



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE DO NORTE DO TOCANTIS
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA NOS TRÓPICOS**

ANDREY DE SOUSA MIRANDA

**SUPLEMENTAÇÃO COM GORDURA PROTEGIDA DURANTE A SEGUNDA
METADE DA GESTAÇÃO EM OVELHAS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA,
PERFIL HISTOLÓGICO E QUALIDADE DE CARNE DA PROGÊNIE**

PARAUAPEBAS/PA

2022

ANDREY DE SOUSA MIRANDA

**SUPLEMENTAÇÃO COM GORDURA PROTEGIDA DURANTE A SEGUNDA
METADE DA GESTAÇÃO EM OVELHAS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA,
PERFIL HISTOLÓGICO E QUALIDADE DE CARNE DA PROGÊNIE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Norte do Tocantins e à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos (PPGIZT) para obtenção do título de mestre.

Área de pesquisa: Tecnologia na produção animal

Orientadora: Prof^ª Dr^a Kaliandra Souza Alves

Coorientador: Prof^ª Dr. Mateus Pies Gionbelli e
Prof^ª Dr. Luis Rennan Sampaio Oliveira

PARAUAPEBAS/PA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTEGRADO EM ZOOTECNIA NOS TRÓPICOS

ATA da reunião da Comissão Julgadora de Defesa de Dissertação

Ao décimo oitavo dia do mês de julho de dois mil e vinte e dois, às 14:00 horas, por meio de videoconferência, sob a presidência de Kaliandra Souza Alves, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da 23ª Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação Integrado em Zootecnia nos Trópicos, Mestrando(a) ANDREY DE SOUSA MIRANDA visando à obtenção do título de “MESTRE EM PRODUÇÃO ANIMAL”, área de concentração Produção Animal, assim constituída: Presidente: Kaliandra Souza Alves, 1ª Examinadora: Karolina Batista Nascimento, 2º Examinador: Germán Darío Ramírez-Zamudio, 3º Examinador: Rafael Mezzomo. Iniciados os trabalhos, o(a) candidato(a) submeteu-se ao exame de sua DISSERTAÇÃO intitulada: “SUPLEMENTAÇÃO COM GORDURA PROTEGIDA DURANTE O MEIO-GESTACÃO EM OVELHAS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA, PERFIL HISTOLÓGICO E QUALIDADE DE CARNE DA PROGÊNIE”. Terminado o exame que constou da explanação do trabalho de Dissertação feito pelo estudante e da arguição pela Banca Examinadora, o mestrando foi considerado **APROVADO**. A conclusão do curso está condicionada a realização das correções sugeridas pela banca examinadora e entrega das versões finais (três cópias impressas e uma em formato digital (pdf – armazenada em CD ROM) na secretaria do Programa, juntamente com comprovante de aceito para avaliação de um artigo para revista inscrita no Qualis (Zootecnia e Recursos Pesqueiros) entre A1 e B4, no prazo de 30 dias úteis, a contar desta data. Apenas após cumprir todos os componentes parciais de defesa i) qualificação, ii) defesa de mérito e iii) dissertação corrigida e comprovação de submissão de artigo, o(a) candidato(a) fará jus ao título de “MESTRE EM PRODUÇÃO ANIMAL” com a área de concentração em PRODUÇÃO ANIMAL, que para constar, lavrou-se a presente ATA, assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora e pelo Coordenador do Curso.

Parauapebas (PA), 18 de julho de 2022.

Prof.ª Dra. Kaliandra Souza Alves (Presidente)

Prof.ª Dra. Karolina Batista Nascimento (Primeira Examinadora)

Prof. Dr. Germán Darío Ramírez-Zamudio (Segundo Examinador)

Prof. Dr. Rafael Mezzomo (Terceiro Examinador)

Prof. Dr. Raylon Pereira Maciel (Coordenador do PPGIZT – Parauapebas)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M672s Miranda, Andrey de Sousa
Suplementação com gordura protegida durante a segunda metade da gestação em ovelhas sobre a expressão gênica, perfil histológico e qualidade de carne da progênie / Andrey de Sousa Miranda. - 2022. 59 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Produção Animal na AMAZÔNIA (PPGPAA), Campus Universitário de Parauapebas, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Parauapebas, 2022.

Orientador: Profa. Dra. Kaliandra Alves

Coorientador: Prof. Dr. Mateus Pies Gionbelli e Luis Rennan Sampaio Oliveira.

1. Adipogênese. 2. Miogênese. 3. Nutrição materna. 4. Programação fetal. I. Alves, Kaliandra, *orient.*

II. Título

CDD 599.098115

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre se fazer presente nos mais diversos momentos. Por ter me dado força, coragem e sabedoria ao longo desse tempo.

À FAPESPA, pela concessão da bolsa de mestrado e à CAPES, por meio do PROCAD Amazônia pelo auxílio moradia na realização do intercâmbio entre UFRA e UFLA para realizações das análises laboratoriais.

Ao PPGPAA Campus Parauapebas pela oportunidade de realização do mestrado e por todo conhecimento e experiência adquirida por meio do corpo docente.

À minha família, que mesmo distante sempre se manteve presente em minha vida. Por todo apoio, cuidado e carinho. A minha melhor amiga Rafaela Freitas, por toda palavra de incentivo e apoio, que mesmo distante sempre se manteve presente ao longo dessa caminhada.

À minha orientadora Kaliandra Alves, ao qual tenho muito respeito e gratidão, por ter me dado a chance de ser seu orientado e ter me ensinado muito sobre a vida. Por todo aprendizado, apoio, dedicação e comprometimento na realização deste extenso e exaustivo trabalho. Pelo enorme crescimento profissional que obtive graças a oportunidade de ser seu orientado, além disso por ter se tornado uma grande amiga que levarei por toda vida em meu coração.

Aos meus coorientadores, Renan Sampaio, Rafael Mezzomo e Mateus Gionbelli pela colaboração e apoio em cada fase na execução deste trabalho.

À minha parceira e amiga, Mariana Andrade. Por ter me acolhido e ter me incluído em sua maravilhosa família. Por toda ajuda na execução diária do experimento, incentivo e apoio, que sem dúvida não teria conseguido sozinho. À família da Mariana, especialmente aos seus pais Ana Araújo e Fagner, por todo cuidado, acolhimento e por terem se tornado minha segunda família, à vocês minha eterna gratidão.

Aos estagiários do GEPARC, por todo apoio e execução das atividades diárias. Especialmente à Tânia, Âdila, Ramilly, Davis, Fernanda, Bento, Estefany, Emilly, Ellen, Arthur, Cláudia, Marina. Ao meu grande amigo tratador Chiquinho por todo apoio e ajuda, você é um grande homem. Aos funcionários do Campus por toda conduta e disponibilidade quando sempre precisamos.

Aos amigos da UFLA, Luana, Karol, Dario, Ludmila e Marcela. Por todo colaboração e ajuda na execução das análises finais do experimento. À Tathyane que tive o prazer de conhecer e trabalhar junto, por sempre tirar minhas dúvidas, todos os ensinamentos e ter me apresentado o universo infinito da biologia molecular.

MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

A nutrição materna proporcionada pela disponibilidade de nutrientes na dieta durante a gestação pode resultar em efeitos diretos na progênie sobre características de desempenho e qualidade da carne, através de mecanismo epigenéticos. Com base nisto, o objetivo com este estudo consistiu em avaliar os efeitos da suplementação da dieta materna com sais de cálcio de óleo de soja na de ovelhas mestiças Dorper x Santa Inês durante a segunda metade gestacional na expressão de genes maternos e da prole; bem como a qualidade de carne e perfil histológico da prole. Aos 74 dias de gestação, 43 ovelhas múltiparas ($44,10 \pm 6,87$ kg PC inicial,; 2 ± 1 partos) deslanadas (mestiças Dorper x Santa Inês) gestantes de fêmeas ($n = 18$) e machos ($n = 25$), foram alocadas em baias individuais e distribuídas aleatoriamente aos seguintes tratamentos: (1) Controle (CON; $n = 21$) – fornecimento de dieta basal formulada para atender as exigências nutricionais básicas de ovelhas gestantes de único cordeiro, ou (2) Suplementação com gordura protegida (CSSO; $n = 22$) – dieta basal acrescida de suplementação com sais de cálcio do óleo de soja (gordura protegida no rúmen) recebendo diariamente 1,5g por kg do peso corporal [5% de inclusão com base na matéria seca (MS)]. Foram coletadas amostras dos tecidos adiposo e muscular da progênie aos 15 dias de idade e ao abate para avaliação de marcadores miogênicos, fibrogênicos, adipogênico e lipogênicos. Ao abate, amostras do músculo *Longissimus lumborum* foram coletadas para análise histológica e aspectos qualitativos da carne. Os dados foram considerados em um esquema fatorial 2×2 , referente ao tratamento nutricional materno (CON vs. CSSO), e o sexo da progênie (machos vs. fêmeas). Foi observado interação entre a nutrição materna e sexo da progênie, em que ovelhas CSSO gestantes de fêmeas apresentaram maior expressão $PPAR\gamma$ ($P = 0,01$) no tecido adiposo e $ACACA$ ($P < 0,001$) no tecido hepático. Houve interação ($P < 0,05$) para área, perímetro e diâmetro das fibras musculares da progênie, com respostas favoráveis observadas para fêmeas-CSSO em comparação aos demais tratamentos. Houve interação NM x SP sobre a expressão relativa do $ZFP423$ e $MyoG$ aos 15 dias de idade ($P < 0,05$), com respostas favoráveis para fêmeas CSSO. Ao abate, o mesmo grupo também demonstrou maior expressão do $PPAR\gamma$ ($P < 0,001$) comparado aos demais tratamentos. Progênies CSSO apresentaram menor expressão do $MyHC I$ e maior do $PPAR\gamma$ ($P = 0,01$), e maior espessura de gordura subcutânea (EGS, $P = 0,04$), espessura máxima de gordura sobre o *Longissimus lumborum* (medida GR; $P = 0,05$) e perdas totais (cocção e descongelamento; $P = 0,04$) que CON. Portanto, a nutrição materna com sais de cálcio do óleo de soja durante a segunda metade gestacional altera a trajetória e crescimento fetal de forma dependente do sexo, em virtude da modificação no potencial de desenvolvimento pós-natal do músculo esquelético e tecido adiposo subcutâneo.

Palavras-chave: Adipogênese. Miogênese. Nutrição materna. Sais de cálcio do óleo de soja. Programação fetal.

ABSTRACT

Maternal nutrition provided by the availability of nutrients in the diet during pregnancy can directly affect the progeny on performance characteristics and meat quality, a mechanism known as fetal programming. Based on this, the objective was to evaluate the effects of calcium salt supplementation of soybean oil in the maternal diet of crossbred Dorper x Santa Inês ewes during the second half of gestation on maternal and offspring gene expression; as well as the meat quality and histological profile of the offspring. At $75 \pm$ days of gestation, 43 multiparous ewes (44.10 ± 6.87 kg BW, 2 ± 1 parturition) hairless (Dorper $\times$ Santa Inês crossbred) pregnant with females ($n = 18$) and males ($n = 25$), were allocated to individual pens and randomly assigned to the following treatments: (1) Control (CON; $n = 21$) – supply of a basal diet formulated to meet the basic nutritional requirements of pregnant ewes with a single lamb, or (2) Supplementation (CSSO; $n = 22$) – basal diet plus supplementation with Ca salts of soybean oil (rumen-protected fat) receiving daily 1.5g/kg of body weight (5% based on DM. Adipose and muscle tissue of the progeny at 15 days of age and at slaughter for the evaluation of myogenic, fibrogenic, adipogenic, and gluconeogenic markers. At slaughter, samples of the Longissimus lumborum muscle were also collected for determination from the hi profile histological and qualitative aspects of meat. There was interaction ($P < 0.05$) for area, perimeter and diameter of the progeny muscle fibers, with favorable responses observed for CSSO females compared to the other treatments. There was a trend of sexual dimorphism on the histological profile of subcutaneous adipose tissue, in which females showed ~24% and 12% higher adipocyte area and perimeter ($P < 0.10$) than males, respectively. However, the fat cell population tended to be ~14% lower ($P = 0.08$) in females. There was an interaction effect on the relative expression of ZFP423 ($P < 0.001$) in female progenies from CSSO mothers at birth and PPAR γ ($P < 0.001$) for samples at slaughter. Furthermore, the myogenesis of CSSO progenies was affected by having higher mRNA expression for MyOG ($P = 0.05$). Progenies from CSSO mothers showed lower expression of the type I fiber marker (MyHC I) and higher PPAR γ ($P = 0.01$). CSSO progenies showed greater subcutaneous fat thickness (EGS, $P = 0.04$), maximum fat thickness over Longissimus lumborum (measured GR; $P = 0.05$) and total losses (cooking and thawing; $P = 0.04$) that CON Consistent with these responses, higher mean values of visceral fat deposition and carcass coverage ($P < 0.001$) were observed in females, in addition to higher EGS and carcass GR measure ($P = 0.02$). Therefore, maternal nutrition with calcium salts from soybean oil during the second half of pregnancy alters fetal growth and trajectory in a sex-dependent manner, due to the modification in the potential for postnatal development of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue.

