentagem de gordura subcutânea. E conseqüentemente maior será a gordura intramuscular na carne, deixando o produto final mais macio.

O grau de acabamento de gordura na carcaça reduz o risco de encurtamento dos sarcômeros pelo frio das câmaras de resfriamento, por promover proteção aos músculos fazendo com que a temperatura caia gradativamente (BRIDI e CONSTATINO, 2010). A gordura intramuscular aumenta a sensação de maciez por lubrificar a mastigação e diluir o teor de tecido conjuntivo da carne (FEIJÓ et al., 1999). De acordo com Sañudo et al. (2008) um aumento da gordura intramuscular desenvolve uma aparente sensação de suculência que estimula o fluxo salivar durante a mastigação. A deposição de gordura nos animais depende do grupo genético, sexo, ganho de peso diário, maturidade e densidade energética da dieta (BRIDI et al., 2011).

O marmoreio é definido pela acumulação de gordura intramuscular na carne. Esta é uma característica que só é possível de avaliar após o abate ou por ultrassonografia, o que dificulta e aumenta o custo do processo. Com isso, a viabilidade de contemplar essas características em programas de melhoramento fica comprometida. Além disso, por serem características avaliadas de forma tardia, há o aumento do intervalo de gerações (LUCHIARI FILHO, 2000).

Como alternativa, o conhecimento dos mecanismos de ação gênica envolvidos nesses processos pode ajudar na identificação de animais com valor genético elevado para características como maciez e marmoreio da carne e a seleção pode ser conduzida em animais jovens (PINTO et al., 2010).

Atualmente, o maior esforço da genética molecular é a identificação de sequências codificadoras ou unidades de transcrição do DNA que são associadas a uma característica expressa em um órgão ou tecido específico (EGGEN; HOCQUETTE,

2004). O verdadeiro desafio não é o conhecimento do genoma físico propriamente dito, mas a compreensão de quais genes são transcritos e traduzidos em produtos protéicos e como esses processos são regulados. Portanto, essas sequências codificadoras são responsáveis por uma função particular ou um fenótipo específico. Algumas dessas proteínas são expressas no tecido muscular ou no tecido adiposo, possuindo comprovado efeito nas características de interesse para o consumo humano (HOUDEBINE, 2002).

As interações entre os nutrientes que compõem a dieta e o nível de expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico podem ilustrar inúmeras possibilidades, no que diz respeito à deposição de ácidos graxos no tecido adiposo que ainda não foram analisadas. Isso é possível, em virtude da atividade biológica apresentada por certos lipídeos na dieta, com estimulação ou inibição de genes que codificam enzimas lipogênicas específicas (JUMP, 2002).

Para compreensão dos mecanismos associados à lipogênese no tecido animal, uma alternativa recente é a utilização da expressão gênica associada à nutrição, também conhecida como nutrigenômica ou genômica funcional. Para isso, o uso de técnicas como a PCR quantitativo (qPCR) tem sido frequentemente utilizada (KELLY et al, 2011, FONSECA et al, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a influência de dietas contendo óleos de soja, residual de fritura e de dendê na expressão de genes de sinalização de adipocitocinas e miostatina no músculo *Longissimus dorsi* de ovinos.

2.2. Específicos

- ✓ Determinar o perfil de expressão do gene da miostatina sob as diferentes dietas contendo os diferentes óleos no músculo de ovinos;
- ✓ Determinar os perfis de expressões de genes que sinalizam as adipocitocinas no músculo de ovinos sob as diferentes dietas contendo óleos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Lipídios na alimentação de ruminantes

Sendo o Brasil um país de clima tropical existe a facilidade de cultivar várias espécies oleaginosas, nativas ou manejadas, com grande potencialidade para todas as regiões do território nacional. As principais oleaginosas cultiváveis no Brasil são: a soja (*Glycine max*), o girassol (*Helianthus annuus*), a mamona (*Ricinus communis*), o dendê (*Elaeis guineensis*), o pinhão-manso (*Jatropha curcas*), o nabo forrageiro (*Raphanus sativus*), o algodão (*Gossypium spp. L.*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a canola (*Brassica napus*), o gergelim (*Sesamum orientale*), o babaçu (*Oryzopsis spicata*) e a macaúba (*Acrocomia aculeata*) (ABDALLA et al., 2008).

Os ruminantes normalmente apresentam em sua dieta reduzidos teores de lipídios, com valores de 1 a 5% da matéria seca (MS) (BUCCIONI et al., 2012). A maioria dos lipídios dos vegetais são altamente insaturados. Em cereais, por exemplo, há predominância de ácido linoleico (C18:2), enquanto em forragens o ácido linolênico (C18:3) é o mais comum (PALMQUIST e MATTOS, 2006).

O aumento do interesse no estudo de lipídeos em dietas de ruminantes é resultado do conceito de que a manipulação da dieta via suplementação com lipídeos é uma forma de influenciar uma variedade de processos fisiológicos ou alterar o perfil de ácidos graxos de produtos alimentícios derivados de ruminantes (HESS et al., 2008).

Uma ferramenta interessante para atender às exigências do consumidor quanto ao perfil de ácidos graxos da carne e ao mesmo tempo não comprometer o desempenho dos animais, é o uso de lipídeos na dieta. Hoje, muito mais do que uma fonte de energia, os ácidos graxos são utilizados em dietas, como tentativa de manipular o metabolismo. Eles podem interferir na expressão de várias enzimas, carreadores, sítios de absorção, dentre outros, modificando, por exemplo, o perfil de ácidos graxos depositados na carne, ou o secretado no leite (PERFIELD II, 2007).

A adição de lipídios na alimentação de ruminantes tem por objetivo aumentar a densidade energética da dieta podendo proporcionar maiores taxas de ganho de peso (GARCIA et al., 2003), melhor acabamento de carcaça (LOUGH et al., 1994) e aumentar a participação de determinados ácidos graxos na carne com melhora na qualidade da carne para consumo humano (IVAN et al., 2001; MACEDO et al., 2008).

Estudos têm sido realizados utilizando óleos vegetais como fator de modificação no processo de biohidrogenação levando a alterações da composição lipídica dos produtos gerados. Os óleos vegetais contêm alta proporção de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados, e uma digestibilidade aparentemente mais alta que as fontes lipídicas de origem animal (COSTA et al., 2009).

Segundo Morgado (2011) as dietas dos ruminantes possuem normalmente baixo teor de lipídios, em média 3% de extrato etéreo na matéria seca. A exigência energética de cordeiros é elevada, a adição de lipídios nas dietas tem por objetivo aumentar a densidade energética, uma vez que os lipídios possuem 2,25 vezes mais conteúdo energético que os carboidratos. E quando usado de forma adequada nas dietas, pode aumentar o ganho de peso, qualidade de carcaça e aumentar a participação de determinados ácidos graxos na carne, com a melhora na qualidade da carne para o consumo humano (ORTIZ, 2011).

Em dietas para ruminantes os lipídios são usados como fontes de energia, por serem extremamente ricos em energia (9,4 Kcal/g), sendo recomendados para aumentar a densidade energética das dietas (DOREAU e CHILLIARD, 1997). Os lipídios também têm a capacidade de aumentar a absorção de vitaminas lipossolúveis, fornecem ácidos graxos essenciais importantes na composição de membranas de tecidos e atuam como precursores na regulação do metabolismo (PALMQUIST e MATTOS, 2006).

Geralmente a concentração de lipídios nas dietas de ruminantes é baixa, sendo 1 a 5% da matéria-seca, e estão presentes principalmente na forma de ésteres de glicerol (KOZLOSKI, 2009).

Segundo Martin (2008), além do benefício ao meio ambiente como estratégia de mitigação da emissão de metano, o lipídio proporciona também importante benefício à nutrição animal. A inclusão de fontes de lipídeos na dieta pode, ou não, comprometer o desempenho do animal, pois ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, livres, são potencialmente tóxicos aos micro-organismos ruminais, prejudicando principalmente as dietas com altas proporções de fibra (GIBB et al., 2005).

A utilização de óleo na alimentação animal pode levar a redução no consumo de matéria seca e na fermentação ruminal da matéria orgânica e da fibra (JENKINS, 1993), aumento na produção de propionato (HONING et al., 1981) e à transferência do hidrogênio livre para a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados, diminuindo a disponibilidade de H_2 para síntese de metano. A utilização de lipídios para a manipulação ruminal pode representar uma vantagem em relação aos ionóforos, por

persistir o efeito mesmo após longos períodos de suplementação (JENKINS, 1993; JOHNSON, JOHNSON, 1995).

Os carboidratos fermentáveis no rúmen consistem da principal fonte de energia na dieta. A energia desses carboidratos é liberada pelo processo de fermentação no rúmen produzindo calor. O calor liberado aumenta a temperatura corporal levando o animal a ficar sujeito a estresse calórico (SILVA et al., 2007). Os lipídeos, ao contrário dos carboidratos, não são fermentados no rúmen e, portanto, não produzem calor. Dessa forma podem ser adicionados à dieta como estratégia na redução do estresse térmico, principalmente no verão. Com isso se evitam problemas de acidose ruminal e balanço energético negativo principalmente no pós-parto e em casos de calor muito intenso (PENNINGTON & VANDEVENDER, 2004).

O excesso de lipídeos na dieta dos ruminantes, principalmente quando possui alto teor de ácidos graxos insaturados pode inibir a fermentação e o crescimento microbiano ruminal. Esta inibição pode ser em razão do efeito da gordura sobre as fibras, impedindo a aderência da microbiota ruminal e o acesso das enzimas fibrolíticas ao seu substrato, ou ainda, a um efeito tóxico dos ácidos graxos insaturados sobre as células bacterianas. Este efeito tóxico estaria associado a uma mudança da composição lipídica e das propriedades físico-químicas das membranas celulares (KOZLOSKI, 2002).

De acordo com Jenkinset al. (2008), as dietas com alta inclusão de extrato etéreo podem prejudicar a degradação da fibra e conseqüentemente aumentar a quantidade de conteúdo gastrointestinal. Ainda de acordo com esses autores, os ácidos graxos insaturados apresentam efeito físico de recobrimento das partículas alimentares com gordura e alta capacidade de toxidez para as bactérias fibrolíticas presentes no rúmen, deprimindo a capacidade de degradar fibras, pois a rápida disponibilização de lipídeo no rúmen é maior que a capacidade ruminal de promover biohidrogenação.

De acordo com Jenkins (1992) e Jenkins (1993), o processo de digestão de lipídeos em ruminantes pode ser resumido por duas principais etapas, sendo: lipólise e biohidrogenação de ácidos graxos insaturados.