Keywords: Adipogenesis. Myogenesis. Maternal nutrition. Ca salts of soybean oil. Fetal programming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Metabolismo hepático materno de ovelhas gestantes em hepatócitos.	17
Figura 2. Linha de desenvolvimento fetal do músculo esquelético e tecido adiposo de cordeiros durante o período de gestação de ovelhas.	19
Figura 3. Principais etapas da miogênese e adipogênese..	21
Figura 4. Fatores de transcrição que regulam a adipogênese..	24
Figura 5. Influência da nutrição materna sobre o perfil histológico do músculo <i>longissimus lumborum</i> e gordura de cobertura da região lombar de progênie terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas. As imagens representativas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e observadas em microscópio óptico com ampliação de 20x. ...	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes da dieta e composição química (% MS) dos tratamentos experimentais fornecidos a ovelhas prenhes durante a gestação e progêniez durante a terminação em confinamento.	43
Tabela 2. Conjuntos de primers usados para quantificar a expressão de mRNA de genes no tecido hepático materno usando PCR quantitativo em tempo real.	47
Tabela 3. Parâmetros histomorfométricos do tecido muscular esquelético e tecido adiposo subcutâneo de progêniez terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas suplementas com sais de cálcio a partir da segunda metade da gestação.	50
Tabela 4. Expressão gênica relativa do mRNA (média $\pm$ EPM) da miogênese no tecido muscular esquelético de progêniez com 15 dias de nascimento em função da nutrição materna e sexo da prole.	52
Tabela 5. Expressão gênica relativa do mRNA (média $\pm$ EPM) de genes fibrogênicos, adipogênicos, síntese proteica e tipo de fibra no tecido muscular esquelético; adipogênicos e lipogênicos no adiposo subcutâneo em progêniez ao abate em função da nutrição materna e sexo da prole.	52
Tabela 6. Deposição de gordura interna da carcaça de progêniez terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas suplementas com sais de cálcio a partir da segunda metade da gestação.	53
Tabela 7. Características de qualidade da carne de progêniez terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas suplementas com sais de cálcio a partir da segunda metade da gestação.	54

LISTA DE ABREVIações

CON	Dieta controle
CSSO	Ca salts of soybean oil
MS	Matéria Seca
PB	Proteína Bruta
PDR	Proteína degradável no rúmen
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
PM	Proteína metabolizável
NDT	Nutrientes digestíveis totais
FDNcp	Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína
EE	Extrato etéreo
Ca:P	Relação cálcio e fósforo
ACACA	Acetyl-coa carboxylase alpha
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
GLUT4	Glucose transporter type 4
FATP1	Fatty acid transport protein 1
CPT2	Carnitine palmitoyl transferase 2
FASN	Fatty acid synthase
ZFP423	Zinc finger protein 423
TGF β -1	Transforming growth factor beta
PAX7	Paired box 7
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
COL3A1	Collagen type III, alpha 1
MyHC I	Myosin heavy chain type I
MyHC IIa	Myosin heavy chain type IIa
MyHC IIx	Myosin heavy chain type IIx
NF-kB	Nuclear factor kappa B
WNT10B	Wnt family member 10b
MyoD1	Myogenic differentiation 1
MyoG	Myogenin
ACTB	Beta-actin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PVF	Peso vivo final
PCQ	Peso de carcaça quente
PCF	Peso de carcaça fria
GI	Gordura interna
GIC	Gordura interna carcaça
GI_PVF	Gordura interna com base no peso vivo final
pH	Potencial hidrogeniônico
EGS	Espessura de gordura subcutânea
GR	Espessura de gordura máxima
PD	Perda por descongelamento
Fc	Força de cisalhamento
L	Luminosidade

a*	Intensidade de vermelho
b*	Intensidade de amarelo

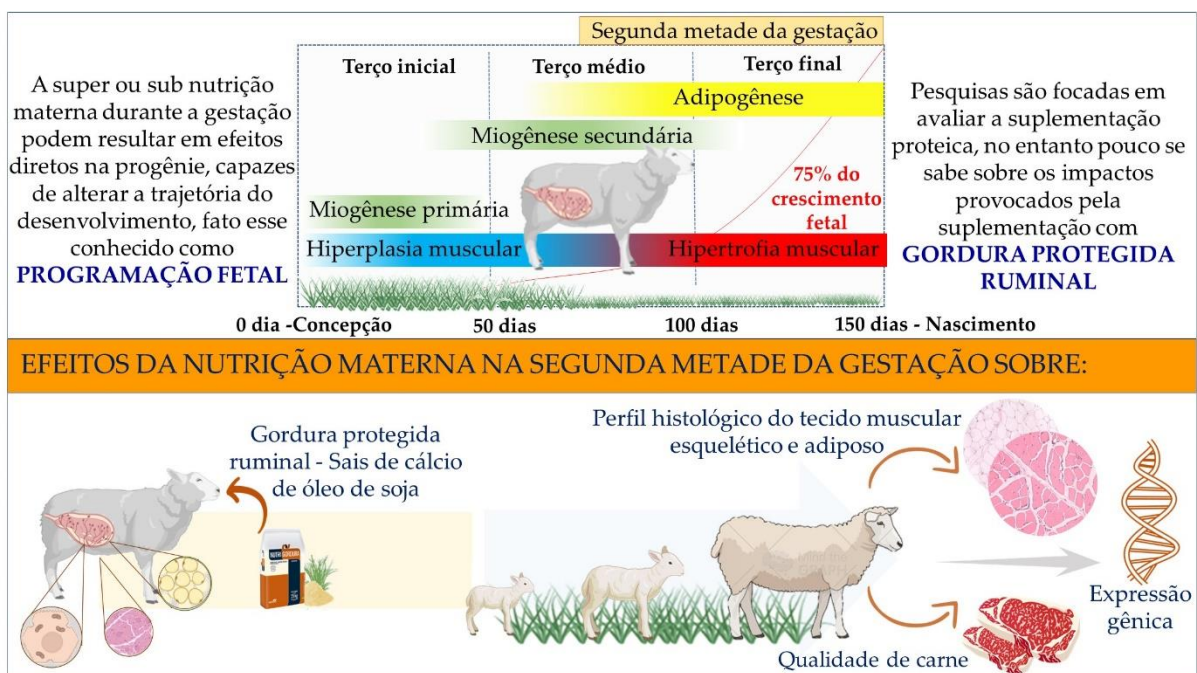
RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

SUPLEMENTAÇÃO COM GORDURA PROTEGIDA DURANTE A SEGUNDA METADE DA GESTAÇÃO EM OVELHAS SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA, PERFIL HISTOLÓGICO E QUALIDADE DE CARNE DA PROGÊNIE

Criado por **Andrey de Sousa Miranda** e orientado por **Kaliandra Souza Alves**

Durante a gestação, alterações na trajetória de desenvolvimento do músculo esquelético e adipócitos da progênie podem levar a impactos a longo prazo por meio de mecanismos conhecido como programação fetal. Em estudos, várias pesquisas são focadas em avaliar a suplementação proteica, no entanto pouco se sabe sobre os impactos provocados pela suplementação com gordura protegida ruminal e sua repercussão na prole a longo prazo. Desse modo, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da suplementação com óleo de soja protegido com sais de cálcio na dieta materna de ovelhas mestiças Dorper × Santa Inês durante a segunda metade da gestação na expressão gênica, perfil histológico e qualidade de carne da prole. Na metade da gestação, ovelhas receberam os seguintes tratamentos: (1) Controle (CON) – fornecimento de dieta basal formulada para atender as exigências nutricionais básicas de ovelhas gestantes de único cordeiro, ou (2) Suplementação com gordura protegida (CSSO) – dieta basal acrescida de suplementação com óleo de soja protegida com sais de cálcio recebendo diariamente 1,5g por kg do peso corporal. Avaliando os resultados, houve interação para área, perímetro e diâmetro das fibras musculares da progênie, com respostas favoráveis observadas para fêmeas CSSO em comparação aos demais tratamentos. Em nível molecular essa mesma resposta foi observada sobre a expressão relativa de mRNA do *ZFP423* aos 15 dias de idade. Ao abate, o mesmo grupo também demonstrou maior expressão do *PPAR γ* . Progênies CSSO apresentaram menor expressão do *MyHC I* e maior do *PPAR γ* , e maior espessura de gordura subcutânea, espessura máxima de gordura sobre o *Longissimus lumborum* e perdas totais (cocção e descongelamento) que CON. Em aplicações práticas, a nutrição materna com sais de cálcio do óleo de soja durante a segunda metade gestacional altera a trajetória e crescimento fetal de forma dependente do sexo, em virtude da modificação no potencial de desenvolvimento pós-natal do músculo esquelético e tecido adiposo subcutâneo.

Figura 1. Linha de desenvolvimento fetal e efeitos da nutrição materna sobre a progênie.



SUMÁRIO

PRIMEIRO CAPÍTULO	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Efeito do uso da gordura protegida sobre o desenvolvimento fetal	15
2.2 Metabolismo energético hepático	16
2.3 Nutrição materna e programação fetal.....	18
2.3.1 Desenvolvimento muscular esquelético.....	20
2.3.2 Desenvolvimento do tecido adiposo e metabolismo lipídico	22
2.4 Efeitos epigenéticos na programação fetal	25
2.5 Efeito da nutrição materna sobre o perfil histológico e qualidade de carne da prole 27	
3 REFERÊNCIAS.....	28
SEGUNDO CAPÍTULO - ARTIGO.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
4 RESULTADOS	50
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO.....	57
7 REFERÊNCIAS.....	58

PRIMEIRO CAPÍTULO

1 INTRODUÇÃO GERAL

Estímulos ambientais durante a gestação podem resultar em efeitos diretos na progênie, afetando a modulação de genes, características de desempenho e qualidade da carne da prole (RESENDE *et al.*, 2018; RAMÍREZ *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2022). Os fatores extrínsecos capazes de alterar o desenvolvimento fetal em função do ambiente uterino, é conhecido como programação fetal ou desenvolvimento programado, que se refere a modificações no desenvolvimento fetal ou formação do neonato que acontece em atribuição do ambiente materno, estendendo-se ao longo da vida da progênie (DU *et al.*, 2010).

Várias pesquisas brasileiras focadas em ruminantes concentraram esforços em avaliar os efeitos da suplementação proteica na gestação sobre a progênie (GIONBELLI *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2020; COSTA *et al.* 2021). No entanto, pouco se sabe sobre os impactos provocados a longo prazo na progênie em consequência da suplementação lipídica para ovelhas gestantes. O fornecimento de lipídeos na dieta de ruminantes tem sido bastante utilizado para o aumento da densidade energética, por apresentarem 2,25 vezes mais energia quando comparado aos carboidratos (SILVA *et al.*, 2007a). Contudo, altos níveis de lipídeos na alimentação podem ocasionar redução na ingestão de matéria seca (MS) e toxicidade aos microrganismos presentes no rúmen, promovendo diminuição na disponibilidade de energia (HUANG *et al.*, 2009). Devido a esses efeitos da inclusão de lipídeos sobre o consumo de matéria seca e variações toxicológicas da microbiota ruminal, a utilização de sais de cálcio na forma de gordura protegida apresenta-se com uma alternativa para contornar esses efeitos deletérios sobre a microbiota ruminal (MARQUES *et al.*, 2017).

O fornecimento de ácidos graxos, principalmente poli-insaturados (PUFAs) na dieta regulam a expressão de genes (NICKLES *et al.*, 2019; RAMÍREZ-ZAMUDIO *et al.* 2022) que podem afetar o desenvolvimento muscular (BRANDÃO *et al.*, 2020), saúde (VELÁZQUEZ *et al.*, 2021), características e qualidade da carne da prole. Essas mudanças podem ser ainda mais sensíveis quando a matriz é criada em condições extensivas de pastagens, onde a estação de monta ocorre principalmente em épocas de dias curtos (baixa luminosidade) e a segunda metade gestacional em períodos de estiagem (SIMPLÍCIO, 2008). A baixa qualidade das forragens limitada sazonalidade ambiental que coincide quando matrizes estão no meio e final da gestação, são ponto crítico para o desenvolvimento muscular e adiposo fetal (DU *et al.*, 2015).

Sendo assim, hipótese do presente estudo é que a suplementação materna com sais de cálcio do óleo de soja durante o meio-gestação possa alterar a transcrição de genes associados

ao transporte e metabolismo de ácidos graxos materno e modular a expressão de genes miogênicos, adipogênicos e lipogênicos, maior desenvolvimento das fibras do músculo esquelético e células adipócitas, bem como aumento de características desejáveis relacionadas a qualidade de carne da prole. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de sais de cálcio de óleo de soja na dieta materna de ovelhas mestiças Dorper × Santa Inês durante a segunda metade gestacional na expressão gênica materna e da prole; bem como o perfil histológico e qualidade de carne da prole.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Efeito do uso da gordura protegida sobre o desenvolvimento fetal

A utilização de lipídeos na forma de gordura protegida, tem como enfoque principal proteger as estruturas de ácidos graxos do processo de biohidrogenação (adição de moléculas de hidrogênio na cadeia carbônica de compostos insaturados para promover a sua saturação. Esse processo resulta na formação de inúmeros intermediários e tem como principal produto final, o ácido esteárico (BUCCIONI *et al.*, 2012). A estratégia do emprego de gordura protegida como sais de Ca de ácidos graxos, tem como desígnio aumentar o fluxo de ácidos graxos insaturados provenientes da dieta para o intestino, digestibilidade e disponibilidade para absorção e deposição nos componentes teciduais e leite (CARNEIRO *et al.*, 2001).

O fornecimento de lipídeos na dieta de ruminantes tem sido bastante utilizado para o aumento de energia, por apresentarem teor energético 2,25 vezes mais quando comparado aos carboidratos (SILVA *et al.*, 2007a). No entanto, altos níveis de lipídeos na alimentação podem ocasionar redução na ingestão de matéria seca (MS), promovendo diminuição na disponibilidade de energia (HUANG *et al.*, 2009). Nesse sentido, a inclusão do conteúdo lipídico recomendada é de até 7% com base na MS da dieta (NRC, 2007) com a finalidade de não prejudicar o desempenho do animal. Valores superiores a este podem dificultar a degradação do material fibroso, em função do recobrimento das partículas do alimento que impossibilitaria a colonização pelas bactérias ruminais, especialmente as celulolíticas (EASTRIDGE, 2014).

Além do mais, certos ácidos graxos especialmente os poli-insaturados (PUFAs) em dietas para animais ruminantes possui limitações, por apresentarem toxicidade aos microrganismos presentes no rúmen, sendo as bactérias Gram (+), metanogênicas e protozoários mais susceptíveis. O potencial toxicológico está diretamente relacionado com a natureza anfifílica da molécula de ácido graxo, ou seja, aquelas que possuem regiões hidrofílicas (solúvel em água) e hidrofóbicas (insolúvel em água) na mesma estrutura. Assim,

os ácidos que possuem maior solubilidade em água de membranas celulares apresentam maior toxicidade, por apresentarem capacidade de romper estruturas da membrana (BERCHIELLI *et al.*, 2011). Devido a esses efeitos da inclusão de lipídeos sobre o consumo de matéria seca causada pela redução da degradabilidade da partícula fibrosa e variações toxicológicas da microbiota ruminal, a utilização de gordura protegida com sais de cálcio pode ser uma alternativa para contornar esses efeitos emblemáticos (MARQUES *et al.*, 2017).

O fornecimento de lipídeos protegidos (sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa) na dieta de ruminantes, apresenta uma forma relativamente inerte a ações dos microrganismos ruminais e apresenta ação de dissociação em condições de pH encontrado no abomaso, além do mais exprime elevada densidade energética e não prejudica a utilização da fibra da dieta (NEUMANN *et al.*, 2015). Em analogia às fontes lipídicas, a inclusão de gordura protegida na dieta de animais gestantes geralmente promove resultados superiores sobre o desempenho e características da cracaça da prole (MARQUES *et al.*, 2017). Avaliando a suplementação de ovelhas gestantes com 3% de ácidos graxos poli-insaturados, Kitessa *et al.* (2001) observou diminuição no consumo de matéria seca. Esse achado na literatura, principalmente ao que se refere aos resultados de consumo de matéria seca, podem estar relacionados a composição físico-química da fonte de ácidos graxos e doses elevadas utilizadas (ALLEN, 2000).

Adicionalmente, ovelhas suplementadas durante o final da gestação com quantidades crescentes de sais de cálcio enriquecidos com eicosapentaenoico (EPA) e docosa-hexaenoico (DHA), proporcionou alteração na abundância de mRNA do tecido adiposo subcutâneo de genes associados ao metabolismo lipídico (NICKLES *et al.*, 2019). Em mais estudos, o suprimento de ácidos graxos na forma de gordura protegida durante a gestação tardia em ovelhas modificou o crescimento, sensibilidade à insulina e peso de carcaça quente em cordeiros (VELÁZQUEZ *et al.*, 2021). Machos provenientes de ovelhas que receberam suplementação com ácidos graxos em gestação tardia, apresentaram maior peso corporal e aumento na concentração plasmática de grelina, associado a ingestão de matéria seca. Denotando assim, efeitos de programação no crescimento e fisiologia da prole (BRANDÃO *et al.*, 2020).

2.2 Metabolismo energético hepático

Em animais ruminantes, a glicose é a principal fonte de energia para os tecidos periféricos do animal. A principal via de fornecimento de glicose para os tecidos periféricos é a gliconeogênese hepática a partir de precursores gliconeogênicos como: acetato, propionato, lactato, glicerol e entre outros (DANFAER *et al.*, 1994). Sendo o propionato o principal

precursor de glicose no fígado em animais ruminantes, responsável por cerca de 90% da glicose total absorvida.

As principais enzimas envolvidas na gliconeogênese são a piruvato carboxilase (PC) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK). Para gerar glicose, o piruvato formado seja pela glicólise ou pela rota do propionato, adentra a mitocôndria dos hepatócitos onde é convertido em oxalacetato pela enzima piruvato carboxilase. Como a membrana mitocondrial não possui transportadores específicos para o oxalacetato, o mesmo precisa ser reduzido a malato pela enzima malato desidrogenase mitocondrial com o consumo de NADH, para assim então ser transportado para fora da mitocôndria e no citosol ser reoxidado em oxalacetato, e finalmente ser convertido em fosfoenolpiruvato. O fosfoenolpiruvato formado a partir do piruvato desencadeia uma série de reações reversíveis que utilizam enzimas diferentes à rota da glicólise, como 1,6-difosfato em frutose-6-fosfato e frutose 1,6-bifosfatase para formação de glicose (**Figura 1**). Além do mais, regulação hormonal como níveis elevados de glucagon estimula a síntese *de novo* de glicose através da gliconeogênese no fígado e inibe a glicólise. Por outro lado, a insulina atua em efeito oposto ao suprimir a produção hepática de glicose inibindo os genes gliconeogênicos através da fosforilação da AKT (proteína quinase) durante a alimentação (KIM *et al.*, 2012).

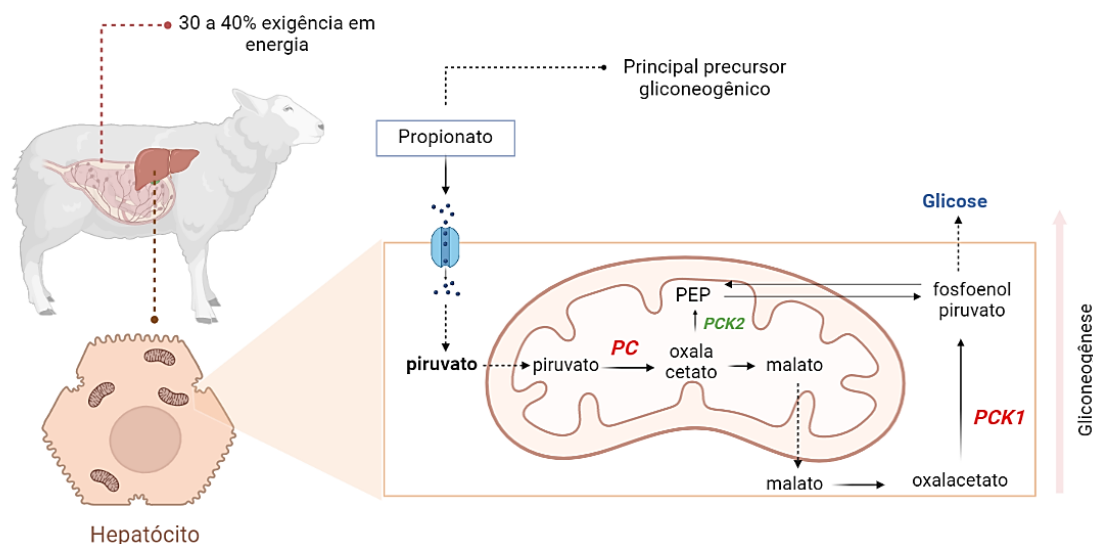


Figura 1. Metabolismo hepático materno de ovelhas gestantes em hepatócitos.

O crescimento fetal e placentário, promovem adaptações maternas ao demandarem quantidades significativas de substratos (tais como glicose e aminoácidos), especialmente na gestação tardia. Durante o final da gestação, ~30 a 40% de exigência em energia fetal é suprida por glicose e lactato, 5 a 10% fornecida pelo acetato, enquanto que 50% proveniente do uso de

aminoácidos (Bell et al., 2005; Lopes et al., 2020). À medida que a gestação avança, a gliconeogênese hepática aumenta para atender as exigências fetais, em caso onde há mobilização de reservas corporais da fêmea gestante ocorre alteração do metabolismo lipídico. A capacidade placentária materno-fetal de transportar ácidos graxos não esterificados é limitada, negando assim acesso de substratos ao feto derivados da mobilização de gordura materna (Bell, 1993). Em suma disso, os ácidos graxos não esterificados são utilizados majoritariamente pelos tecidos maternos como forma de economizar glicose e aminoácidos para o feto (Bell, 1993).

2.3 Nutrição materna e programação fetal

A nutrição materna tem sido alvo de inúmeras pesquisas (RODRIGUES et al., 2020; CRUZ et al., 2019; COSTA et al., 2021; GIONBELLI et al., 2018), e vem apresentando resultados promissores quanto a saúde da matriz e desenvolvimento do cordeiro pré e pós natal, isso porque ela produz alterações metabólicas e endócrinas que causam efeitos de programação fetal (FORD *et al.*, 2007). Grande parte dessas pesquisas têm enfoque no efeito da disponibilização e/ou restrição dos níveis energéticos e proteicos das dietas, devido ao maior requerimento desses nutrientes durante o período gestacional (COSTA et al., 2022; PARADIS et al., 2017).

O manejo adequado da nutrição materna pode apresentar vantagens no desempenho da progênie, visto que durante a fase fetal há uma presença elevada de células multipotentes capazes de se diferenciar em células do tecido muscular e adiposo, o que influenciará no desempenho e qualidade de carne ao longo de sua fase adulta (RESENDE *et al.*, 2018). Em relação a esse acontecimento dá-se o nome de desenvolvimento programado ou programação fetal, que se refere a modificações no ambiente intrauterino por meio de fatores externos como a dieta materna (DU *et al.*, 2010). Em ovelhas, aproximadamente 70% do crescimento fetal ocorre durante as seis últimas semanas da gestação (100 a 150 dias) (RUSSEL 1985). Portanto, com isso torna-se importante iniciar nesta fase estratégias de manejo nutricional que sejam capazes de possibilitar o aporte adequado de nutrientes às ovelhas. Durante a segunda metade da gestação, ainda ocorre o processo da miogênese secundária que tem maior potencial de crescimento comparado a miogênese primária que acontece no início da gestação. Ainda durante o processo de formação das fibras secundárias, ocorre a hiperplasia dos adipócitos (adipogênese) que repercute ainda no crescimento pós-natal (**Figura 2**). Quando a miogênese secundária finaliza, por meio de complexos metabólicos e vias de sinalização, se inicia o

aumento em tamanho das fibras musculares progredindo durante a fase final da gestação e após o nascimento (DU et al. 2015; DU et al., 2017).

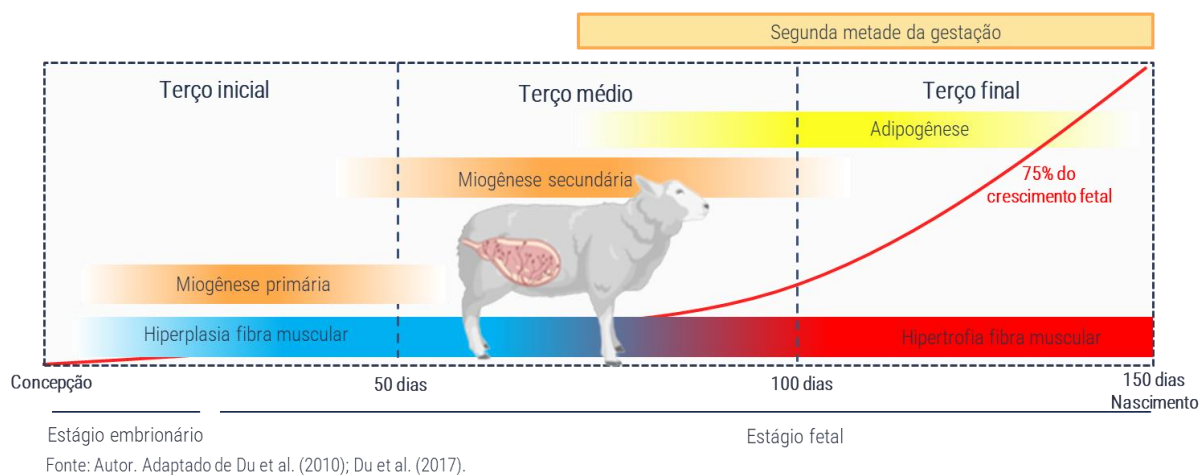


Figura 2. Linha de desenvolvimento fetal do músculo esquelético e tecido adiposo de cordeiros durante o período de gestação de ovelhas.

A manipulação da nutrição materna durante a gestação afeta o principal fator de transcrição para a diferenciação de células mesenquimais por meio da via de sinalização *Wingless and Int* (*WNT*). A ativação *WNT* aumenta o comprometimento e a proliferação de células progenitoras em miogênicas no início e meio da gestação, proporcionando assim maior hiperplasia dos mioblastos. Em contrapartida, a partir da segunda metade da gestação, após a miogênese secundária, a sinalização de *WNT* pode ser inibida para estimular a diferenciação adipogênica de células progenitoras fibro-adipogênicas (DU et al., 2010).