Os ácidos graxos insaturados liberados pela lipólise são ligeiramente hidrogenados no rúmen. A biohidrogenação é o processo pelo qual as bactérias ruminais inserem H nas ligações insaturadas (duplas) tornando-as saturadas (simples) (CHURCH, 1988). Considerando o efeito tóxico de ácidos graxos insaturados sobre os microorganismos ruminais, um mecanismo de defesa para redução desta toxidez é

aprovável razão para o desenvolvimento da capacidade de biohidrogenação pelas bactérias (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

Várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de aumentar a concentração dos ácidos graxos benéficos na carne ovina por meio da manipulação da biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados (AGI) (LADEIRA; OLIVEIRA, 2007). Associado a estes fatores, há trabalhos na literatura (HILLER; HERDMANN; NUERNBERG, 2011; WATERS et al., 2009) que sugerem que a composição de ácidos graxos da carne pode ser controlada por fatores ainda mais específicos, tais como os genes relacionados com o metabolismo lipídico.

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

3.2. Gordura na qualidade de carcaça

A produção de carne ovina no Brasil em 2008 era de 79.300 milhões de toneladas e passou para 85.900 milhões de toneladas em 2013. Um crescimento de 8,32% em 5 anos segundo a FAO (2015). A divulgação das qualidades típicas da carne ovina, como o seu sabor e valor nutritivo, promoveu um aumento considerável no consumo desse produto em regiões do Brasil que tradicionalmente não a consumiam, o que gerou um crescimento da demanda (COUTO, 2003).

Atualmente os consumidores estão cada vez mais interessados em um produto com qualidade nutricional desejável e que atenda às exigências diárias para uma vida saudável. E é consenso na literatura que a carne ovina é excelente fonte de proteína, vitaminas e micronutrientes (BIESALSKI, 2005; WILLIAMSON; FOSTER; STANNER, 2005).

Sabe-se que o nível da gordura intramuscular presente nas carnes, assim como a sua composição estão associadas com a suculência, sabor, maciez e aceitação global (JEREMIAH et al., 2003; O'QUINN et al., 2012). Além destas características a vida de prateleira (oxidação lipídica e do pigmento) é influenciada pela composição da mesma.

Os lipídeos são importantes na alimentação, como fonte de energia e de ácidos graxos essenciais, por possuírem alto valor energético e estarem associados às características sensoriais especiais, que se revelam pela sua textura, aroma e sabor (BATISTA, 2008).

Segundo Mahgoub et al. (2002), a composição dos ácidos graxos presentes nos lipídeos influencia na qualidade da carne, sendo que um maior grau de saturação induz a uma menor qualidade. Entretanto, a composição exerce pouca influência no valor comercial da carcaça, comparado ao teor de gordura. Característica que tem despertado no consumidor a preocupação em consumir carnes saudáveis e com baixo índice de colesterol (BANSKALIEVA et al., 2000).

A gordura intramuscular contribui para a sensação de maciez e suculência da carne e isso ocorre devido a sensação de umidade produzida na boca durante a mastigação e ao efeito lubrificante. Pela baixa condutividade térmica da gordura o cozimento ocorre de forma mais lenta, evitando a desnaturação protéica e a perda de líquido durante o cozimento (LAWRIE, 2005).

A suculência da carne esta relacionada a dois fatores, o primeiro é a impressão de umidade durante as primeiras mastigadas que é produzida pela rápida liberação do fluido da carne. O segundo é uma suculência sustentada, principalmente devido ao efeito estimulante da gordura sobre a salivação (WEIR, 1960 citado por LAWRIE, 2005). Segundo Osório et al. (2009) carnes com maior quantidade de gordura intramuscular podem ser mais suculentas, como a de um cordeiro jovem, por exemplo, que pode apresentar carne menos suculenta por ainda não ter depositado gordura intramuscular.

Porém quanto maior o marmoreio, a suculência aumenta de maneira linear em painéis de degustação (SMITH, 2001). O marmoreio pode evitar a perda de água e desnaturação das fibras, fazendo com que a carne permaneça suculenta, mesmo quando excessivamente preparada, pois o calor se propaga de maneira mais lenta na gordura do que na proteína.

A cobertura de gordura na carcaça é um fator importante de proteção da carne a baixas temperaturas de armazenamento, principalmente em frigoríficos que utilizam câmaras frigoríficas com baixas temperaturas, minimizando o fenômeno do encurtamento pelo frio (“Coldshortening”) e impedindo a perda excessiva de água pela carne (BONAGURIO, 2003; SAFARI et al., 2001), além de evitar a ocorrência de queimadura pelo frio e diminuição da maciez.

Alguns autores pontuam o grau de marmoreio de acordo com a distribuição e a quantidade de gordura intramuscular na região do músculo *longissimus dorsi* (CASTRO, 2011). Esta pontuação vai de abundante (16 a 18), moderado (13 a 15), médio (10 a 12), pequeno (7 a 9), leve (4 a 6) a traços (1 a 3).

A gordura de marmoreio (MAR) é o depósito de gordura intramuscular, uma fração de tecido adiposo que se deposita entre as fibras musculares, medida com uso de ultrassonografia sobre o “contrafilé”, entre a 12^a e 13^a costelas e é um dos principais fatores determinantes para classificação de qualidade. Em vários países, já é prática comum se pagar por esta característica que contribui positivamente no sabor e maciez da carne, aspecto este fundamental para alguns mercados mais exigentes, que remuneram por esta qualidade (MULLER, 1987).

3.3. Gene Envolvido na Formação das Fibras Musculares

3.3.1. Miostatina

Miostatina (também conhecida como fator de diferenciação de crescimento 8, abreviado GDF-8), ela é uma miocina, ou seja, uma proteína produzida e liberada pelos miócitos que atuam na função autócrina das células musculares inibindo a miogênese, como no crescimento das células musculares e diferenciação (CARNAC et al., 2006). Além de pertencer à família das proteínas TGF beta (JOULIA-EKAZA E CABELLO, 2007). Em humanos ela é codificada pelo gene *MSTN* (GONZALES-CADAVID et al., 1998) e consiste de duas subunidades idênticas, cada uma contendo 109 resíduos de aminoácidos (o gene codifica uma pré-proteína 375 aminoácidos que é processada proteoliticamente para a sua forma ativa mais curta)(GE; GREENSPAN, 2006).

O seu peso molecular total é de 25,0 kDa. A proteína está inativa até que uma protease clive a porção NH₂-terminal ou "pro-domínio" da molécula, resultando no dímero COOH-terminal ativo. A miostatina liga-se ao receptor de activina do tipo II, resultando em um recrutamento de co-receptores Alk-3 ou Alk-4. Estes co-receptores iniciam uma cascata de sinalização celular no músculo, que inclui a ativação de fatores de transcrição na família SMAD - SMAD2 e SMAD3. Esses fatores induzem a regulação de genes específicos de miostatina. Quando aplicado a mioblastos, a

miostatina inibe sua diferenciação em fibras musculares maduras (GE; GREENSPAN, 2006).

Animais sem a produção de miostatina ou tratados com substâncias que bloqueiam a atividade da miostatina, tem significativamente mais massa muscular. Além do mais, os indivíduos que apresentam mutações em ambas as cópias do gene da miostatina, também apresentam mais massa muscular e são bem mais forte que os normais (TSUCHIDA, 2008). Naturalmente ocorre deficiência de miostatina de várias formas e tem-se identificado essa deficiência em algumas raças de bovinos (KAMBADUR et al., 1997), ovinos (CLOP et al., 2006), pequenas raças caninas (MOSHER et al., 2007) e em humanos (HAISMA e de HON, 2006).

A primeira descrição da dupla musculatura (DM) em ovinos foi em 1940 (NSERLAND, 1940). Este fenótipo ocorre com frequência na raça Texel. Os ovinos das raças Beltex e Texel são famosas pela excepcional produção de carne (BANKS 1997; BUSBOOM et al., 1999; CLOP et al., 2006), sendo os reprodutores da raça Texel mais utilizados nos cruzamentos dos sistemas de reprodução animal na Europa (Figura 1).

Figura 1. Exemplos de ovinos da raça Texel com dupla musculatura (Fonte: MIAR et al., 2014).



O fenótipo DM é caracterizado pela hipertrofia muscular, principalmente nas regiões proximais do dianteiro e do traseiro, protrusão muscular proeminente com limites intramusculares e sulcos claramente visíveis (BELLINGE et al., 2005). Outras características principais incluem menor concentração de gordura nos ossos dos membros, genitália externa menos desenvolvida e línguas ampliadas em bezerros

recém-nascidos (BELLINGE et al., 2005). Os animais de DM também têm menos ossos, menos gorduras e mais músculos com uma maior proporção de cortes nobres da carne (SHAHIN E BERG, 1985). No entanto, existem algumas desvantagens para este fenótipo em bovinos, incluindo fertilidade reduzida, baixa viabilidade do bezerro, aumento da susceptibilidade ao estresse (ARTHUR et al., 1988) e distocia (ARTHUR et al., 1989). A dificuldade do parto (distocia) é uma preocupação comum entre criadores de ovinos em sua consideração na raça Texel (KEYNES, 1994).

3.4. Genes de Sinalização de Adipocitocinas

Em um estudo realizados por Lim et al. (2017), foram identificados uma série de genes ativos em diferentes vias metabólicas ou, pelas proteínas estruturais das células musculares. Dentre esses, destacamos:

3.4.1 Ácido Graxo Sintetase (Fatty acid synthase-FASN)

É uma enzima codificada pelo gene FASN em humanos (JAYAKUMAR et al., 1995). Também é uma proteína multi-enzimática que catalisa a síntese de ácidos graxos. Ela não é uma enzima simples, apresentando dois polipeptídios idênticos e multifuncionais de 272 kDa, os quais atuam nos substratos a partir de um domínio funcional para o outro (SMITH et al., 2003). Sua principal função é catalisar a síntese de palmitato (uma cadeia longa de ácido graxo saturado com 16 carbonos) a partir da Acetil-CoA e Malonil-CoA, na presença de NADPH (CHIRALA et al., 2001).

3.4.2. ATP citratoliase (ATP citartelyase-ACLY)

É a enzima primária responsável pela síntese de acetil-CoA citosólica em muitos tecidos. A enzima é um tetrâmero de subunidades aparentemente idênticas. O produto, acetil-CoA, em animais serve várias vias biossintéticas importantes, incluindo lipogênese e colesterogênese (FATLAND et al., 2002). É ativado pela insulina (GUAY et al., 2007). Portanto, ATP-citratoliase é responsável por catalisar a conversão de citrato e CoA em acetil-CoA e oxaloacetato, juntamente com a hidrólise de ATP (Sun et al., 2010).

3.4.3. Aldolase C (aldolase, fructose-bisphosphate C-ALDOC)

É uma das três isoenzimas aldolase (A, B e C), codificadas por três diferentes genes (ARAKAKI et al., 2004; DU et al., 2014). A sequência de aminoácidos da ALDOC é altamente similar a outras isoenzimas, compartilhando 68% de identidade com a ALDOB e 78% com a ALDOA (ARAKAKI et al., 2004). A ALDOC está envolvida na glicólise e no caminho reverso na gliconeogênese. Ela catalisa a conversão reversível da 1,6-bisfosfato-frutose para 3-fosfato-gliceraldeído (G3P), ou gliceraldeído e fosfato-dihidroxicetona (DHAP) pela clivagem do grupamento aldol, sendo portanto, crucial na biossíntese de ATP (ARAKAKI et al., 2004; LANGELLOTTI et al., 2014).