Em épocas de estiagem com baixa disponibilidade e qualidade de forragens, ovelhas alimentadas em sistemas de pastejo, constantemente, apresentam escassez de nutrientes durante sua gestação, especialmente no segundo e último terço (DU et al., 2017). Sendo assim, a restrição nutricional tem efeito negativo sobre o desenvolvimento fetal, apresentando resultados prejudiciais de longo prazo sobre o crescimento da progênie (DU et al., 2013; KNIGHT et al. 2020). Ademais, uma nutrição materna insuficiente reduz a concentração de fatores relacionados ao crescimento como *IGF-1* e *IGF-2* na circulação sanguínea fetal, o que diminui consequentemente a multiplicação de células miogênicas e formação fibras musculares (GONZALEZ et al., 2013). A menor proliferação de células musculares no animal também é uma consequência do fato da nutrição materna afetar a expressão dos MRFs (fatores de regulação miogênica) (YAN et al., 2012).

A nutrição materna adequada tem impactos significativos no desenvolvimento fetal, por fornecer nutrientes necessários à propagação de células miogênicas, e a formação de fibras musculares (ZHU *et al.*, 2006). O maior número de fibras musculares é desejável, por aumentar a porcentagem de carne magra e eficiência no ganho de peso dos animais. Durante o período embrionário, o número de fibras primárias é determinado pela genética e seu aumento em número (hiperplasia) se mantém fixa e realizada até 100º dia de gestação em ovelhas (GREENWOOD *et al.*, 2000).

Entretanto, Rehfeldt *et al.* (2004) relataram que o aumento no tamanho de fibras musculares (hipertrofia) está ligado a diversos fatores após a concepção. Considerando que a hiperplasia não ocorre após o nascimento, o crescimento pós-natal pode ficar limitado, considerando os níveis de restrição materna. Desse modo, estudos demonstram que a melhor forma de proporcionar aumento na produção de carne é a seleção de progênies provenientes de um desenvolvimento programado com maior número e moderado diâmetros de fibras musculares (LEE; JOO; RYU *et al.*, 2010; REHFELDT *et al.*, 2004); e maior número de adipócitos intramusculares, comumente referida como marmoreio que contribui com sabor e maciez para características organolépticas satisfatórias na carne (DU *et al.*, 2017).

2.3.1 Desenvolvimento muscular esquelético

Durante a fase pré-natal, o desenvolvimento do músculo esquelético ocorre por meio da formação das fibras musculares, processo conhecido como miogênese. Após a concepção, no início do estágio embrionário uma fração de células-tronco mesenquimais se diferenciam em células progenitoras que podem dar origem a células musculares, sendo muito abundantes no músculo esquelético durante os estágios fetal e neonatal, contudo diminuem conforme os animais envelhecem (DU *et al.* 2010). Células progenitoras miogênicas derivadas de uma estrutura embrionária transitória (dermomiótomo) originam mioblastos mononucleados, que por sua vez formam o miótomo primário, caracterizando assim a formação do músculo inicial. A partir desse tecido primitivo, a formação do tecido muscular se repercute em etapas sucessivas, distintas, sempre sobrepostas, envolvendo diferentes tipos de mioblastos que resultam na formação de mioblastos embrionários, fetais e células satélites (BONNET *et al.*, 2010).

Na miogênese primária durante o estágio inicial, os mioblastos embrionários se fundem dando origem aos miotubos primários, que por sua vez, originam as miofibras primárias. Após formadas as miofibras primárias, ocorre a indução de uma segunda e nova onda proliferativa, dos mioblastos fetais, eventualmente relacionada a secreção de fatores mitógenos (FGF, fator

de crescimento de fibroblastos) (BONNET et al., 2010), utilizando as fibras primárias como molde para formação de fibras musculares secundárias (GREENWOOD *et al.*, 2000). Com isso originam-se as miofibras secundárias, as quais representam maior proporção de fibras em animais adultos (GREENWOOD *et al.*, 2000). Além do mais, o processo de diferenciação de mioblastos fetais em miofibras secundárias pode estar associado aos baixos níveis de *TGF- β* e *BMP* (BIRESSI *et al.*, 2007). Por fim, os mioblastos que não seguem a via de diferenciação, permanecem quiescentes, sendo inibidos à diferenciação por ação de fatores de crescimento (*TGF- β* , fator de crescimento transformador β e, *BMP*, proteína morfogenética óssea) (DU et al. 2010 a; CUSELLA-DE ANGELIS *et al.*, 1994) (**Figura 3**).

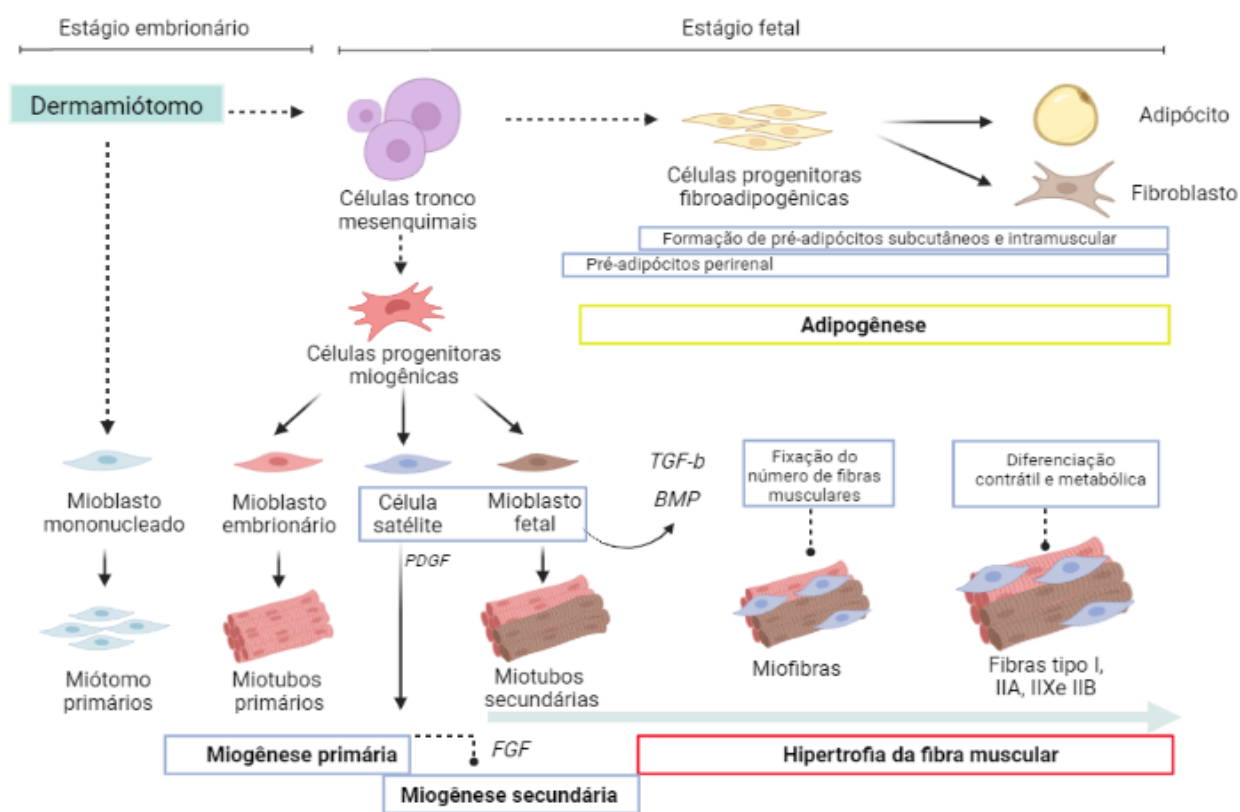


Figura 3. Principais etapas da miogênese e adipogênese. Fonte: Autor. Adaptado de Bonnet et al. (2010); Du et al. (2010); Du et al. (2013); Ramírez-Zamudio et al. (2022).

No desenvolvimento fetal, a massa muscular é determinada pelo número de células (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) das fibras musculares (DU et al., 2010). A hiperplasia é estabelecida quase que exclusivamente no período pré-natal, onde o número de células é determinado ao final da segunda onda miogênica. Ademais, a hipertrofia muscular se inicia no período pré-natal e se estende até o fim da puberdade (COSTA *et al.*, 2021). Durante o percurso da miogênese, as células satélites adjacentes aos mioblastos encontram-se em um estado inativo (quiescência), a qual permanecem indiferenciadas pela ação do *Platelet Derived Growth Factor*

(PDGF) BIRESSI; MOLINARO; COSSU, 2007). Por eventos como lesões, estresse mecânico ou deposição de massa muscular, as células satélites tornam-se biologicamente ativas e migram da região basal para o exterior, onde progridem na proliferação, diferenciação e comprometem parte de sua população na linhagem miogênica. Após a diferenciação, a fusão de células satélites com as fibras musculares contribui para hipertrofia da massa muscular (KUANG *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do músculo esquelético é coordenado por vias de sinalização *Wingless and Int (WNT)* e *Sonic hedgehog (SHH)*, que induzem a expressão de um conjunto de fatores reguladores miogênicos (MRFs) e fatores de transcrição que incluem, *Pax3* e *Pax7*, que desempenham um papel central na coordenação da regulação dos MRFs (MANNEKEN *et al.* 2022). Após a formação do mesoderma, a especificação das células-tronco mesenquimais é regulada pela sinalização do *WNT*, que atua na ativação de genes alvos miogênicos como *MyoD*, *Myf5* e *Mrf4* através da via *Pax3* e *Pax7* (DAUBAS, *et al.* 2013). Posteriormente a especificação, células progenitoras miogênicas que ainda não são células musculares, mas estão compreendidas com essa linhagem, são reguladas por fatores de transcrição miogênicos que incluem *MyoD* e *Myf5*. Células progenitoras quando reguladas positivamente para *Myf5* são altamente específicas para o comprometimento de células mioblásticas esqueléticas, originando assim os mioblastos (LADEIRA *et al.*, 2016). No entanto, quando negativas para este MRF podem originar outros tipos células como os pré-adipócitos, fibroblastos e fibro-adipogênicos (LADEIRA *et al.*, 2016). Após a proliferação, os mioblastos sofrem alterações necessárias para formar uma célula muscular madura, regulada por MRFs secundários como a *miogenina* e *MRF4*. Sendo a *Miogenina* responsável pela diferenciação inicial com formação de miotubos e *MRF4* crucial para a maturação dos miotubos (BONNET *et al.*, 2010).

2.3.2 Desenvolvimento do tecido adiposo e metabolismo lipídico

Assim como as células musculares, os adipócitos são derivados de células tronco pluripotentes, contudo, derivam do mesoderma lateral (DU *et al.*, 2015). Concomitantemente a isso, os adipócitos e os fibroblastos compartilham um *pool* comum de células progenitoras, denominados células progenitoras fibro-adipogênicos (FAPs), devido a sua dupla capacidade de se diferenciar (DU *et al.* 2015). Em ruminantes a adipogênese se inicia próximo a metade da gestação, simultaneamente a miogênese secundária (DU *et al.*, 2010). Em oposição a miogênese, a adipogênese se intensifica no terço final da gestação e seu potencial de hiperplasia

não se limita ao estágio pré-natal, porém este potencial do tecido adiposo diminui ao longo do desenvolvimento pós-natal do animal (DU *et al.*, 2013).

Além de ser um local de armazenamento de energia, o tecido adiposo atua como um órgão endócrino capaz de secretar adipocinas, pelo qual regulam o equilíbrio energético de toda massa corporal (MACDOUGALD e MANDRUP, 2002; AVRAM *et al.*, 2007). Em mamíferos, o tecido adiposo é classificado em depósitos de gordura subcutânea, intra-abdominal e intramuscular (DENG *et al.*, 2020), e a formação desses diferentes depósitos de gordura acontece em distintos pontos de estágios da gestação (DU *et al.*, 2013). Os adipócitos viscerais são formados no terço médio da gestação, seguidos da adipogênese subcutânea que ocorre na segunda metade gestacional para o final da gestação. Na espécie ovina, não foi relatado até o presente momento na literatura o período crítico para aumento dos adipócitos intramuscular, conhecido como “janela de marmoreio”. No entanto, para bovinos os adipócitos intramusculares formam-se no final da gestação, continuando seu processo de hiperplasia até cerca de 250 dias de idade (DU *et al.*, 2013). Vale evidenciar que o teor gordura intramuscular é altamente desejável por ser proporcional à qualidade da carne, enquanto a deposição excessiva de gordura subcutânea afeta a produção e a qualidade da carne (WOOD *et al.*, 2008).

O complexo de sinalização *WNT* dependente de β -catenina, tem efeitos regulatórios diferenciais na miogênese e adipogênese (BAGCHI *et al.*, 2020). A ativação da via *WNT*/ β -catenina favorece a diferenciação de células mesenquimais em mioblastos e redução em pré-adipócitos, em virtude à inibição de *PPAR γ* e *C/EBP- α* (Christodoulides *et al.*, 2009). O controle negativo de *PPAR γ* , ocorre devido a capacidade da *WNT* inativar o complexo glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β), a qual é responsável por ativar o *PPAR γ* (DU *et al.*, 2009). Além do mais, a sinalização *SHH* favorece o comprometimento de células mesenquimais à linhagem miogênica e inibi a adipogênese por meio da indução de GATA2 e COUP-TFII que se ligam aos promotores de *PPAR γ* e *C/EBP- α* regulando negativamente sua expressão, respectivamente (DU *et al.*, 2010).