3.4.4. Ectonucleotidopirofosfatase/fosfodiesterase 1 (ectonucleotidopyrophosphatase/phosphodiesterase 1-ENPP1)

É uma enzima de ampla especificidade e cliva uma variedade de substratos, incluindo ligações fosfodiéster de nucleotídeos e açúcares nucleotídicos e ligações de pirofosfatos de nucleotídeos e açúcares nucleotídicos. Esta proteína pode funcionar para hidrolisar 5'-trifosfatos de nucleosídeo para os monofosfatos correspondentes e também pode hidrolisar polifosfatos de diadenosina (MADDUX E GOLDFINE, 2000). Ela interage com o receptor de insulina e inibe a sinalização subsequente, diminuindo sua autofosforilação da subunidade β . O ENPP1 é muito expresso em músculos esqueléticos, tecido adiposo e fibroblastos de pele cultivada de indivíduos resistentes à insulina que ainda não são obesos ou diabéticos. O que indica que a expressão excessiva de ENPP1 é um defeito inicial e intrínseco na resistência à insulina humana (ABATE et al., 2014).

3.4.5. Fosfatase de Especificidade Dupla 10 (dual specificity phosphatase 10- DUSP10)

É uma enzima que inativa suas quinases alvos por desfosforilação de resíduos de fosfoserina/treonina e fosfotirosina. Eles regulam negativamente os membros da superfamília MAPK (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), que está associada à proliferação e diferenciação celular. Diferentes membros desta família de fosfatases de especificidade dupla apresentam especificidades de substrato diferentes para MAPKs, distribuição de tecido diferente e diferentes modos de induzibilidade de sua expressão

por estímulos extracelulares. Este produto genético se liga e inativa p38 e SAPK/JNK, mas não MAPK/ERK (TANOUE et al., 2001). É distribuído uniformemente tanto no citoplasma quanto no núcleo. Este gene é amplamente expresso em vários tecidos e órgãos, e sua expressão é elevada por estímulos de estresse (THEODOSIOU et al., 2001).

3.5. Expressão Gênica

A expressão genética é o nível fundamental do genótipo de um organismo (ou o seu plano interno de informação genética), originando o fenótipo. Uma boa maneira de considerar que a expressão do gene é um mediador que interpreta a informação armazenada no DNA, no fenótipo de uma célula, é por meio da transcrição do gene e processamento do RNA mensageiro. A influência sobre o fenótipo final é predominantemente exercida por meio da síntese de proteínas, algumas das quais são estruturais e controlam a forma e as características do organismo, enquanto que outras são enzimas responsáveis pela catálise particular das vias metabólicas (ANDERSSON e GEORGES, 2004).

A contribuição da variação de expressão de genes na diversidade fenotípica, na evolução adaptativa e susceptibilidade a doenças tem sido amplamente esclarecido (KNIGHT et al., 2004). No entanto, o motivo pelo qual essa variação ocorre não está muito bem elucidado (HARRISON et al. 2012). De modo que as diferentes expressões gênicas entre espécies são geralmente herdáveis e podem ser altamente espécie-específicas (LEMOS et al. 2008; AYROLES et al. 2009; MCDANIELL et al. 2010).

Embora a maioria dos genes seja expressa igualmente a partir de ambos os alelos, alguns genes são expressos diferentemente. O termo “variação alélica” é amplamente definido como as diferenças nas sequências regulatórias encontradas em diferentes genótipos parentais. Os organismos possuem características de expressar preferencialmente um alelo particular sob fatores regulatórios, o qual é definido como expressão alelo-específico (ASE). As ASE podem acumular com divergência genética e, possivelmente, com adaptação a diferentes ambientes e são sensíveis aos processos desenvolvimentais dinâmicos (VON KORFF et al., 2009). Os ensaios com os ASE podem ser usados para identificar variações regulatórias do tipo *cis*, *trans* e *cis por trans* (MAIN et al., 2009; PASTINEN, 2010).

Em sistema de produção animal, o objetivo é melhorar características quantitativas (também conhecidos como características complexas) e seria vantajoso identificar alelos de genes de características desejáveis e assim, selecionar animais para reprodução que contenham os alelos desejáveis (GODDARD e HAYES, 2009). Como os fenótipos de características quantitativas em algumas espécies diploides são controlados por reguladores de transcrição, uma maior observação deve ser feita diretamente ao descobrir os polimorfismos de regulação cis e suas contribuições para fenótipos complexos (MONTGOMERY et al. 2010). Essas abordagens têm implicações práticas para a aplicação de seleção assistida por marcadores moleculares para características quantitativas que são difíceis de medir em espécies agrícolas.

4. ARTIGO 1.

Aceito pela Revista *Genetics and Molecular Research* (ISSN: 1676-5680)

4.1 Influence of oil addition to the diet on *Myostatin* gene expression in *Longissimus lumborum* muscle of sheep

Running title: Oil in diet influences *Myostatin* expression

P.H. Souza¹, A.C. Rego¹, C. Faturi¹, E.M.M. Monteiro², E. M. Barbosa³, R.C. Guimarães¹, A.R. Casseb¹ and E. Silva Filho^{1*}.

¹Instituto da Saúde e Produção Animal. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém-PA, Brazil; E-mails: <phszootecnista@msn.com>, <anibalcr@gmail.com>, <cristian.faturi@ufra.edu.br>, <rafaellecassebg@gmail.com>, <alexcasseb@yahoo.com.br>

²Colegiado de Medicina Veterinária. Universidade da Amazônia. Belém-PA, Brazil. E-mail: <edwana.monteiro@unama.br>

³Colegiado de Licenciatura em Educação no Campo. Universidade Federal do Amapá. Mazagão-AP, Brazil. E-mail: <elizabeth.barbosa@unifap.br>

*Corresponding Author: E. Silva Filho. Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501-Terra Firme, Belém-PA, 66077-830, Brasil.

Phone number: +55 (91) 3210-5165

Fax number: +55 (91) 3210-5165

E-mail: silva.filho@ufra.edu.br

4.2. ABSTRACT. *Myostatin* is a protein involved in the regulation of myogenesis; animal meat quality can be influenced by its expression. We analyzed the influence of diet content; integral soybean, yellow grease and palm oils, on *Myostatin* gene expression in the *Logissimus lumborum* muscle of sheep reared in the Northeast Amazon region. A basic controlled diet was elaborated and used with the addition of 4% of different oils as experimental treatments. All animals were slaughtered at a weight of 35 kg and 5 g of *Logissimus lumborum* muscle was collected and RNA extracted, quantified and RT-PCR was run. The $2^{-\Delta Ct}$ was used to determinate relative *Myostatin* expression. The control diet presented a relative *Myostatin* expression at the highest level of expression among all treatments, and when compared with soybean oil, was significantly different ($P < 0.05$). No significant difference were noted for other oils ($P > 0.05$). Though soybean oil when added to the diet decreased *Myostatin* expression, it induced muscle hyperplasia, generating animals with greater musculature.

Key-words: Animal nutrition, *GDF-8*, palm oil, residual oil, soybean oil.

4.3. INTRODUCTION

The *GDF-8* (Growth Differentiation Factor – 8) gene codes a protein produced and released by myocyte cells that affects the functioning of muscle cells inhibiting myogenesis, also known as *Myostatin* (*MSTN*) (Carnac et al., 2006). *Myostatin* binds to activating receptor type II to start a muscle cell signalization cascade that activates the SMAD family transcript factors (*Smad2* and *Smad3*). These factors induce the regulation of *Myostatin* specific genes and when applied to myoblasts provoke their differentiation into mature muscle fibers (Ge and Greenspan, 2006).

Animals with low *Myostatin* expression or treated with substances that block its activity have considerable muscle mass and are relatively strong (Tsuchida, 2008). *Myostatin* deficiency occurs naturally in sheep that present gene polymorphisms (Farhadian et al., 2012). However, these same authors associated polymorphisms of the *MSTN* gene with birth weight in Iranian Makoei sheep.

In a study with lamb muscles and *MSTN* gene suppression, there was reduction in *Myostatin* and increased expression of some differentiation-associated genes, such as *Myf5*, *MyoD*, and *Myogenin*, which were up-regulated by *Smad3*, thus leading to promotion of muscle cell differentiation and growth (Du et al., 2015). Lv et al. (2015)

estimated *MSTN* expression in different muscles at different ages (2 days, 2 months and 6 months old), and observed significant variation in expression with age for longissimus dorsi, soleus, gastrocnemius and extensor digitorum longus muscles.

A study analyzing the effect of increased dietary intake observed an increase in fiber diameter and cross-sectional area of some muscles (Xing et al., 2013). There also was a negative correlation between mRNA of *MSTN* with muscle fiber diameter and cross-sectional area; in other words, decline of *MSTN* mRNA apparently resulted in muscle fiber hyperplasia and hypertrophy. *Myostatin* expression is associated with lamb meat quality (Bagatoli et al., 2013). Another study with the Santa Inês breed and mixed breeds analyzed the *MSTN* expression in longissimus lumborum and observed that high expression is associated with a low meat tenderness phenotype, and low expression apparently results in improved meat tenderness (Bagatoli et al., 2013).

We examined the influence of adding soybean oil, residual soybean oil from a fryer and palm oil in diets and its association with the *Myostatin* gene expression profile in the *Longissimus lumborum* muscle of sheep reared in the Amazon region.

4.4. MATERIAL AND METHODS

All procedures were conducted according to *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)* guidelines. The project proposal was approved by the Animal Use Ethics Commission (CEUA) of the Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) and granted approval number 005/2013.

Experiment design

The experiment was conducted at the Metabolic Study Unit of Small Ruminants at the Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brazil (01° 27' 21" S and 48° 30' 16" W). We used 40 male uncastrated Santa Inês x Dorper mixed breed sheep with an average age of 80 days and initial body weight of 18kg. Care included all health aspects such as control of ecto- and endo-parasites using ivermectin (0.5 mL / 25 kg.liveweight⁻¹). The subjects were administered vitamins A, B12, D and E. They were housed in individual 1.77 m³ cages (1.52 x 0.97 x 1.20 m) containing feeding and drinking receptacles. The cages were protected from the rain and sunlight, and had good lateral air circulation.

The basic diet was elaborated to be considered a Control diet (CD) having ground corn, soybean meal, mineral salt, and calcitic limestone. Three treatment diets were prepared and fed to subsets of the study animals: Treatment 1 (Soybean oil) is the CD plus 4% of soybean oil added; Treatment 2 (Yellow grease) is the CD plus 4% of yellow grease added (oil used to fry potatoes at the university restaurant with rigorous oil source control free of animal residues), and Treatment 3 (Palm oil) is the CD plus 4% of palm oil (*Elaeis guineensis*, Jaquim). In all diets we used a 60:40 forage : concentrate ratio, the forage composed of elephant grass silage cv. Purple (*Pennisetum purpureum*, Schum) cultivated at the UFRA.