O desenvolvimento do tecido adiposo fetal se inicia com a formação dos capilares sanguíneos entre os espaços mesenquimais (HAUSMAN e DODSON, 2013). Com início de sua formação, a adipogênese pode então ser dividida em dois estágios: determinação e diferenciação (QUEIROZ *et al.*, 2009). No primeiro estágio quando as células pluripotentes perdem a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais, a capacidade proliferativa em forma pré-adipócitos é regulada pela expressão *proteína dedo de zinco 423* (*Zfp 423*) (GUPTA *et al.*, 2010). A expressão do gene *Zfp423* atua na indução do *receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ)*, que comprometem a linhagem

adipocitária de células FAPs em pré-adipócitos, além da capacidade de inibir parcialmente o *transforming growth factor* (*TGF-β*), sendo este responsável pela fibrogênese (HUANG *et al.*, 2012)). Adicionalmente, no estágio de diferenciação o *PPARγ* e *C/EBP-α*, que são dois fatores reguladores centrais do processo adipogênicos que regulam coordenadamente a ativação de ações transcricionais em cascata na conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros ao adquirirem capacidade de acumular gotas lipídicas (QUEIROZ *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2012). Além do mais, a maior expressão do *TGF-β1* pode afetar a adipogênese através da inibição dos principais fatores de regulação (*PPARγ* e *C/EBP-α*) (LOPES *et al.*, 2020) (**Figura 4**).

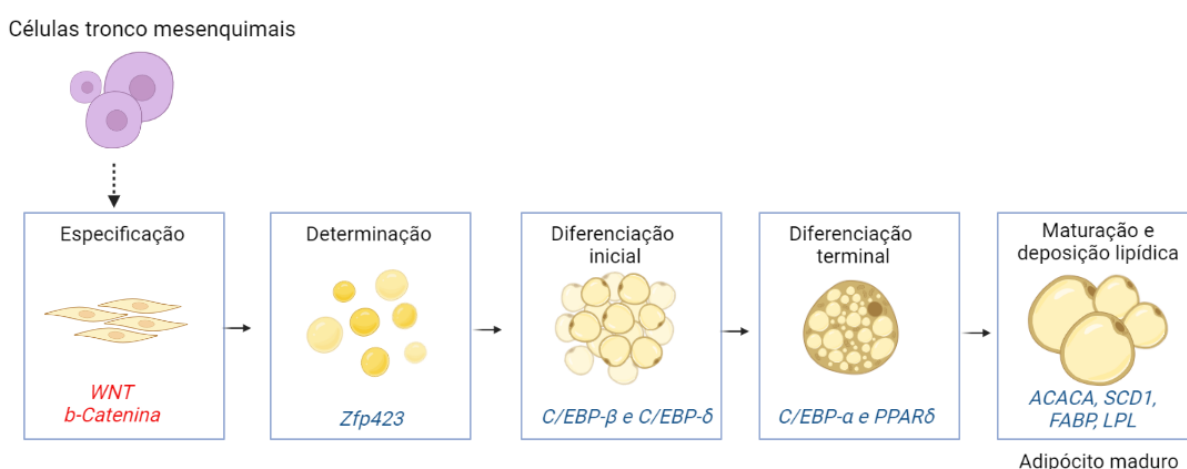


Figura 4. Fatores de transcrição que regulam a adipogênese. Fonte: Autor. Adaptado de Bonnet *et al.* (2010); Du *et al.* (2010); Du *et al.* (2013); Ramírez-Zamudio *et al.* (2022).

Quando formados, os pré-adipócitos sofrem um processo de amadurecimento que compreende a fase de diferenciação, caracterizado pelo enchimento lipídico e mudanças morfológicas em uma forma esférica. A fase de diferenciação dos adipócitos é controlada pelos fatores de regulação transcricional *PPARγ* e a família de proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/*enhancer binding proteins*, C/EBPs). Nesse estágio, os primeiros fatores de transcrição *C/EBP-β* e *C/EBP-δ*, ativam a expressão *C/EBP-α* e *PPARδ*, que de modo análogo regulam a conversão de adipócitos imaturos em maduros por meio da estocagem de lipídeos na forma de triglicerídeos (hipertrofia), através da transcrição de genes alvos anteriormente inativados. Essa ativação inclui enzimas e proteínas relacionadas ao fenótipo do adipócito, envolvidas no transporte de glicose, lipogênese, lipólise, síntese e secreção de adipocinas (QUEIROZ *et al.*, 2009). A hipertrofia dos adipócitos ocorre exclusivamente no período pós-natal, posteriormente a formação das células adipócitas por hiperplasia (DU *et al.*, 2017). À medida que os pré-adipócitos se diferenciam em adipócitos maduros, algumas proteínas

reguladoras da lipogênese são expressas de forma elevada na diferenciação tardia da adipogênese, como *FABP4*, adiponectina, leptina e entre outras.

Após a diferenciação em adipócitos maduros, o preenchimento da gota lipídica com triglicerídeos (TG) é conhecido como lipogênese (LADEIRA *et al.*, 2016). A taxa de armazenamento de TG, e por conseguinte a hipertrofia dos adipócitos depende de equilíbrio e taxas relativas de lipogênese e lipólise (BONNET *et al.*, 2010). A síntese *de novo* é um mecanismo celular pelo qual as células condensam unidades acil para produção de ácidos graxos (AG), que são desviados para armazenamento em gotículas lipídicas como triacilgliceróis (WALLACE *et al.*, 2020). Fatores nutricionais podem afetar a expressão de enzimas que participam do processo da síntese *de novo*, como a acetil-CoA carboxilase (ACC), reação mais importante na síntese *de novo* de ácidos graxos no citosol (LADEIRA *et al.*, 2018). A enzima ACC codificada pelo gene *ACACA*, catalisa a carboxilação da Acetil-CoA formando malonil-CoA, que por sua vez sofre ação da ácido graxo síntase (FAS) para iniciar uma nova cadeia acil ao adicionar acetil-CoA à molécula de malonil-CoA (HEIL *et al.*, 2019). O principal ácido graxo produzido desta série de reações múltiplas é o ácido palmítico (C16:0), após sua síntese ou absorção pelas células adipócitas os ácidos graxos podem sofrer ação da enzima estearoil-CoA dessaturase (*SCD1*), responsável por introduzir dupla ligações no carbono 9, necessários para síntese de TG (LADEIRA *et al.*, 2018).

Ademais, a captação de ácidos graxos é outra maneira de depositar gordura no tecido adiposo, como exemplo, a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) que sofre hidrólise a triglicerídeos pela ação da enzima lipoproteína lipase (*LPL*), localizada na parede dos capilares sanguíneos (BROWN *et al.*, 2003). O transporte de ácidos graxos para o interior da célula é feito por três grupos principais de transportadores: translocase de ácidos graxos (*CD36*), proteína de transporte de ácidos graxos (*FATP*) ou *FABP* em associação com acil-CoA sintase. Quando adentram ao interior do adipócito por meio dos transportadores, os ácidos graxos que estão ligados a *FABP* são transportados da membrana para o sítio de esterificação ou β -oxidação (GERBENS *et al.*, 2004). Quando sofrem ação da lipólise, os acil-CoA livres no citosol são transportados para dentro da mitocôndria através da enzima carnitina palmitoil transferase 1 (*CPT1*), onde a enzima *CPT2* converte a acilcarnitina em acetil CoA de cadeia longa, entrando em seguida na via da β -oxidação (LADEIRA *et al.*, 2018).

2.4 Efeitos epigenéticos na programação fetal

Fatores capazes de afetar o fenótipo da progênie, por meio das interações entre genes e ambiente é conhecido como epigenética (RECIO *et al.*, 2015). O conceito trata-se variações

hereditárias na expressão gênica sem alterar sequências de base do DNA (COSTA *et al.*, 2021). Modificações nas histonas (proteínas que "englobam" o DNA na formação dos cromossomos), mudanças na cromatina por meio da metilação na molécula DNA e microRNAs não codificantes, são mecanismos epigenéticos mais comuns capazes de regular a expressão de genes, mas não o código genético, permitindo assim a herança epigenética intergeracional (GOLDBERG *et al.* 2007).

A metilação do DNA refere-se a inclusão de um grupo metil no terminal 5' dos resíduos de citosina localizados nas ilhas de dinucleotídeos *cytosine-phosphorous-guanine* (CpG) na região promotora do gene. A enzima DNA *metiltransferase* (DNMT) catalisa a transferência de um grupo metil do doador *S-adenosylmethionine* (SAM) às ilhas CpG, essa condição inibe a ligação dos fatores de transcrição e consequentemente, diminuição ou inibição da transcrição gênica (ELOLIMY *et al.*, 2019). Além do mais, proteínas denominadas de MBPs (*Methyl Binding Proteins*) com afinidade pelo grupo metil, ligam-se as regiões promotoras da CpG e impedem a ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios específicos (ATTWOOD *et al.*, 2002). Explorando os mecanismos responsáveis pela expressão diferencial de *Zfp423* e *TGF- β* entre células com alto e baixo potencial adipogênico, Huang *et al.* (2012) observaram locais ricos em CpG no promotor dos genes, indicando provável ação da metilação do DNA sobre a regulação da expressão de *Zfp423* e *TGF- β* e, portanto, o comprometimento precoce da adipogênese.

As histonas são proteínas responsáveis por enrolar o DNA genômico, formando assim a cromatina. As histonas são formadas por quatro tipos principais (H2A, H2B, H3, H4), densamente compactadas com suas caudas N-terminais não estruturadas, que podem sofrer modificações por enzimas levando a acetilação, metilação, fosforilação (KOUZARIDES, 2007), dentre outras. A combinação de diferentes modificações pós-traducionais em uma determinada histona pode ser chamado de código de histona. Dependendo do código, a transcrição ou silenciamento gênico são ativados. Em dietas obesogênicas para fêmeas de camundongos, a metilação repressiva da histona H3K27me3 (marcador associado ao silenciamento gênico) foi menor no promotor *Zfp423* do tecido fetal que associada a diminuição da metilação do DNA, aumentou a expressão do gene *Zfp423* relacionado a diferenciação adipogênica precoce em células progenitoras fetais (YANG *et al.*, 2013). Quando a estrutura da cromatina é afetada, assumem um estado de hetero cromatina associado a compactação ou eucromatina associado a relaxamento. Enquanto o marcador H3K27me3 resulta em uma heterocromatina condensada e consequentemente, o silenciamento gênico, os marcadores H3K4me e H3K9me resultam em uma eucromatina descompactada, facilitando os fatores de

transcrição se ligarem e ativarem a expressão gênica (COSTA *et al.*, 2021). Dietas de baixa proteína durante a gestação, promoveram enriquecimento significativo de dois marcadores (H3K9Ac e H3K4me3) na região promotora da miostatina, promovendo aumento de sua expressão e consequentemente, redução da massa e fibra muscular (JIA *et al.*, 2016).

Ademais, outro mecanismo epigenético refere-se aos microRNAs (miRNAs) que são fita simples de RNA com 21 a 23 moléculas não codificantes de nucleotídeos, que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional (JIN *et al.*, 2010). O mecanismo inibitório dos miRNAs está relacionado ao pareamento de bases com o mRNA alvo, que podem acionar diferentes tipos de repressão. Quando o pareamento é parcial, os miRNAs inibem a tradução e consequentemente, a síntese proteica, enquanto a complementação é completa promovem a degradação do RNA alvo (COSTA *et al.*, 2021). Em dietas obesogênicas durante a gestação de ovelhas foi reportada uma diminuição da expressão do miRNA let-7g no músculo fetal, que contribuem para aumentar a expressão de marcadores adipogênicos e número de adipócitos (YAN *et al.*, 2013). Na diferenciação de adipócitos, o miR-124-3p inibiu a diferenciação adipogênica de frações vasculares estromais isoladas de gordura subcutânea de ovelhas através da redução significativa de C/EBP α (PAN *et al.*, 2018). Além disso, segundo Kennell *et al.* (2008) a família miR-200 promove a adipogênese por meio da inibição da sinalização *WNT*, que se apresenta como um regulador negativo da adipogênese. Enquanto, a miR-199a-3p inibe o acúmulo de lipídeos em células 3T3-L1 (TAN *et al.*, 2017).

O efeito da dieta materna sobre o a regulação epigenética, se confere sobre a interação entre genes e sítios de ligação que ocorre devido a estímulo dietético durante a fase de desenvolvimento fetal. Os mecanismos epigenéticos podem ser influenciados pela variação que o ambiente uterino é submetido, como a deficiência ou supernutrição de nutrientes na dieta materna que causam modificações no epigenoma fetal, sendo a embriogênese, gestação e puberdade os principais pontos chaves para essas mudanças (NEIBERGS; JOHNSON, 2012).

2.5 Efeito da nutrição materna sobre o perfil histológico e qualidade de carne da prole

A nutrição materna durante a gestação pode apresentar impactos permanente no crescimento e desenvolvimento pós-natal da prole, principalmente no desenvolvimento de fibras musculares e deposição de adipócitos (DU e ZU, 2009). Estratégias nutricionais durante o período gestacional têm proporcionado resultados variados, podendo ser promissor quando avaliados o desempenho e características da carcaça da progênie (SHAO *et al.*, 2021). A

desnutrição durante a gestação pode afetar o número de fibras musculares esqueléticas, especialmente as fibras musculares tipo II (SEN *et al.*, 2016). O crescimento pós-natal do tecido muscular depende do número e diâmetro das fibras musculares ao nascimento, que podem ser influenciados pela nutrição da mães durante a gestação. Ao desmame as fibras musculares apresentam acentuado grau de hipertrofia (aumento em tamanho) em relação ao nascimento (MEXIA *et al.*, 2006). Parâmetros como as características das fibras musculares devem ser levadas em consideração, visto que diferenças em sua composição podem influenciar a produção e qualidade de carne (SIRIN *et al.*, 2017).