Each treatment included 10 animals and each animal was weighed every 15 days until they reached a weight of 33 kg. They were also weighed weekly until they reached a slaughter weight of 35 kg after 90 days of feeding on the study diets. After slaughter, 5 g of *Longissimus lumborum* muscle was collected from the 13th thoracic vertebra and kept in liquid nitrogen until laboratory analysis was performed.

Laboratory proceedings

RNA extraction was made with 3 mg of macerated muscle tissue, mixed with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and processed according to the manufacturer's recommendations. All RNAs were quantified in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) to measure RNA concentration. The purity of total RNA was determined by A260/280 and A260/230 ratios. Samples with A260/280 >2.2 were considered suitable for analysis.

Real-time PCR

Real-time PCR (RT-PCR) was performed in triplicate for *Myostatin* and *GAPDH* (endogenous) genes using a Power Sybr® Green RNA-to-C_TTM one-step Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer recommendations with a final volume of 20 µL. All reactions were run using the CFX96 TouchTM Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The primer sequences for RT-PCR were designed by Primer3 online software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) (Table 1).

Insert Table 1. Primer sequences to analyze gene expression in sheep.

Statistical analyses

Myostatin gene expression was estimated through the $2^{-\Delta C_t}$ method using *GAPDH* as a reference gene. The gene expression data was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov normality test through *PROC UNIVARIATE* and transformed to square root. Next, the treatments were submitted to ANOVA and the control diet was compared with all treatments with the Dunnett test using *PROC GLM*. All procedures were performed on SAS (Free Version-University Edition). The level of statistical significance was set at 0.05.

4.5. RESULTS

All RT PCRs were successful and Ct values were determined. The values ranged from 13.27 to 20.23 for the *GAPDH* gene and 16.34 to 20.97 for the *Myostatin* gene (Table 2).

Insert Table 2. Ct values for *GAPDH* and *Myostatin* genes determined by RT-PCR.

The relative *Myostatin* gene expression for each treatment was measured (Figure 1). Control diet consisting of the basic diet plus silage gave the highest relative *Myostatin* gene expression. All treatments with added oil reduced expression; but only the treatment with unused soybean oil gave a significantly lower expression compared to the control diet. However, the adding of soybean oil down-regulated the pathway of *Myostatin* expression when compared with yellow grease and palm oil.

Insert Figure 1. Comparison of *Myostatin* expression in sheep fed with a standard diet compared with diets to which palm or soybean oil was added. Different letters over the bars indicates significant differences ($P < 0.05$).

4.6. DISCUSSION

Myostatin expression is regulated by animal nutritional status; when they are under feed restriction or with low energetic level diets, *Myostatin* expression increases (Carneiro et al., 2013). This was found in the control treatment that had the lowest caloric value; however, without the added oil, it had the highest *Myostatin* expression. Zhao et al. (2016) observed that along with muscle development in ewe lambs, energetic restriction in the diet increases *Myostatin* expression, which may attenuates skeletal muscle development and inhibit the synthesis of certain proteins acting through the Akt-dependent pathway.

In a study using sheep fed a diet without oil showed that mRNA *MSTN* expression significantly decreased in the same muscle in sheep fed with different diets (Xing et al., 2014). On the other hand, Bajatoli et al. (2013) evaluated the effect of *MSTN* expression on lamb meat quality of several types of sheep, including Santa Inês, ½ Santa Inês-Doper and ½ White Doper-Santa Inês; they concluded that high *Myostatin* levels are associated with low meat tenderness values.

Diets with low and high fat were tested to determine *Myostatin* expression in the rainbow trout fish (*Oncorhynchus mykiss*) by Galt et al. (2014). They observed that a high-fat diet reduces *Myostatin* expression and alters skeletal muscle lipid content. Different lipid level diets were tested to determine how they affected the expression of growth related genes in Senegalese sole fish (*Solea senegalensis*), including *Myostatin*; expression was not affected by the different lipid levels (Campos et al., 2010). Diets containing different kinds of energy altered *MSTN* expression in geese (Jun-Peng et al., 2008).

Different energetic diet types presented different degrees of *MSTN* expression in sheep muscle (Zhao et al., 2016). Jun-Peng et al. (2008) also found this effect on *MSTN* expression interacting with *IGF-1* and *GH* genes in geese. They observed a significant effect on *MSTN* expressions with different energy source diets.

The addition of oil to the diet decreased *Myostatin* expression, but only with unprocessed soybean oil was it significantly reduced. When the affect of oil and residual

frying oil were compared in a sheep diet, a reduction in intake (g/d) was observed, principally of dry matter, organic matter, crude protein, neutral detergent fiber, and total carbohydrates, but there was an increased ether extract in the diet containing used frying oil (Peixoto et al., 2017). However, residual soybean oil treatment gave the highest *Myostatin* expression among all the treatments and may lead to smaller muscle development, i.e. hypoplasia (Reisz-Porszasz et al., 2003). Therefore, sheep fed with diets containing unused soybean oil decrease *Myostatin* gene expression in muscles and may lead to hyperplasia, but it is necessary to associate the *Myostatin* expression with meat quality characteristics, such as carcass yield, tenderness, organoleptic profiles and others.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank IFPA/Castanhal, CEBTAN, CEBRAN, UFPA for sampling and UFRA for making the laboratories available.

4.7. REFERENCES

- Bagatoli A, Gasparino E, Soares MA, Amaral RM, et al. (2013). Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. *Genet Mol Res.* 12:6168-6175.
- Campos C, Valente LM, Borges P, Bizuayehu T, et al. (2010). Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *J Exp Biol.* 213:200–209.
- Carnac G, Ricaud S, Vernus B, Bonnieu A. (2006). Myostatin: biology and clinical relevance. *Mini Rev Med Chem.* 6:765-770.
- Carneiro I, Gonzalez T, Lopez M, Senaris R, et al. (2013). *Myostatin* expression is regulated by underfeeding and neonatal programming in rats. *J Physiol Biochem.* 69:15–23.
- Du W, Xia J, Zhang Y, Liu MJ, et al. (2015). Expression of recombinant myostatin propeptide pPIC9K-Msp plasmid in *Pichia pastoris*. *Genet Mol Res.* 14:18414-18420.
- Farhadian M, Hashemi A, Mardani K, Darvishzadeh R, et al. (2012). Polymorphisms in the ovine myostatin gene are associated with birth weight but not with weight gain in Iranian Makoei sheep. *Genet Mol Res.* 11:3568-3575.

- Galt NJ, Froehlich JM, Meyer BM, Barrows FT, et al. (2014). High-fat diet reduces local myostatin-1 paralog expression and alters skeletal muscle lipid content in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem.* 40:875-886.
- Ge G, Greenspan DS. (2006). Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 78:47-68.
- Jun-peng HU, Rui-guo HE, Wei-xing FAN, Ai-qing CAO. (2008). Cloning of MSTN Gene and Research of Relationship between MSTN Gene Expression and Different Energy Diets or IGF-I, GH in Serum of Xupu Geese. *Acta Vet et Zootechnica Sinica.* 39:582-587.
- Lv XY, Sun W, Su R, Li D, et al. (2015). Correlation between sheep YAP1 temporal and spatial expression trends and MSTN and MyoG gene expression. *Genet Mol Res.* 14:3244-3256.
- Peixoto EL, Mizubuti IY, Azambuja Ribeiro EL, Santos Moura E, et al. (2017). Residual frying oil in the diets of sheep: intake, digestibility, nitrogen balance and ruminal parameters. *Asian-Australas J Anim Sci.* 30:51-56.
- Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, et al. (2003). Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of *Myostatin*. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E876-888.
- Tsuhida K. (2008). Myostatin inhibition by a follistatin-derived peptide ameliorates the pathophysiology of muscular dystrophy model mice. *Acta Myol.* 27:14-18.
- Xing HJ, Wang ZY, Zhong BS, Ying SJ, et al. (2014). Effects of different dietary intake on mRNA levels of MSTN, IGF-I, and IGF-II in the skeletal muscle of Dorper and Hu sheep hybrid F1 rams. *Genet Mol Res.* 13:5258-5268.
- Zhao JX, Liu XD, Li K, Liu WZ, et al. (2016). Different dietary energy intake affects skeletal muscle development through an Akt-dependent pathway in Dorper × Small Thin-Tailed crossbred ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol.* 57:63-70.

Table 1. Primer sequences used to analyze gene expression in sheep muscle.

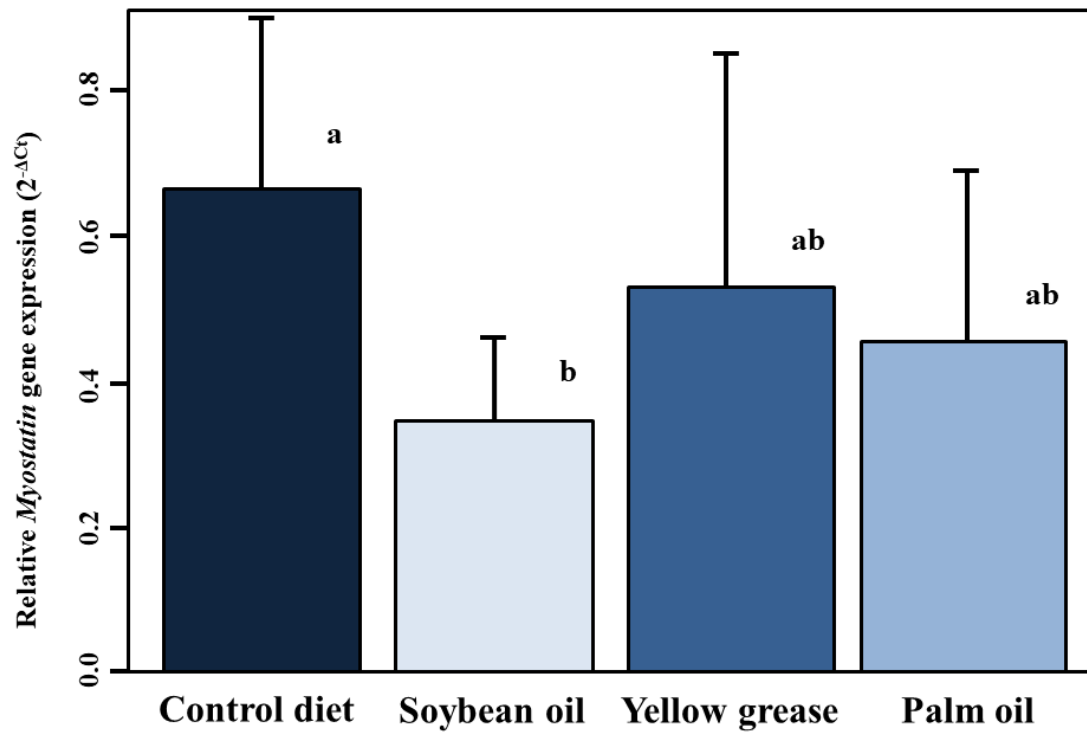
Genes	Forward and reverse sequences	Exon	GenBank reference
<i>Myostatin</i>	TCTGAGACCTGTCAAGACTCC	2	ID: 443449
	CTCTGCCAAATACCAGTGCC		
<i>GAPDH</i>	ATGCCTCCTGCACCACCA	6	ID: 443005
	AGTCCCTCCACGATGCCAA		

Table 2. Ct values for *GAPDH* and *Myostatin* genes determined by RT-PCR.

Treatments	<i>GAPDH</i>		<i>Myostatin</i>	
	Min	Max	Min	Max
Control diet	14.86	17.33	16.34	17.59
Soybean oil	13.59	16.66	17.74	18.72
Yellow grease	13.51	20.23	17.64	20.97
Palm oil	13.27	19.35	16.55	19.83

Min= Minimum; Max= Maximum.

Figure 1.



5. ARTIGO 2.

Formatado para ser submetido para a Revista *Physiologic Genomics* (ISSN: 1094-8341)

5.1. Título: A adição de diferentes óleos na dieta regulam a expressão de genes sinalizadores de adipocitocinas no músculo *Longissimus dorsi* de ovinos

5.2. Resumo. A produção de ovinos no Brasil é uma atividade em constante crescimento e necessita de desenvolvimentos tecnológicos que possam se aliar à qualidade da carne, sendo a nutrição um fator importante e a adição de óleos na dieta tem sido comprovada como reguladores das expressões de vários genes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de dietas contendo adições de diferentes óleos (soja, soja de fritura e dendê) na regulação da expressão de genes sinalizadores de adipocitocinas no músculo *Longissimus dorsi* em ovinos. Quarenta animais machos e não castrados foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados sob quatro diferentes tratamentos: Tratamento controle (concentrado e forragem) e os demais tratamentos contendo o concentrado e forragem mais 4% de óleo (soja, soja de fritura e dendê). Após o abate foram coletadas amostras do músculo *Longissimus dorsi*. Seguido de extração de RNA e PCR em tempo real com *SYBR Green* para cinco genes sinalizadores de adipocitocinas, normalizados com o gene *GAPDH*. Foi realizado ANOVA seguido do teste de Dunnett. As expressões relativas do gene *ACLY* não foram significativas entre os tratamentos, mas para o gene *ALDOC* todos os tratamentos com adições de óleos regularam a expressão para menos em relação ao grupo controle. O gene *DUSP10* apresentou o maior nível de expressão entre os genes, mas somente o tratamento com adição de óleo de soja foi significativamente baixa em relação ao controle. O gene *ENPPI* foi regulado significativamente para cima com as adições de óleos de dendê e soja de fritura e o gene *FASN*, foi significativamente regulado para menos na dieta contendo óleo de soja. Conclui-se que as adições dos diferentes óleos na dieta dos ovinos regularam as expressões da maioria dos genes para mais ou para menos, o que pode influenciar nas vias metabólicas responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos no músculo *Longissimus dorsi* de ovinos.

Palavras chave: Adipocitocinas, dieta de ruminante, nutriscritômica, óleo de dendê, óleo de soja.

5.3. Introdução

Diversos fatores interferem na qualidade da carne e podem estar relacionados ao animal, ao meio, ao genótipo e à nutrição, a exemplo, os níveis protéicos e

energéticos da dieta. Entre esses fatores, a nutrição é determinante da qualidade da carne, pois as mudanças na dieta podem melhorar tanto a quantidade como a qualidade do produto final (Batista et al., 2010).

Segundo Jaeger et al. (2004), gorduras e óleos têm sido utilizados na alimentação de ruminantes em substituição às altas proporções de grãos, com o intuito de aumentar a densidade energética da dieta e melhorar a eficiência alimentar. A quantidade de energia consumida pelo animal na fase de terminação é um fator que afeta a quantidade de gordura presente na carcaça. Segundo Smith et al. (2003) e Gomes et al. (2009), quanto mais energia o animal consumir, maior será a percentagem de gordura subcutânea. E conseqüentemente maior será a gordura intramuscular na carne, deixando o produto final mais macio.

O conhecimento dos mecanismos de ação gênica envolvidos nesses processos pode ajudar na identificação de animais com valor genético elevado para características como maciez e marmoreio da carne e a seleção pode ser conduzida em animais jovens (Pinto et al., 2010). Portanto, os efeitos de dietas na lipogênese no músculo de ruminantes também tem possibilitado o entendimento da expressão de vários genes que são sinalizadores de adipocitocinas (Li et al., 2018). As expressões de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e na qualidade do músculo *Longissimus dorsi* de ovinos podem ser reguladas sob diferentes suplementações (Li et al., 2015). Em bovinos, genes de regulação da lipogênese têm sido associados a dietas contendo óleos de palma e de soja (Choi et al., 2016; Park et al., 2017; Li et al., 2018). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência de dietas com adição de 4% de diferentes óleos (soja, soja de fritura e dendê) na regulação de expressões de genes responsáveis pela biossíntese de lipídios no músculo *Longissimus dorsi* em ovinos.

5.4. Material e métodos

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)*. O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia com o número de protocolo 005/2013.

Manejo e Delineamento Experimento

O experimento foi realizado na Unidade de Estudo de Metabólicos de Pequenos Ruminantes da UFRA, Belém, Estado do Pará, Brasil (coordenadas geográficas: 01° 27'

21" S and 48° 30' 16" W. Foram usados 40 animais do sexo masculino não castrados da raça mestiça Santa Inês x Doper com média de idade de 80 dias e peso inicial de 18 kg. Os animais foram avaliados em alguns aspectos sanitários, tais como o controle de ecto e endoparasitas com ivermectina (0,5 mL por 25 kg.peso vivo⁻¹). Todos os animais foram suplementados com vitaminas A, B12, D e E. Eles foram mantidos em baias individuais com 1,77 m³ (1,52 x 0,97 x 1,20 m) contendo recipientes para alimentação e bebedouros. As gaiolas foram protegidas das chuvas e raios solares, e tiveram boa circulação de ar lateralmente.

Foi elaborado uma dieta básica para ser considerada um tratamento de grupo controle (GC) contendo grãos de milho, farelo de soja, sal mineral e calcário calcítico, e outros três tratamentos foram realizados, sendo: Tratamento 1 (T1), contendo o conteúdo do grupo controle (GC) mais a adição de 4% de óleo de soja; Tratamento 2 (T2), constituído do conteúdo do GC mais 4% de óleo de soja de fritura (óleo utilizado para fritura de batata no restaurante universitário da UFRA sob rígido controle, evitando a contaminação com produtos de origem animal), e o Tratamento 3 (T3), contendo o conteúdo do GC mais 4% de óleo de Dendê (*Elaeis guineensis*, Jaquim).

Em todas dietas foram utilizados a razão forragem:concentrado de 60:40, sendo a forragem constituída de silagem de Capim elefante cv. Roxa (*Pennisetum purpureum*, Schum) cultivada na área de pastagem da UFRA.

Cada tratamento foi constituído de 10 animais e todos foram pesados a cada 15 dias até atingirem aproximadamente 33 kg aos 90 dias se alimentando das dietas. Os animais foram abatidos e 5 g do músculo *Longissimus lumborum* foi coletado da 13^a vértebra torácica e mantidos em nitrogênio líquido até as análises laboratoriais.

Procedimentos laboratoriais

A extração de RNA foi realizada com 3 mg do tecido muscular macerado em nitrogênio líquido e misturado com o reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sendo conservado a -80°C por 12 h. Em seguida a extração do RNA foi realizada sob as recomendações do fabricante. Todos os RNAs foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) para determinação das concentrações de RNA. O grau de pureza dos RNAs foram determinados pela razão de comprimentos de ondas A260/280 e A230/260. As amostras com coeficientes acima de 2,2 para a razão de A260/280 foram processadas.

PCR em Tempo Real

Os PCRs em tempo real (PCR-RT) foram processados em triplicatas para os genes classificados como sinalizadores de adipocitocinas no músculo (Lim et al., 2017): ATP-citrato sintase (*ACLY*), Aldolase C (*ALDOC*), fosfatase de especificidade dupla-10 (*DUSP10*), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase-1 (*ENPPI*) e ácidos graxos sintase (*FASN*). Para normalização das expressões foi utilizado o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*).

As reações foram realizadas através do método one-step, usando o kit Power Sybr® Green RNA-to-C_TTM one-step Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante a um volume final de 20 µL. Todas as reações foram conduzidas no termocilcador CFX96 TouchTM Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os primers foram desenvolvidos pelo programa online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) e suas sequências estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos primers para determinação das expressões gênicas através do PCR em tempo real.

Genes	Sequências (5'-3')	Tamanho (Posição)	GenBank
<i>ACLY</i>	For: CCAAGGCGATTTCTGAGC Rev: GGCCCAGTCTGTGTCAGG	116 pb (Éxon 1)	ID: 654404
<i>ALDOC</i>	For: TGTGTACAAGGCCCTGAGTG Rev: CATGGCGATCTCCTCTGG	118 pb (Éxon 6)	ID: 101105422
<i>DUSP10</i>	For: ATCTTGCCCTTCCTGTTTCCT Rev: TAGTGGTAGAGGGGCAGGTG	116 pb (Éxon 2)	ID: 101106025
<i>ENPP1</i>	For: GCATGGAACAAGGCAGTTG Rev: TGGAACATCAGAGGGTCTCAG	116 pb (Éxon 13)	ID: 101123048
<i>FASN</i>	For: ACAATCTGTCCCAGGTGTGC Rev: GCCAGGGAGCTGTGAATAAT	121 pb (Éxon 39)	ID: 100170327
<i>GAPDH</i>	For: ATGCCTCCTGCACCACCA Rev: AGTCCCTCCACGATGCCAA	76 pb (Éxon 6)	ID: 443005

pb= pares de bases.