A qualidade de carcaça é definida por diversos componentes corporais do animal. Dentre os componentes, o tecido muscular representa a maior importância econômica, seguida da gordura, que está diretamente relacionada com aspectos qualitativos (FERNANDEZ *et al.*, 2008). Os principais parâmetros de qualidade são: pH, cor, capacidade de retenção de água na cocção, maciez e composição química (principalmente a quantidade dos componentes gordurosos) (PINHEIRO *et al.*, 2009). Avaliando o nível de restrição proteica durante o meio e final da gestação, Maresca *et al.* (2019) observaram maior área do *longissimus* em novilhos na terminação provenientes de vacas alimentadas com maior quantidade de proteína na gestação. Adicionalmente, neste estudo foi observado que o diâmetro das fibras musculares era semelhante entre os tratamentos, sugerindo que o aumento da área do *longissimus* pode ser devido a hiperplasia muscular. Prole de vacas alimentadas com alto plano nutricional no final da gestação, apresentaram aumento na espessura de gordura subcutânea entre a 12^o costela que está associado ao elevado número de adipócitos (RAMÍREZ *et al.* 2020). Denotando assim, impacto da nutrição materna na composição da carcaça e qualidade da carne.

Pesquisas conduzidas com ovelhas gestantes, observaram que nutrientes e componentes dietéticos como a utilização de ácidos graxos poli-insaturados, são capazes de afetar a atividade de ações enzimáticas ligadas na metilação e modificações de histonas (NICKLES *et al.*, 2019; COLEMAN *et al.*, 2018), acarretando mudanças na expressão gênica e mecanismos de diferenciação celular (GIONBELLI *et al.*, 2017; PARADIS *et al.*, 2017).

3 REFERÊNCIAS

ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy. Science*. v. 83, p. 1598–1624, 2000.

ATTWOOD, J. T. *et al.* DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 59, n. 2, p. 241-257, 2002.

AVRAM, M. M. *et al.* Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: From stem cell to fat cell. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 472-492, 2007.

BAGCHI, D. P. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling regulates adipose tissue lipogenesis and adipocyte-specific loss is rigorously defended by neighboring stromal-vascular cells. **Molecular metabolism**, v. 42, p. 101078, 2020.

BARTHEL, A.; SCHMOLL, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 285, n. 4, p. E685-E692, 2003.

BELL, A. W. *et al.* Regulation of macronutrient partitioning between maternal and conceptus tissues in the pregnant ruminant. **Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction**, p. 275-293, 2000.

BERCHIELLI, T. T. *et al.* **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011.

BIRESSI, S. *et al.* Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. **Developmental biology**, 308, n. 2, p. 281-293, 2007.

BONNET, M. *et al.* Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. **Animal: an international journal of animal bioscience**, 4, n. 7, p. 1093, 2010.

BRANDÃO, A. P. *et al.* Supplementing Ca salts of soybean oil to late-gestating beef cows: impacts on performance and physiological responses of the offspring. **Journal of animal science**, v. 98, n. 8, p.247, 2020.

BROWN, J. M. *et al.* Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1287-1300, 2003.

BUCCIONI, A. *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**, v. 174, n. 1-2, p. 1-25, 2012.

BURIN, P. C. Qualidade da gordura ovina: características e fatores de influência. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, v. 17, n. 10, p. 1-28, 2016.

CARNEIRO, M. M. Y. *et al.* Recent Advances in Nutritional Sciences Regulation of Gene Transcription : A the Metabolic Syndrome 1 , 2. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1129–1132, 2001.

CHRISTODOULIDES, C. *et al.* Adipogenesis and WNT signalling. Trends in Endocrinology & Metabolism, 20, n. 1, p. 16-24, 2009.

COLEMAN, D. N. *et al.* Prepartum fatty acid supplementation in sheep. II. Supplementation of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid during late gestation alters the fatty acid profile of plasma, colostrum, milk and adipose tissue, and increases lipogenic gene expression of adipose tissue. **Journal of animal science**, v. 96, n. 3, p. 1181-1204, 2018.

COLEMAN, D. N. *et al.* Prepartum fatty acid supplementation in sheep i. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementation do not modify ewe and lamb metabolic status and performance through weaning. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 1, p. 364–374, 2018.

COSTA, T. C. *et al.* Fetal programming in ruminant animals: understanding the skeletal muscle development to improve meat quality. **Animal Frontiers**, v. 11, n. 6, p. 66-73, 2021.

CUSELLA, A. M. *et al.* Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF beta: a possible regulatory mechanism of skeletal muscle histogenesis. **Development**, 120, n. 4, p. 925-933, 1994.

DANFAER, A. Nutrient metabolism and utilization in the liver. **Livestock Production Science**.v.34.p.115-127, 1994.

DAUBAS, P.; BUCKINGHAM, M. E. Direct molecular regulation of the myogenic determination gene *Myf5* by *Pax3*, with modulation by *Six1/4* factors, is exemplified by the 111 kb-*Myf5* enhancer. **Developmental biology**, v. 376, n. 2, p. 236-244, 2013.

DENG, K. *et al.* miR-27a is an important adipogenesis regulator associated with differential lipid accumulation between intramuscular and subcutaneous adipose tissues of sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 71, p. 106393, 2020.

DETMANN, E. *et al.* Métodos para análise de alimentos - INCT - Ciência Animal. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012.

DU, M. *et al.* Cellular signaling pathways regulating the initial stage of adipogenesis and marbling of skeletal muscle. **Meat science**, v. 86, n. 1, p. 103-109, 2010a.

DU, M. *et al.* Fetal programming in meat production. **Meat Science**. v. 109, p. 40–47, 2015.

DU, M. *et al.* Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. **Journal Animal Science**. v. 88, p. 51–E60, 2010b.

DU, M. *et al.* Meat science and muscle biology symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. **Journal Animal Science**, 2013.

DU, M. *et al.* Optimizing livestock production efficiency through maternal nutritional management and fetal developmental programming. **Animal Frontiers**, v. 7, n. 3, p. 5-11, 2017.

DU, M.; ZHU, M. J. Fetal programming of skeletal muscle development. **Applied muscle biology and meat science**, p. 81-96, 2009.

ELOLIMY, A. *et al.* Cellular mechanisms and epigenetic changes: Role of nutrition in livestock. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 35, n. 2, p. 249-263, 2019.

FERNANDEZ-MORO, D. *et al.* Preovulatory follicle development in goats following oestrous synchronization with progestagens or prostaglandins. **Reproduction in Domestic Animals, Berlin**, v. 43, p. 9–14, 2008.

FERREIRA, E. M. *et al.* Growth, feed intake, carcass characteristics, and meat fatty acid profile of lambs fed soybean oil partially replaced by fish oil blend. **Animal Feed Science and Technology**, v. 187, p. 9-18, 2014.

FIORENTINI, G. *et al.* Effect of lipid sources with different fatty acid profiles on the intake, performance, and methane emissions of feedlot Nellore steers. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 4, p. 1613-1620, 2014.

FORD, S. P. *et al.* Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 5, p. 1285–1294, 2007.

GARCIA, M. *et al.* Effect of supplementing essential fatty acids to pregnant nonlactating Holstein cows and their preweaned calves on calf performance, immune response, and health. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 5045–5064, 2014a.

GARCIA, M. *et al.* Effect of supplementing fat to pregnant nonlactating cows on colostral fatty acid profile and passive immunity of the newborn calf. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 392–405, 2014b.

GERBENS, F. *et al.* Genetic control of intramuscular fat accretion. **Muscle development of livestock animals. Eds te Pas MFW, Everts ME, Haagsman HP**, p. 343-361, 2004.

GIONBELLI, T. R. S. *et al.* Foetal development of skeletal muscle in bovines as a function of maternal nutrition, foetal sex and gestational age. **Journal Animal Physiologi and Animal Nutrition (Berl)**. 1–12, 2017.

GOLDBERG A. D. *et al.* Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 4, p. 635–638, 2007.

GONZALEZ, J. M. *et al.* Vonnahme, A.M. Stelzleni, and S.E. Johnson. Realimentation of nutrient restricted pregnant beef cows supports compensatory fetal muscle growth. **Journal Animal Science**, 2013.

GREENWOOD, P. L. *et al.* Effects of birth weight and post natal nutrition on neonatal sheep. II. Skeletal muscle growth and development. **Journal of Animal Science**, v.78, n.1, p.50-61, 2000.

HAUSMAN, G. J.; DODSON, M. V. Stromal vascular cells and adipogenesis: Cells within, 2013.

HEIL, C. S. *et al.* Fatty acid biosynthesis: chain-length regulation and control. **ChemBioChem**, v. 20, n. 18, p. 2298-2321, 2019.

HUANG, Y. *et al.* Calcium salts of CLA improve availability of dietary CLA. **Livestock Science**, v.122, n.1, p.1-7, 2009.

HUANG, Y. *et al.* Zfp423 promotes adipogenic differentiation of bovine stromal vascular cells. **PloS one**, n. 10, 2012.

JIA, Y. *et al.* Low-protein diet fed to crossbred sows during pregnancy and lactation enhances myostatin gene expression through epigenetic regulation in skeletal muscle of weaning piglets. **European journal of nutrition**, v. 55, n. 3, p. 1307-1314, 2016.

JIN, W. *et al.* Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. **BMC molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2010.

KIM, D. K. *et al.* Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor γ (ERR γ) is key regulator of hepatic gluconeogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 21628-21639, 2012.

KIM, G.-D. et al. Comparison of characteristics of myosin heavy chain-based fiber and meat quality among four bovine skeletal muscles. *Korean journal for food science of animal resources* 36, 819, 2016.

KITESSA, S. M. et al. Utilisation of fish oil in ruminants: I. Fish oil metabolism in sheep. ***Animal Feed Science and Technology***, v. 89, n. 3-4, p. 189-199, 2001.

KNIGHT, M. I. *et al.* Reducing the level of nutrition of twin-bearing ewes during mid to late pregnancy produces leaner prime lambs at slaughter. ***Animal***, v. 14, n. 4, p. 864-872, 2020.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. ***Cell***, n. 128, p. 693-705, 2007.

KUANG, S. *et al.* Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. ***Cell***, v. 129, n. 5, p. 999-1010, 2007.

LADEIRA, M. *et al.* Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. ***International journal of molecular sciences***, 17, n. 6, p. 918, 2016.

LADEIRA, M. *et al.* Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. ***Animal***, 12, n. s2, p. s282-s294, 2018.

LADEIRA, M. M. et al. Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. ***Meat science***, v. 96, n. 1, p. 597-605, 2014.

LEE, S. H.; JOO, S. T.; RYU, Y. C. Skeletal muscle fiber type and myofibrillar proteins in relation to meat quality. ***Meat Science***, v. 86, n. 1, p. 166–170, 2010.

LEHNINGER, A. L. *et al.* The biosynthesis of lipids. In: LEHNINGER, A.L. (Ed). *Principles of biochemistry*. 3. ed. New York: Worth Publishers, p.770-817, 2000.

LOPES, R. C. et al. Impacts of protein supplementation during late gestation of beef cows on maternal skeletal muscle and liver tissues metabolism. ***Animal***, v. 14, n. 9, p. 1867-1875, 2020.

MACDOUGALD, O. A.; MANDRUP, S. Adipogenesis: forces that tip the scales. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 5-11, 2002.

MANCINI, R. A., & Hunt, M. C. Current research in meat color. **Meat Science**, 71, 100–121, 2005.

MANNEKEN, J. D. *et al.* Dynamics of muscle growth and regeneration: Lessons from the teleost. *Experimental cell research*, p. 112991, 2021.

MARESCA, S. *et al.* The influence of protein restriction during mid-to late gestation on beef offspring growth, carcass characteristic and meat quality. **Meat science**, v. 153, p. 103-108, 2019.

MARQUES, R. S. *et al.* Effects of supplementing calcium salts of polyunsaturated fatty acids to late-gestating beef cows on performance and physiological responses of the offspring. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 12, p. 5347–5357, 2017.

MEXIA, A. A. *et al.* Desempenho e características das fibras musculares esqueléticas de cordeiros nascidos de ovelhas que receberam suplementação alimentar em diferentes períodos da gestação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1780-1787, 2006.

NEIBERGS, H. L. *et al.*: Nutrition and the genome 1. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2308–2316, 2012.

NEUMANN, M. *et al.* Desempenho e aspectos quali-quantitativos do leite de vacas Jersey suplementadas com gordura protegida de óleo de palma. **ACSA: Agropecuária Científica no Semiárido**, v.11, p.1-9, 2015.

PAN, Y. *et al.* MiRNA-seq reveals that miR-124-3p inhibits adipogenic differentiation of the stromal vascular fraction in sheep via targeting C/EBP α . **Domestic animal endocrinology**, v. 65, p. 17-23, 2018.

PARADIS, F. *et al.* Maternal nutrient restriction in mid-to-late gestation influences fetal mRNA expression in muscle tissues in beef cattle. *BMC Genomics*. v. 18, p. 632 , 2017.

PEÑAGARICANO, F. *et al.* Maternal nutrition induces gene expression changes in fetal muscle and adipose tissues in sheep. *BMC genomics*, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2014.

QUEIROZ, J. C. F. *et al.* Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 5, p. 582-594, 2009.

RAMÍREZ-ZAMUDIO, Germán D. *et al.* Effect of rumen-protected fat on performance, carcass characteristics and beef quality of the progeny from Nellore cows fed by different planes of nutrition during gestation. *Livestock Science*, v. 258, p. 104851, 2022.

REHFELDT, C. *et al.* Environmental and Genetic Factors as Sources of Variation in 46 Skeletal Muscle Fibre Number. **Basic Appl. Myol.** v. 9, p. 235–253, 2004.

RESENDE, F. D. *et al.* Entendendo o conceito do boi 777. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 256 p. 2018.

REYNOLDS, L. P. *et al.* Developmental programming of fetal growth and development. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 35, n. 2, p. 229-247, 2019.

SEN, U. *et al.* The effect of maternal nutrition level during mid-gestation on postnatal muscle fibre composition and meat quality in lambs. **Animal Production Science**, v. 56, n. 5, p. 834-843, 2015.

SHAO, T. *et al.* Effects of supplements differing in fatty acid profile to late gestational beef cows on cow performance, calf growth performance, and mRNA expression of genes associated with myogenesis and adipogenesis. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

SHINGFIELD, K. J. *et al.* Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, v. 7, n. SUPPL.1, p. 132–162, 2013.

SILVA, D. R. B. *et al.* A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saude Materno Infantil**, v. 7, n. 2, p. 123–133, 2007.

ŞIRIN, E. *et al.* The relationship between muscle fiber characteristics and some meat quality parameters in Turkish native sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 150, p. 46-51, 2017.

TAN, Z. *et al.* miR-199a-3p affects adipocytes differentiation and fatty acid composition through targeting SCD. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 492, n. 1, p. 82-88, 2017.

WALLACE, M.; METALLO, C. M. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *In: Seminars in Cell & Developmental Biology*. **Academic Press**, p. 65-71, 2020.

WOOD, J. D. *et al.* Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat science*, v. 78, n. 4, p. 343-358, 2008.

YAN, Xu *et al.* Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *Journal of genomics*, v. 1, p. 29, 2013.

ZAKRYS, P. I. *et al.* (2008). Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beefmuscle packed under modified atmosphere. **Meat Science**, 79, 648–655, 2008.

ZHU, Mei J. *et al.* Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **The Journal of physiology**, v. 575, n. 1, p. 241-250, 2006.

Bell AW, Burhans WS and Overton TR 2000. Protein nutrition in late pregnancy, maternal protein reserves and lactation performance in dairy cows. *Proceedings of the Nutrition Society* 59, 119–126.

Lopes, R. C., Sampaio, C. B., Trece, A. S., Teixeira, P. D., Gionbelli, T. R. S., Santos, L. R., ... & Gionbelli, M. P. (2020). Impacts of protein supplementation during late gestation of beef cows on maternal skeletal muscle and liver tissues metabolism. *animal*, 14(9), 1867-1875.

Bell, A.W. (1993). Pregnancy and fetal metabolism. In: Forbes, J.M. and France, J. (eds). *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. CAB International, Walling, pp. 405-431.

Yan, et ai. Programação do desenvolvimento do músculo esquelético fetal e desenvolvimento do tecido adiposo. *Journal Genomics* , 1 (2012) , pp . 29-38, 2012.

GUPTA, Rana K. et al. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*, v. 464, n. 7288, p. 619-623, 2010.

GONZÁLEZ-RECIO, Oscar; TORO, Miguel Angel; BACH, Alex. Past, present and future of epigenetics applied to livestock breeding. *Frontiers in genetics*, v. 6, p. 305, 2015.

SEGUNDO CAPÍTULO - ARTIGO

Suplementação com gordura protegida durante a segunda metade da gestação em ovelhas sobre a expressão gênica, perfil histológico e qualidade de carne da progênie

RESUMO

A suplementação materna com sais de cálcio do óleo de soja durante a gestação pode reprogramar a trajetória de desenvolvimento da progênie, mecanismo conhecido como programação fetal. Com base nisto, o objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação de sais de cálcio de óleo de soja na dieta materna de ovelhas mestiças Dorper x Santa Inês durante a segunda metade gestacional na expressão gênica materna e da prole; bem como a qualidade de carne e perfil histológico da prole. Aos $75 \pm$ dias de gestação, 43 ovelhas multíparas ($44,10 \pm 6,87$ kg PC inicial; 2 ± 1 partos) deslanadas (mestiças Dorper x Santa Inês) gestantes de fêmeas ($n = 18$) e machos ($n = 25$), foram alocadas em baias individuais e distribuídas aleatoriamente aos seguintes tratamentos: (1) Controle (CON; $n = 21$) – fornecimento de dieta basal formulada para atender as exigências nutricionais básicas de ovelhas gestantes de único cordeiro, ou (2) Suplementação (CSSO; $n = 22$) – dieta basal acrescida de suplementação com sais de cálcio do óleo de soja (gordura protegida no rúmen) recebendo diariamente 1,5g/ kg do peso corporal (5% baseado na MS. Foram realizadas coletas de tecidos adiposo e muscular da progênie aos 15 dias de idade e ao abate para avaliação de marcadores miogênicos, fibrogênicos, adipogênicos e gliconeogênicos. Ao abate, amostras do músculo *Longissimus lumborum* também foram coletadas para determinação do perfil histológico e aspectos qualitativos da carne. Houve interação ($P < 0,05$) para área, perímetro e diâmetro das fibras musculares da progênie, com respostas favoráveis observadas para fêmeas-CSSO em comparação aos demais tratamentos. Houve tendência de dimorfismo sexual sobre o perfil histológico do tecido adiposo subcutâneo, em que fêmeas demonstraram área e perímetro dos adipócitos $\sim 24\%$ e 12% superior ($P < 0,10$) que machos, respectivamente. Contudo, a população de células adiposas tendeu a ser $\sim 14\%$ inferior ($P = 0,08$) em fêmeas. Houve efeito de interação na expressão relativa do *ZFP423* ($P < 0,001$) em progênies fêmeas provenientes de mães CSSO ao nascimento e *PPAR γ* ($P < 0,001$) para amostras ao abate. Além do mais, a miogênese de progênies CSSO foi afetada por apresentar maior expressão mRNA para *MyOG* ($P = 0,05$). Progênies de mães CSSO apresentaram menor expressão do marcador de fibra tipo I (*MyHC I*) e maior *PPAR γ* ($P = 0,01$). Progênies CSSO apresentaram maior espessura de gordura subcutânea (EGS, $P = 0,04$), espessura máxima de gordura sobre o *Longissimus lumborum* (medida GR; $P = 0,05$) e perdas totais (cocção e descongelamento; $P = 0,04$) que CON. Consistente com essas respostas, maiores valores médios de deposição de gordura visceral e cobertura da carcaça ($P < 0,001$) foram observados em fêmeas, além de maior EGS e medida GR da carcaça ($P = 0,02$). Portanto, a nutrição materna com sais de cálcio do óleo de soja durante a segunda metade gestacional altera a trajetória e crescimento fetal de forma dependente do sexo, em virtude da modificação no potencial de desenvolvimento pós-natal do músculo esquelético e tecido adiposo subcutâneo.

Palavras-chave: Adipogênese. Miogênese. Nutrição materna. Programação fetal.

1 INTRODUÇÃO

Durante a gestação, alterações na trajetória de desenvolvimento do músculo esquelético e adipócitos da progênie podem levar a impactos a longo prazo por meio de mecanismos conhecido como programação fetal (BARKER, 1992; NICKLES et al., 2019). No estágio fetal, o início e meio da gestação são etapas determinantes para o desenvolvimento do tecido muscular esquelético, por meio do aumento em número de células musculares (hiperplasia) que se desenvolvem exclusivamente durante a fase pré-natal. Conjuntamente com o meio da miogênese secundária, a adipogênese é iniciada entre o meio e final da gestação (DU et al., 2010). Estudos anteriores mostraram que o perfil histológico e expressão de genes diferencialmente expressos nos tecidos fetais é afetado pela suplementação materna durante a gestação (GIONBELLI et al., 2018; COSTA et al. 2021).

Em cenários de escassez de fonte energética, que é frequentemente observado em períodos de prenhez durante o meio e final da gestação, a mobilização de reservas corporais maternas ocorre no esforço de suprir as necessidades energética fetal (BELL e EHRHARDT, 2000). Para contornar alterações durante períodos críticos da gestação, estratégias de suplementação com gordura protegida ruminal são frequentemente utilizadas (MARQUEZ et al., 2017). Com escape da degradação ruminal e posterior absorção no intestino, sua utilização como estratégia de tecnologia alimentar aumenta o aporte energético (BROCHINE et al., 2022)

Estudos com suplementação lipídica à base de ω -6 como os sais de cálcio do óleo de soja na forma de gordura protegida ruminal demonstraram alterações no maior desenvolvimento do tecido muscular em progênes de mães que receberam suplementação, adicionalmente atuaram como moduladores na expressão de genes envolvidos na miogênese e metabolismo lipídico durante o desenvolvimento fetal (BRANDÃO et al., 2020). Nesse contexto, fonte de ácidos graxos na dieta podem regular a expressão de genes envolvidos na miogênese e adipogênese (SCHUBACH et al. 2019; SHAO et al., 2021). Esses fatores associados em conjunto, podem levar a um melhor desempenho de crescimento, características da carcaça e parâmetros qualitativos da carne (FIORENTINI et al., 2012; MARQUES et al., 2017; (JIMÉNEZ et al., 2021).

Nesse sentido, foi hipotetizado neste estudo que a suplementação com CSSO a partir da segunda metade da gestação altera o transporte e metabolismo de ácidos graxos maternos e consequentemente, pode modular a expressão de genes miogênicos, adipogênicos e lipogênicos que controlam o desenvolvimento das fibras musculares esqueléticas e adipócitos, melhorando a qualidade das carcaças e da carne da prole. Portanto, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da suplementação com óleo de soja protegido com sais de cálcio na dieta materna de

ovelhas mestiças Dorper × Santa Inês durante a segunda metade da gestação na expressão gênica, perfil histológico e qualidade de carne da prole.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e condições experimentais

O experimento foi realizado no Setor de Pequenos Ruminantes da Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA/Campus Parauapebas, localizado sob as coordenadas Lat. 06° 04' 16,4"S; Long. 049° 49' 8,3"W; Alt: 270 m. O clima é caracterizado como tropical úmido, com pequena amplitude térmica e grande variabilidade de chuva durante o ano. O tipo climático é Aw, segundo classificação de Köppen-Geiger. O experimento foi autorizado pela comissão de ética de uso de animais (CEUA/UFRA, nº 1319290421).

2.2. Manejo e design experimental

2.2.1. Indução do cio e cobertura

Foram utilizadas 64 ovelhas deslanadas (mestiças Dorper × Santa Inês), com peso corporal inicial médio equivalente a $37,43 \text{ kg} \pm 6,34 \text{ kg}$, multíparas (2 ± 1 partos) e não gestantes. As ovelhas foram divididas em quatro grupos de 16 animais para estação de monta. Após a sincronização do cio, utilizando 0,5mL via intramuscular na região vulvar por ovelha com prostaglandina sintética (CIOSIN®, cloprostenol), as ovelhas foram distribuídas em: um dia para indução de cio e quatro dias de observação da estação de monta natural controlada, com intervalo de um dia entre os grupos de ovelhas destinadas a serem cobertas. Em cada grupo de ovelhas, foram utilizados dois machos da raça Dorper na proporção macho:fêmea de 1:8, alternando-se os reprodutores a cada cobertura entre os turnos de manhã e tarde para evitar o descarte durante as coberturas e qualidade espermática. Durante toda a estação de monta as fêmeas não cobertas foram demarcadas e expostas aos reprodutores duas vezes ao dia para a identificação de possível cio natural. Quando cobertas, as ovelhas foram separadas do rebanho submetido a indução de cio para evitar coberturas sucessivas do reprodutor em uma única fêmea.

A confirmação de prenhez das ovelhas cobertas foi realizada com auxílio de ultrassom Pie Medical (modelo Aquila Vet) entre o dia 24 à 26 pós-cobertura, onde 49 ovelhas foram identificadas como prenhas (taxa de prenhez; 75,5%) e a sexagem fetal entre o dia 51 a 58 de prenhez por meio da identificação dos tubérculos genitais (taxa de identificação fetal; 95,3%)

2.2.2. Período gestacional e tratamentos experimentais

A partir da estação de monta até a metade da gestação (dia 74 pós cobertura, considerando-se tempo médio de gestação de 150 dias), as ovelhas gestantes foram mantidas em um único lote em uma área de pastagem composta por Tifton 85, e manejadas sob método de lotação intermitente (10 piquetes; $\sim 3.618 \text{ m}^2$ cada). Para caracterização da composição e disponibilidade do pasto, foram realizadas coletas de pasto a cada 3 dias no momento de entrada e saída do piquete, com um auxílio de quadrado 1m^2 . Durante este período as matrizes receberam $\sim 150 \text{ g/animal/dia}$ de milho moído, além de suplementação mineral *ad libitum* (**Tabela 1**).