Análises Estatísticas

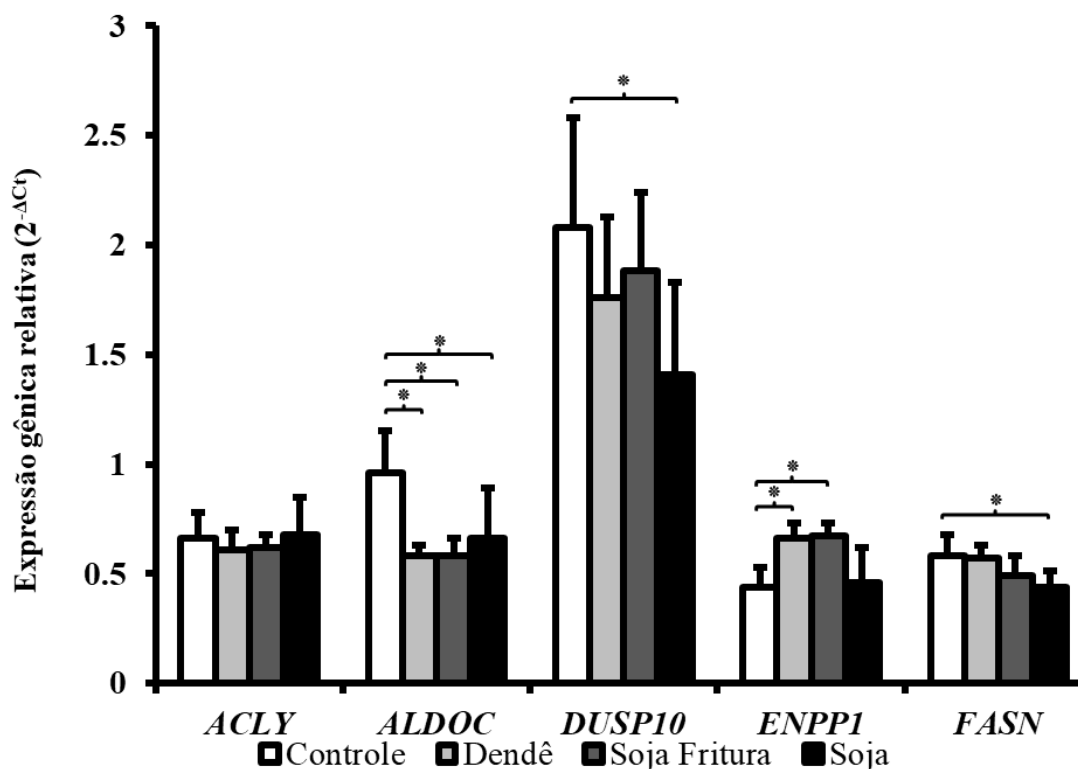
As expressões dos genes foram estimadas através do método $2^{-\Delta Ct}$ usando o *GAPDH* como gene de referência. Os dados de expressão foram testados quanto à Normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov através da programação *PROC UNIVARIATE* e quando necessário, eram transformados pela raiz quadrada. Em seguida, os tratamentos foram submetidos a ANOVA e a dieta controle foi comparada com os demais tratamentos pelo teste de Dunnett usando a programação *PROC GLM*. Todos os procedimentos foram realizados no programa SAS (Versão livre- Edição Universitária). O nível de significância foi de 0,05.

5.5. Resultados

As amostras experimentais foram comparadas com o grupo controle e estão representadas na Figura 1. O gene *ACLY* teve expressão relativa superior a 0,5 para todos os tratamentos, mas não foram determinadas diferenças significativas entre os tratamentos testados e o grupo controle ($P > 0,05$). O gene *ALDOC* apresentou expressão

gênica relativa superior a 0,5 e o grupo controle apresentou expressão relativa significativamente maior em relação aos tratamentos contendo dieta básica mais a adição dos óleos, ou seja, a adição dos óleos na dieta regulou a expressão cerca de 0,4x para menos. O gene *DUSP* apresentou o maior nível de expressão relativa, entre 1,4 e 2,08, porém, a adição do óleo de soja regulou a expressão significativamente para baixo. O gene *ENPP* apresentou níveis relativos de expressão abaixo de 0,5 no grupo controle, o qual não diferenciou do tratamento contendo a adição de óleo de soja. Contudo, a adição dos óleos de dendê e soja de fritura regularam a expressão do gene *ENPP* para cima, cerca 0,5x mais. O gene *FASN* teve o grupo controle com expressão relativa superior a 0,5, porém os tratamentos com adição dos óleos regularam suas expressões para menos, mas só o tratamento contendo óleo de soja regulou a expressão do gene *FASN* significativamente cerca de 0,25x para menos.

Figura 1. Representação gráfica das expressões gênicas relativas dos genes de sinalização de adipocitocinas em ovinos tratados com dietas com adição de óleos.



5.6. Discussão

A adição de óleos na dieta dos ovinos demonstraram que a regulação de diferentes genes ligado a síntese de lipídios podem ser para cima ou para baixo, da mesma forma como observado por Choi et al. (2016), contudo, esses autores observaram a alteração na regulação das expressões de genes no tecido adiposo com a adição de óleo de dendê. Enquanto que Li et al. (2018) observaram diferentes genes ligados a adipocitocinas em diferentes músculos de bovinos e que a produção de lipídios intramusculares estão

ligados a dietas contendo grãos de milho. Park et al. (2017) avaliaram dietas com adição de óleo de dendê em bovinos de corte e concluíram que a os níveis de ácidos graxos intramuscular aumentou, mas a regulação de alguns genes foram para cima e outros para baixo. Porém, nenhum dos genes estudados nestes trabalhos foi avaliado pelos autores acima.

O gene ACLY é responsável pela formação de Acetil-CoA e Oxaloacetato (Enache, 2008). Portanto a expressão desse gene esta diretamente associada a dietas ricas em carboidratos (Graugnard et al., 2010). Como os tratamentos desta pesquisa continham baixas concentrações dos diferentes óleos, possivelmente essa concentração não foi suficiente para suprimir a expressão do gene ACLY, pois segundo Carrer et al. (2017), dietas ricas em gorduras suprimem a expressão do gene ACLY e que os animais quando expostos a dietas ricas em carboidratos ocorre a indução de sua expressão.

A presença dos óleos na dieta apresentaram efeitos antagônico, diminuindo significativamente a regulação do gene Aldolase C. Esse gene esta envolvido na glicólise e no caminho reverso da gliconeogênese, convertendo a 1,6-bifosfato-frutose para 3-fosfato gliceraldeido e fosfato-dihidroxicetona pela clivagem do grupamento aldol para a produção de ATP, isso é mais efetivo quando o organismo esta sob dieta rica em carboidratos (Langellotti et al., 2014).

O gene DUSP10 foi o que demonstrou os maiores níveis de expressão relativa entre todos os genes analisados e apresenta um papel importante na regulação da proteína ativada por mitógeno (MAP), que tem como principal função as respostas do sistema imunológico inato e adaptativo como um inibidor de inflamação (Zhang et al., 2004). Esse gene regula o balanço energético através da diferenciação do tecido adiposo marrom (Choi et al., 2013). Em bovinos das raças Wagyu e Holandesa, que apresentam diferentes deposições de gordura, foram identificados altos níveis de expressão do gene DUSP10, e portanto, o tratamento com a adição de óleo de soja apresentou menor expressão, o que pode resultar em uma menor deposição de gordura no músculo.

A expressão do gene ENPP1 produz uma proteína de membrana que interagem com os receptores de insulina e subsequentemente inibe a sinalização e função da insulina (Costanzo et al., 2001). Portanto, mudanças nas concentrações de algumas adipocitocinas no plasma afetam o metabolismo dos lipídios e da glicose em todos os tecidos. No caso do tecido adiposo, pode ocorrer um aumento excessivo de ácidos graxos na corrente sanguínea por conta da expressão do ENPP1 e em outra condição ela pode afetar a glicose mediada pela insulina no músculo esquelético (Liang et al., 2007). Sendo assim a adição dos óleos de Dendê e de Soja de fritura regularam a expressão para cima, o que vai interferir no metabolismo lipídico, podendo até chegar a um quadro de diabetes adquirida no organismo (Chen et al., 2017).

O gene FASN expressa uma enzima responsável pela catalise do Malonil-CoA, formando Palmitato, a partir da condensação sequencial de uma molécula acetil-CoA e sete malonil-CoA, na presença de NADPH e é altamente expresso em diferentes tecidos (Roy et al., 2006). Dentre os tratamentos estudados a regulação da expressão do gene

FASN foi significativamente menor para o tratamento com óleo de soja em relação ao grupo controle, apesar disso a expressão é considerada moderada, indicando a não interferência na síntese de ácidos graxos, pois esta proteína é a principal enzima na biossíntese de ácidos graxos e o complexo multifuncional do FASN aumenta a eficiência da síntese de ácidos graxos e diminui a interferência de reações de competição no citosol (Angeles e Hudkins, 2016).

5.7. Referências

- Angeles TS, Hudkins RL. Recent advances in targeting the fatty acid biosynthetic pathway using fatty acid synthase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov.* 2016, 11: 1187-1199. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1245286>
- Batista ASM, Costa RG, Garruti DS, Madruga MS, Queiroga RCRE, Araújo Filho JT. Effect of energy concentration in the diets on sensorial and chemical parameters of Morada Nova, Santa Inez and Santa Inez × Dorper lamb meat. *R Bras Zootec.* 2010, 39: 2017-2023.
- Carrer A, Parris JLD, Trefely S, Henry RA, Montgomery DC, Torres A, Viola JM, Kuo YM, Blair IA, Meier JL, Andrews AJ, Snyder NW, Wellen KE. Impact of a High-fat Diet on Tissue Acyl-CoA and Histone Acetylation Levels. *J Biol Chem.* 2017, 292: 3312–3322.
- Chen L, Qin Y, Liang D, Liang X, Liang Y, Li L, Xian J, Zhang L, Tong L, Li H, Zhang H. Gender differences in the association of ENPP1 polymorphisms with type 2 diabetes in a Chinese population. *Gene.* 2017, 637:190-195. doi: 10.1016/j.gene.2017.09.052.
- Choi HR, Kim WK, Kim EY, Han BS, Min JK, Chi SW, Park SG, Bae KH, Lee SC. Dual-Specificity Phosphatase 10 Controls Brown Adipocyte Differentiation by Modulating the Phosphorylation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *PLoS One.* 2013, 8: e72340.
- Choi SH, Park SK, Choi CW, Li XZ, Kim KH, Kim WY, Jeong J, Johnson BJ, Zan L, Smith SB. The Expression of Adipogenic Genes in Adipose Tissues of Feedlot Steers Fed Supplementary Palm Oil or Soybean Oil. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2016, 29: 404–412.
- Costanzo BV, Trischitta V, Di Paola R, Spampinato D, Pizzuti A, Vigneri R, Frittitta L. The Q allele variant (GLN¹²¹) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (LYS¹²¹). *Diabetes.* 2001, 50:831–836.
- Enache LS. ATP citrate lyase – biology and implication in human pathology. *Rev Romana Med Lab.* 2008, 12: 17-29.
- Gomes RC, Leme PR, Silva SL, Antunes MT, Guedes CF. Carcass quality of feedlot finished steers fed yeast, monensin, and the association of both additives. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2009, 61:648-654.
- Graugnard DE, Berger LL, Faulkner DB, Loor JJ. High-starch diets induce precocious adipogenic gene network up-regulation in longissimus lumborum of early-weaned Angus cattle. *Br J Nutr.* 2010, 103: 953-963. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114509992789>

- Jaeger SMPL, Dutra AR, Pereira JC, Oliveira ISC. Características da carcaça de bovinos de quatro grupos genéticos submetidos a dietas com ou sem adição de gordura protegida. *R Bras Zootec.* 2004, 33: 1876–1887.
- Langellotti S, Romano M, Guarnaccia C, Granata V, Orrù S, Zagari A, Baralle FE, Salvatore F. A novel anti-aldolase C antibody specifically interacts with residues 85-102 of the protein. *MAbs.* 2014, 6:708-717. doi: 10.4161/mabs.28191. Epub 2014 Feb 13.
- Li H, Wang H, Yu L, Wang M, Liu S, Sun L, Chen Q. Effects of supplementation of rumen-protected choline on growth performance, meat quality and gene expression in longissimus dorsi muscle of lambs. *Arch Anim Nutr.* 2015; 69:340-50. doi: 10.1080/1745039X.2015.1073001.
- Li XZ, Yan CG, Gao QS, Yan Y, Choi SH, Smith SB. Adipogenic/lipogenic gene expression and fatty acid composition in chuck, loin, and round muscles in response to grain feeding of Yanbian Yellow cattle. *J Anim Sci.* 2018, 96: 2698-2709. doi: 10.1093/jas/sky161.
- Liang J, Fu M, Ciociola E, Chandalia M, Abate N. Role of ENPP1 on Adipocyte Maturation. *PLoS ONE.* 2007, 2:e882. doi:10.1371/journal.pone.0000882
- Lim KS, Lee KT, Park JE, Chung WH, Jang GW, Choi BH, Hong KC, Kim TH. Identification of differentially expressed genes in longissimus muscle of pigs with high and low intramuscular fat content using RNA sequencing. *Anim Genet.* 2017, 48: 166–174.
- Park S, Yan Z, Choi C, Kim K, Lee H, Oh Y, Jeong J, Lee J, Smith SB, Choi S. Carcass and Meat Characteristics and Gene Expression in Intramuscular Adipose Tissue of Korean Native Cattle Fed Finishing Diets Supplemented with 5% Palm Oil. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2017, 37:168–174.
- Pinto LFB, Ferraz JBS, Meirelles FV, Eler JP, Rezende FM, Carvalho ME, Almeida HB, Silva RCG. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genet Mol Res.* 2010, 9: 1431-1442.
- Roy R, Ordovas L, Zaragoza P, Romero A, Moreno C, Altarriba J, Rodellar C. Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content. *Anim Genet.* 2006, 37:v215-218.
- Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res.* 2003, 42: 289–317.
- Zhang Y, Blattman JN, Kennedy NJ, Duong J, Nguyen T, Wang Y, Davis RJ, Greenberg PD, Flavell RA, Dong C. Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature.* 2004; 430: 793-797.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATE, NICOLA; CHANDALIA, MANISHA; DI PAOLA, ROSA; FOSTER, DANIEL, W.; GRUNDY, SCOTT M; TRISCHITTA, VINCENZO. Mechanisms of Disease: ectonucleotidepyrophosphatase phosphodiesterase 1 as a 'gatekeeper' of insulin receptors. **NatureReviewsEndocrinology**2, 694–701. 2006.
- ABDALLA, A.L et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.260-258, 2008.
- ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **NatureReviewsGenetics**, v.5, p.202-212, 2004.
- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: **Instituto FNP**, 2016.
- ARAKAKI, T.L.; PEZZA, J.A.; CRONIN, M.A.; HOPKINS, C.E.; ZIMMER, D.B.; TOLAN, D.R.; ALLEN, K.N. Structure of human brain fructose 1,6-(bis)phosphate aldolase: linking isozyme structure with function. **Protein Science**.13 (12): 3077–84. 2004.
- ARTHUR, P.F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M.A. Incidence of dystocia and perinatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. **The Canadian Veterinary Journal**; v.29:163-167, 1988.
- ARTHUR, P.F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M.A.; BERG, R.T. Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: I. Reproduction and growth traits. **Journal Animal Science**; v.67:902-910,1989.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. 16 ed., Washington D.C., p1094,1995.
- AYROLES, J.F.; HUGHES, K.A.; ROWE, K.C. et al A genomewide assessment of inbreeding depression: gene number, function, and mode of action. **Conservation Biology**, v.3, p.920–930, 2009.
- BANKS, R. The Meat Elite Project: establishment and achievements of an elite meat sheep nucleus. **Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics**;v.12:598-601, 1997.
- BANSKALIEVA, V.; SAHLU, T.; GOETSCH, A.L. Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: a review. **Small Ruminant Research**, v.37, p.255-268, 2000.
- BATISTA, A. S. M.; COSTA, R. G.; GARRUTI, D. S.; MADRUGA, M. S.; QUEIROGA, R. C. R. E.; ARAÚJO FILHO, J. T. Effect of energy concentration in the diets on sensorial and chemical parameters of Morada Nova, Santa Inez and Santa Inez × Dorper lamb meat. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2017-2023, 2010.
- BATISTA, A.S.M. Qualidade da carne de ovinos Morada Nova, Santa Inês e Mestiços Dorper x Santa Inês submetidos a dietas com diferentes concentrações energéticas. 127 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal da Paraíba, Paraíba. 2008.
- BELLINGE, R.H.S.; LIBERLES, D.A.; IASCHI, S.P.A.; O'BRIEN, A.; TAY, G.K. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. **Animal Genetic**.v.36:1-6, 2005.

- BIESALSKI, H. K. Meat as a component of a healthy diet: are there any risks or benefits if meat is avoided? **Meat Science**, Barking, v.70, n.3, p.509-524, 2005.
- BONAGURIO, S.; PÉREZ, J.R.O.; GARCIA, I.F.F. et al. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês puros e mestiços com Texel abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1981-1991, 2003.
- BRIDI, A. M.; CONSTANTINO, C. Qualidade e Avaliação de Carcaças e Carnes Bovinas. Departamento de Zootecnia da UEL www.uel.br/grupo-pesquisa/gpac, 2010.
- BRIDI, A.M.; CONSTANTINO, C.; TARSITANO, M.A. Qualidade da carne de bovinos produzidos em pasto. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ANIMAL A PASTO, Maringá, Paraná, 2011. **Anais...** Maringá: UEM, 2011.
- BUCCIONI, A.; DECANDIA, M.; MINIERI, S. et al. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. **Animal Feed Science and Technology**. 174: 1– 25. 2012
- BUSBOOM, J.R.; WAHL, T.I.; SNOWDER, G.D. Economics of callipyge lamb production. **Journal of Animal Science**; 77:243-248, 1999.
- CARNAC, G.; RICAUD, S.; VERNUS, B.; BONNIEU, A. "Myostatin: biology and clinical relevance". **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**. 6 (7): 765–70, 2006.
- CASTRO, A.A. Revisão Sistemática e Meta-análise. Acesso em: 2/07/2017. [http://www.metodologia.org/](http://www.metodologia.org;); 1-11, 2011.
- CHIRALA, S.S.; JAYAKUMAR, A.; GU, Z.W.; WAKIL, S.J. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 98 (6): 3104–8, 2001.
- CHURCH, D.C. El Ruminat: Fisiología Digestiva y Nutrición. 3ª edição. Acribia (Zaragoza, Espanha), 1988.
- CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H.; PIROTTIN, D.; TORDOIR, X.; BIBÉ, B.; BOUIX, J.; CAIMENT, F.; ELSÉN, J.M.; EYCHENNE, F.; LARZUL, C.; LAVILLE, E.; MEISH, F.; MILENKOVIC, D.; TOBIN, J.; CHARLIER, C.; GEORGES, M. "A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep". **Nature Genetics**. 38 (7): 813–18, 2006.
- COSTA, R.G., QUEIROGA, R.C.R.E., PEREIRA, R.A.G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 307-321, 2009.
- COUTO, F. A. d'A. Dimensionamento do Mercado de Carne Ovina e Caprina no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OVINOS E CAPRINOS DE CORTE, 2., 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 2003. 1 CD ROM.
- DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farmanimals. **British Journal of Nutrition**. 78(suppl. 1): 15-35, 1997.
- DU, S.; GUAN, Z.; HAO, L.; SONG, Y.; WANG, L.; GONG, L.; LIU, L.; QI, X.; HOU, Z.; SHAO, S. Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration. **PLOS ONE**. 9 (1): e85804, 2014.

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

FATLAND, B.L.; KE, J.; ANDERSON, M.D.; MENTZEN, W.I.; CUI, L.W.; ALLRED, C.C.; JOHNSTON, J.L.; NIKOLAU, B.J.; WURTELE, E.S. Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in Arabidopsis. **Plant Physiology**. 130 (2): 740–756, 2002.

FONSECA, L.F.S.; GIMENEZ, D.F.; MERCADANTE, M.E.; BONILHA, S.F.; FERRO, J.A.; BALDI, F.; SOUZA, F. R.P.; ALBUQUERQUE, L.G. Expression of genes related to mitochondrial function in Nellore cattle divergently ranked on residual feed intake. **Molecular Biology Reports**, v.42, n.2, p.559–565, 2015.

GARCIA, C. A.; MONTEIRO, A. L. G.; COSTA, C.; NERES, M. A.; ROSA, G. J. M. Medidas Objetivas e Composição Tecidual da Carça de Cordeiros Alimentados com Diferentes Níveis de Energia em Creep Feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p. 1380-1390, 2003.

GE, G.; GREENSPAN, D.S. "Developmental roles of the BMP1/TLD metalloproteinases". Birth Defects Research. Part C, **Embryo Today: Reviews**. 78 (1): 47–68.2006.

GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J.F.; CULIOLI, J. 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**, v. 41, n. 1, p. 1-26, 2001.

GIBB, D. J. et al. Effect of full-fat hemp seed on performance and tissue fatty acids of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 223-230, 2005.

GOMES, R.C. LEME, P.R. SILVA, S.L. ANTUNES, M.T. GUEDES, C.F. Carcass quality of feedlot finished steers fed yeast, monensin, and the association of both additives. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 648-654, 2009.

GONZALEZ-CADAVID NF, TAYLOR WE, YARASHESKI K, SINHA-HIKIM I, MA K, EZZAT S, SHEN R, LALANI R, ASA S, MAMITA M, NAIR G, ARVER S, BHASIN S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95 (25): 14938–43, 1998.

GUAY, C.; MADIRAJU, S.R.; AUMAIS, A.; JOLY, E.; PRENTKI, M. "A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion". **Journal Biological Chemistry**. 282 (49): 35657–35665, 2007.

HAISMA, H.J.; DE HON, O. "Gene doping". **International Journal of Sports Medicine**. 27 (4): 257–66, 2006.

HARRISON, P. W.; WRIGHT, A. E.; MANK, J. E. The evolution of gene expression and the transcriptome–phenotype relationship. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v.23, p.222– 229, 2012.

- HESS, B. W.; MOSS, G. E.; RULE, D. C. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p. 188-204, 2008.
- HILLER, B.; HERDMANN, A.; NUERNBERG, K. Dietary n-3 fatty acids significantly suppress Lipogenesis in bovine muscle and adipose tissue: **A Functional Genomics Approach**. *Lipids*, Champaign, v. 6, n. 7, p. 557 - 567, July 2011.
- HONING, Y.V.D.; WIEMAN, B.J.; STEG, A. et al. The effect of fat supplementation of concentrates on digestion and utilization of energy by productive dairy cattle. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.29, p.79, 1981.
- HOUEBINE, L.M. Transgenesis to improve animal production. **Livestock Production Science**, v.74, p.255-268, 2002.
- IVAN, M.; MIR, P. S.; KOENIG, K. M. ; RODE, L. M. ; NEILL, L. ; ENTZ, T.; MIR, Z. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 215-227, 2001.
- JAEGER, S. M. P.; DUTRA, A. R.; PEREIRA, J. C. et al. Características da carcaça de bovinos de quatro grupos genéticos submetidos a dietas com ou sem adição de gordura protegida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33 (6): 1876–1887, 2004.
- JAYAKUMAR, A.; CHIRALA, S.S.; CHINAULT, A.C.; BALDINI, A.; ABU-ELHEIGA, L.; WAKIL, S.J. (Feb). "Isolation and chromosomal mapping of genomic clones encoding the human fatty acid synthase gene". **Genomics**. 23 (2): 420–4, 1995.
- JENKINS, T. C. et al. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 397-412, 2008.
- JENKINS, T.C. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism – Lipid Metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851-3863, 1993.
- JEREMIAH, L. E.; DUGAN, M. E. R.; AALHUS, J. L.; GIBSON, L. L. Assessment of the relationship between chemical components and palatability of major beef muscles and muscle groups. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1013–1019, 2003.
- JOHNSON, D. D. & C. H. MCGOWAN. Diet management effects on carcass attributes and meat quality of young goats. **Small Ruminant Research**. 28(3):93-98.1998.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**. 73:2483–2492, 1995.
- JOULIA-EKAZA, D.; CABELLO, G. "The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance". **Current Opinion in Pharmacology**. 7 (3): 310–5, 2007.
- JUMP, D. B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 13, n. 2, p. 155-164, 2002.
- KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.; BASS, J.J. "Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle". **Genome Research**. 7 (9): 910–16, 1997.
- KELLY, A.K.; WATERS, S.M.; MCGEE, M.; FONSECA, R.G.; CARBERRY, C.; KENNY, D.A. mRNA expression of genes regulating oxidative phosphorylation in the

muscle of beef cattle divergently ranked on residual feed intake. **Physiological Genomics**, v.43, p.12–23, 2011.

KEYNES, M.M.L.C. Meat and Livestock Commission. Sheep Year Book, England.1994.

KNIGHT, H.; ZARKA, D. G.; OKAMOTO, H.; THOMASHOW, M. F.; KNIGHT, M. R. Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of coldregulated genes via the CRT promoter element. **PlantPhysiology**, v.135, p.1710–1717, 2004.

KOZLOSKI, G. V. Bioquímica dos ruminantes. Editora UFSM, Santa Maria: UFSM, 139p, 2002.

KOZLOSKI, G.V. Bioquímica dos ruminantes. 2.ed. – Santa Maria: Ed. daUFSM, 216 p., 2009.

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

LANGELLOTTI S, ROMANO M, GUARNACCIA C, GRANATA V, ORRÙ S, ZAGARI A, BARALLE FE, SALVATORE F. A novel anti-aldolase C antibody specifically interacts with residues 85-102 of the protein. *mAbs*. 6(3): 708–17, 2014.

LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 384p, 2005.

LEMO, B.; ARARIPE, L. O.; FONTANILLAS, P.; HARTL, D. L. Dominance and the evolutionary accumulation of cis- and trans-effects on gene expression. *Proc Natl AcadSci USA*, v.105, p.14471–14476, 2008.

LIM, K. S., LEE, K. T., PARK, J. E., CHUNG, W. H., JANG, G. W., CHOI, B. H., HONG, K. C. AND KIM, T. H. Identification of differentially expressed genes in longissimus muscle of pigs with high and low intramuscular fat content using RNA sequencing. **Animal Genetics**, 48: 166–174, 2017.

LOUGH, D. S.; SOLOMON, M. B.; RUMSEY, J. T. S.; KAHLT, S.; SLYTERT, L. L. The effects of highforagediets with added palm oil on performance, plasma lipids, and carcass characteristics of ram lambs with initially high or low plasma cholesterol. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 2, p. 330-336, 1994.

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

MACEDO, V. P.; GARCIA, C. A.; SILVEIRA, A. C.; MONTEIRO, A. L. G.; MACEDO, F. A. F.; SPERS, R.C. Composições tecidual e química do lombo de cordeiros alimentados com rações contendo semente de girassol em comedouros privativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 10, p. 1860-1868, 2008.

MADDUX, B.A.; GOLDFINE, I.D. "Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit". **American Diabetes Association**. 49 (1): 13–9, 2000.

MAHGOUB, O.; KHAN, A.J.; AL-MAQBALY, R.S. et al. Fatty acid composition of muscle and fat tissues of Omán Jebel Akhdar goats of different sexes and weights. **Meat Science**, v.61, p.38-387, 2002.

- MAIN, B. J.; BICKEL, R. D.; MCINTYRE, L. M. GRAZE, R. M. CALABRESE, P. P.; NUZH DIN, S. V. Allele-specific expression assays using Solexa. **BMC Genomics**, v.10, p.422, 2009.
- MARTIN, C. et al. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 2642-2650, 2008.
- MCDANIELL, R.; LEE, B. K.; SONG, L.; LIU, Z.; BOYLE, A. P.; ERDOS, M. R.; ESCOTT L. J.; MORKEN, M. A.;KAUCERA, K. S.; BATTENHOUSE, A.;KEEFE, D.; CLLINS, F. S.; WILLARD, H. F.; LIEB, J. D.; FURY, T. S.; CARWFORD, G. E.; IYER, V.R.; BINEY, E. Heritable individual specific and allele-specific chromatin signatures in humans.Science, v.328, p.235–239, 2010.
- MORGADO, E. D. S. Óleo em dietas para ovinos alimentados com amido ou fibras solúveis em detergente neutro. 2011. 84 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista,Jaboticabal, 2011.
- MOSHER, D.S.; QUIGNON, P.; BUSTAMANTE, C.D.; SUTTER, N.B.; MELLERSH, C.S.; PARKER, H.G.; OSTRANDER, E.A.; "A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs". **PLoS Genetics**. 3 (5): e79, 2007.
- MULLER, L. Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaça de novilhos. 2. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria;31,1987.
- NSERLAND, G. Forekommerdobbeltlenderkarakteren hos andrehusdyrarterennstorfe? Universellhyperplasiavstammensoglemmenesmuskulatur hos sau. Skandinavisk Veterinsertidsskrift;811-830,1940.
- O'QUINN, T. G., BROOKS, J. C., POLKINGHORNE, R. J.,GARMYN, A. J., JOHNSON, B. J.,STARKEY, J. D., RATHMANN, R. J., MILLER, M. F. Consumer assessment of beef strip loin steaks ofvarying fat levels. **Journalof Animal Science**, v. 90, n. 2, p. 626–634, 2012.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Estatísticas FAO. 2015. Disponível em: <www.faostat.fao.org>. Acesso em:15 junho 2017.
- ORTIZ,L. F. P. Níveis crescentes de gordura protegida na terminação de cordeiros em confinamento. Dissertação (Mestrado),UFGD.Dourados – MS.73f. 2011.
- OSÓRIO, J.C.S.; OSÓRIO, M.T.M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.292-300, (supl. especial). 2009.
- PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismode lipídios. In: BERCHIELLI, T. T.; VAZ PIRES, A.;OLIVEIRA, S. G. de. (Ed.). Nutrição de ruminantes.Jaboticabal: FUNEP, p. 287-310, 2006.
- PASTINEN, T. Genome-wide allele-specific analysis: insights into regulatory variation. **Nature Reviews Genetics**.v.11, p.533–538, 2010.
- PENNINGTON, J. A.; VAN DEVENDER, K. Heat stress in dairycattle.University of Arkansas Cooperative Extension.FSA3040- 1-1M-99R, 2004.

PERFIELD II, J. W. et al. Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid (CLA) reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 2211-2218, 2007.

PINTO, L.F.B. ; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; ELER, J.P.; REZENDE, F.M.; CARVALHO, M.E. ALMEIDA, H.B.; SILVA, R.C.G. Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nelore cattle. **Genetics and Molecular Research**. V. 9, n 3, p. 1431-1442. 2010.

RODRIGUES, A.M.C; DARNET, S.H; SILVA, L.H. Fatty acid profiles and tocoferol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucumã (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueibaparaensis*) and inaja (*Maximilianaria ripa*) fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**. Vol. 21, p. 2000-2004, 2010.

SAFARI, E.; FOGARTY, N. M.; FERRIER, G. R.; HOPKINS, L. D.; GILMOUR, A. Diverse lamb genotypes. 3. Eating quality and the relationship between its objective measurement and sensory assessment. **Meat Science**, Barking, v.57, n.2, p.153-159, 2001.

SAÑUDO, C.; ARRIBAS, M.M.C.; SILVA SOBRINHO, A.G. Qualidade da carcaça e da carne ovina e seus fatores determinantes. In: SILVA SOBRINHO, A.G.; SAÑUDO, C.; OSÓRIO, J.C.S.; ARRIBAS, M.M.C.; OSÓRIO, M.T.M. Produção de carne ovina. Jaboticabal, p.183, 2008.

SHAHIN, K.A.; BERG, R.T. Growth patterns of muscle, fat and bone, and carcass composition of double muscled and normal cattle. **Canadian Journal of Animal Science**; 65:279-293, 1985.

SILVA SOBRINHO, A. G. Aspectos quantitativos e qualitativos da produção de carne ovina. In: A PRODUÇÃO ANIMAL NA VISÃO DOS BRASILEIROS, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p.425-446, 2001.

SILVA, M.M.C.; RODRIGUES, M.T.; BRANCO, R.H.; RODRIGUES, C.A.F.; SARMENTO, J.L.R.; QUEIROZ, A.C.; SILVA, S.P. Suplementação de lipídios em dietas para cabras em lactação: consumo e eficiência de utilização de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 36, 1, 257-267, 2007.

SMITH, G.C. Factors affecting the palatability of beef. In: Future beef operations seminar. 2001.

SMITH, S.; WITKOWSKI, A.; JOSHI, A.K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. **Progress in Lipid Research** 42 (4): 289–317, 2003.

SUN, T.; HAYAKAWA, K.; BATEMAN, K.S.; FRASER, M.E. Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**. 285 (35): 27418–27428, 2010.

TANOUE, T.; YAMAMOTO, T.; MAEDA, R.; NISHIDA, E. "A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs". **Journal of Biological Chemistry**. United States. 276 (28): 26629–39, 2001.

THEODOSIOU, A.; SMITH, A.; GILLIERON, C.; ARKINSTALL, S.; ASHWORTH, A. "MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases". **Oncogene**. 18 (50): 6981–8, 2000.

TSUCHIDA K. "Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders". *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 11 (4): 487–94, 2008.

VON KORFF, M.; RADOVIC, S.; CHOUMANE WET, A. L. Asymmetric allelespecific expression in relation to developmental variation and drought stress in barley hybrids. **The Plant Journal**, v.59, p.14–26, 2009.

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

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

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

YOUNES, M.; ABDOLREZA, S.; DAVOOD, K.; SEYED, A.A. Application of myostatin in sheep breeding programs: A review. **Molecular Biology Research Communications**;3(1):33-43, 2014.