Aos 74 dias de gestação 30 ovelhas de parto simples foram transferidas da área de pastagem para um confinamento, dotado de baias individuais ($1,90 \times 1,10$ metros), as quais eram providas de comedouros e bebedouros, ficando alojadas nesta estrutura até o momento do parto. Na segunda metade da gestação, os seguintes tratamentos experimentais foram distribuídos às ovelhas: (1) Controle (**CON** = 16; macho = 9 e fêmea = 7) – Dieta formulada para atender as exigências nutricionais de proteína e energia para ovelhas gestantes com um único cordeiro, de acordo com o NRC (2007); ou (2) Suplementação com sais de cálcio do óleo de soja (**CSSO** = 14; macho = 7 e fêmea = 7) - *Ca salts of soybean oil*. Dieta basal (similar ao tratamento controle), acrescida de suplementação de sais de Ca de óleo de soja ao nível de $1,5 \text{ g/kg}$ do peso vivo (**Tabela 1**). A gordura protegida (sais de cálcio do óleo de soja) foi fornecida na dieta de ovelhas destinadas ao tratamento CSSO até o parto.

Durante a segunda metade da gestação, a dieta foi fornecida duas vezes ao dia (08:00 h e 16:00 h) na forma de dieta total. A dieta controle atendeu 101.7% e 66.0 % das exigências nutricionais e suplementação 96.9% e 106.7% de PB e NDT, respectivamente. O fornecimento da dieta às ovelhas gestantes foi controlado diariamente por meio do consumo na matéria natural, com a finalidade de proporcionar no máximo 10% de sobras.

Tabela 1. Ingredientes da dieta e composição química (% MS) dos tratamentos experimentais fornecidos a ovelhas prenhes durante a gestação e progênie durante a terminação em confinamento.

	Nutrição materna		Lactação	Terminação progênie
	CON	CSSO		
<i>Proporção dos ingredientes, % da MS</i>				
Silagem de milho	60,0	60,0	74,0	40,0
Caroço de açaí	15,0	15,0	15,0	-
Milho fuba	14,5	14,5	5,2	47,0
Farelo de soja	9,0	9,0	3,0	10,0

Gordura protegida	-	5,0	-	-
Mistura mineral	1,0	1,0	1,0	1,6
Uréia	0,2	0,2	1,3	1,0
Calcário	0,3	0,3	0,5	0,4
Total, % da MS	100,0	105,0	100,0	100,0
<i>Composição química, % da MS</i>				
MS	54,84	53,71	51,58	64,18
PB	10,27	9,78	10,66	15,66
PNDR, % da MS	3,51	3,34	8,14	10,11
PM	6,93	6,60	6,77	-
NDT	65,67	70,45	62,04	70,67
MM	2,86	3,77	2,75	31,73
FDA	26,56	25,31	29,00	13,48
FDN	42,06	40,10	44,11	40,23
CNF	48,88	46,55	47,91	46,39
EE	2,63	6,40	2,52	2,66
Ca:P	1,45	2,60	1,99	40,23

MS = Matéria Seca; PB = Proteína Bruta; PDR = proteína degradável no rúmen; PDNR = proteína não degradável no rúmen; PM = proteína metabolizável; NDT = nutrientes digestíveis totais; MM= matéria mineral; FDA= fibra em detergente ácido; FDN= fibra em detergente neutro; CNF= carboidrato não fibroso; EE = extrato etéreo; Ca:P = relação cálcio e fósforo.

2.2.3. Período pós-parto

Após o parto, todos os cuidados com os recém-nascidos foram tomados, tal como a garantia de ingestão do colostro pelos cordeiros nas primeiras horas pós-parto e a desinfecção do cordão umbilical com solução de iodo a 10%. Em seguida todos os animais foram pesados, identificados e mantidos junto à mãe em confinamento até os 20 dias de idade. Neste período, as ovelhas foram alimentadas com uma única dieta composta por silagem de milho, milho moído, farelo de soja, caroço de açaí triturado e mistura mineral, sendo a dieta formulada com o objetivo de atender as exigências nutricionais para lactação (**Tabela 1**). No dia 21 o par, matriz e progênie foram transferidos para piquetes de tifton 85 e manejados sob método de lotação intermitente, onde permaneceram até o desmame da progênie.

O desmame dos cordeiros foi realizado quando os cordeiros apresentaram em média $20 \pm 0,76$ kg de peso corporal. Imediatamente após o desmame, os cordeiros foram confinados nas mesmas instalações utilizadas para as ovelhas durante a gestação ($1,90 \times 1,10$ metros). Antes do fornecimento da dieta final a ser utilizada no período de confinamento, os animais foram submetidos a um protocolo de adaptação, constituído por 3 dietas, sendo cada uma delas empregada por 10 dias consecutivos (Tabela1). A dieta de terminação final foi formulada com estimativas de ganho de peso médio diário de 250 gramas por animal (NRC, 2007 e fornecida

até o final do período experimental. Os animais foram abatidos ao atingirem peso médio de $\pm 34,9$ kg.

2.3. Amostragem de tecidos para análise histológica e expressão gênica

Amostras de tecido muscular e adiposo subcutâneo da progênie foram obtidos aos 15 dias de idade por biópsias, e por coleta direta ao abate. Aos 15 dias de idade, os mesmos procedimentos e cuidados de realização da biópsia do tecido adiposo nas matrizes foram feitos na progênie. No entanto, a coleta do tecido adiposo e muscular foi realizado na região anterior direita próximo a ponta da paleta (*M. latissimus dorsi*). No abate, uma sub-amostra de gordura subcutânea e músculo da ponta da paleta (*M. latissimus dorsi*) foram removidas do lado direito do animal, condicionadas em tubos criogênicos contendo 1 mL de solução RNA *latter*, onde foram armazenados em freezer a -20°C para posterior análise de expressão gênica. Ainda durante a linha de abate, amostras de tecido adiposo subcutâneo e tecido muscular, ambas relacionadas ao *M. longissimus lumborum* foram coletadas, fracionadas em tamanhos de 1 cm^3 e condicionadas em tubos falcon contendo solução formalina a 10% (peso/volume) com fosfato tampão (pH = 7,2) para fixação do tecido para posterior análise histológica.

2.4. Análises histológicas

Após 24 horas de fixação em formalina das amostras de músculo *longissimus* e tecido adiposo, os tecidos foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2 durante 30 minutos, em seguida com água destilada por 1 hora antes de iniciar a desidratação. Nesta etapa, as amostras passaram por diferentes concentrações de álcool etílico (70, 80, 85, 90, 95, 100 I e 100 II%) por 20 minutos, cada. Posteriormente, as amostras foram lavadas em duas sequências de xilol por 15 minutos e incluídas em parafinas por uma hora. Em seguida, as amostras foram posicionadas conforme a disponibilidade das fibras em moldes de inclusão com parafina, garantindo assim estabilidade durante o corte histológico. Por fim, a microtomia foi efetuada com a realização de cortes de 3 micrômetros (μm) utilizando um micrótomo rotativo. Após várias sucessões de cortes, a fita de melhor ajuste durante os cortes foi condicionada em água aquecida com aproximadamente 45°C e logo retirada com lâmina. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa de 40 a 50°C para o derretimento da parafina, ajudando assim a fixar o corte na lâmina para posterior técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) corando o tecido conjuntivo e citoplasma em diferentes aspectos de azul, vermelho e laranja (RODRIGUES, 2018) seguindo o método descrito por Pluske *et al.* (1996).

As imagens histológicas de cada corte foram obtidas utilizando um microscópio óptico, Olympus em uma lente de 20x acoplado em uma câmera para captura de imagens com 300 DPI de resolução. Aproximadamente 120 células adipócitas e fibras musculares foram analisadas por meio de cinco fotomicrografias (20×) por seção de tecido (CARANI et al., 2006). O número de fibras por campo foi registrado a partir da contagem média em uma delimitação de 100 mil μm^2 dos cinco campos de imagens por amostra (SANTELO et al., 2010). Esses mesmos campos foram utilizados para mensuração de área, perímetro e diâmetro, utilizando o *software Image J*.

2.5. Análises de expressão gênica

A extração de RNA do tecido adiposo foi realizada usando um kit comercial de extração específico de lipídios de acordo com o protocolo do fabricante (74804 RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) e extração de RNA dos tecidos muscular e hepático foram realizadas utilizando kit comercial específico (Z3100 SV Total RNA Isolation System, Promega), foram realizadas extrações de 10 amostras de cada tratamento (CON; machos = 5 e fêmeas = 5) e (CSSO; machos = 5 e fêmeas = 5). O RNA total foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,0% (m / v), corado com gel de ácido nucleico GelRed (Biotium, Hayward, CA) e visualizado com um UVItec FireReader XS D-191 77Ls20M (UVItec, Cambridge, Reino Unido). A quantidade (ng / μL) e a qualidade do RNA (260/280 e 260/230) foram avaliadas usando um espectrofotômetro (NanoDrop Spectrophotometer ND 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE) a 260 nm. A síntese de cDNA foi realizada usando o HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante, e as amostras foram armazenadas a -20°C . Um sistema ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) foi usado com um sistema de detecção SYBR Green (Applied Biosystems) para análise quantitativa da expressão gênica por PCR quantitativo de transcrição reversa (RT-199 qPCR). O programa RT-qPCR usado foi o seguinte: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s. Os dados foram coletados e armazenados no software OS 7500 Fast (Versão 2.1; Applied Biosystems). Para cada reação, 1,0 μL de cDNA (100 ng / μL), 0,3 μL de cada primer (1,5 μM ; forward e reverse) e 5,0 μL de SYBR Green Master Mix e 3,4 H_2O UltraPureTM foram combinados em um volume final de 10,0 μL por amostra em uma placa óptica 96 poços MicroAmp (Applied Biosystems).

As análises de RT-qPCR de cada gene estudado foi realizada usando cDNA. Os resultados foram normalizados pelo método cycle threshold (CT) para a expressão dos genes

de referência *β -actina* (*ACTB*) e *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*) de cada tecido. O CT foi determinado pelo número total de ciclos usando o método CT comparativo. Um ensaio de validação foi realizado para demonstrar que as eficiências de amplificação dos genes alvo e de referência eram aproximadamente equivalentes. Curvas padrão foram geradas para os genes estudados com as seguintes diluições: 1: 5, 1:25, 1: 125, 1: 625 e 1: 3125. A expressão relativa dos genes alvo foi obtida pelo método 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Os primers foram avaliados a partir de sequências publicadas no GenBank - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) baseado no genoma de ovinos (*ovis aries*). Os primers (**Tabela 2**) foram elaborados com o software OligoPerfect Designer (Life Technologies, Grand Island, EUA). Os primers foram sintetizados comercialmente (Life Technologies, São Paulo, BR) e reconstituídos para uma concentração final de 10 μ mol.

Tabela 2. Conjuntos de primers usados para quantificar a expressão de mRNA de genes no tecido hepático materno usando PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Sequência primer	Número de acesso	Tecido	Amplicom
<i>ACACA</i>	F: CAGTTCCAGAACGGTCACTATG R: GACTTGAGCGTGAGAGAAGATG	NM_001009256.1	Fígado/ Gordura	105
<i>PPARγ</i>	F: GAAGTTCAACGCACTGGAATTAG R: GGGCTTCACATTCAGCAAAC	XM_042235730.1	Gordura/ Músculo	100
<i>GLUT4</i>	F: CATGTAGCTGTCTTGAAAGAG R: CTGTCCGCATTTCTGTCTCTAC	XM_004012529.5	Gordura	100
<i>FATP1</i>	F: CCACTGCTCAGATGCTTACA R: CAAATCCACTGCTGCCATTC	XM_042249695.1	Gordura/ Músculo	95
<i>CPT2</i>	F: CGAGTTTCCGCTTTCCTATCT R: TCCTCAGGGTCTCCTTGTT	XM_004001991.5	Gordura	98
<i>FASN</i>	F: CATCACCGCCATCTACATCC R: TGTCCAGACACCTGTTTATTAC	XM_027974304.2	Gordura	104
<i>ZFP423</i>	F: AGACAGGAACAGCGTGACAA R: CTGACAGTGATCGCAGGTGT	NM_001101893.1	Músculo	91
<i>TGFβ-1</i>	F: GACACCATGTGACTCGGTTAG R: CAGAGAAGAGCACAGTGTTGAG	XM_042230708.1	Músculo	99
<i>Pax7</i>	F: GACCACAGGCTGAGAAAGAA R: GACGCTATTTACAGGGCTAGAG	XM_027965643.2	Músculo	84
<i>mTOR</i>	F: CACGGATTAGGACTCTGGATTG R: GGACCAGTGAGGTAATGAGATG	XM_042256836.1	Músculo	80
<i>COL3A1</i>	F: TGGTATTCCTGGGCGAAATG R: CCACCAGTAGGACATGATTCAC	XM_004004514.5	Músculo	102
<i>MyHC I</i>	F: CCATCTCTGACAACGCCTATC R: CGTTTCGTGTTTACAGTCTTTT	XM_004012706.5	Músculo	103
<i>MyHC IIa</i>	F: GGAGAAGAGCGAGATGAAGATG R: TCTAGGTTTCCCTTGGCTTTC	XM_042255667.1	Músculo	107
<i>MyHC IIx</i>	F: CAAGGTTACATCTCCAAGGCA R: GCCATTTCTGGTCTGAACT	AB058897.1	Músculo	81
<i>NF-kB</i>	F: GTGAGAGAGAGAGGATTGGAGA	XM_042242560.1	Músculo	99

<i>WNT10B</i>	R: CCTCTACTGGTGTGTGTTTCATC F: AGAGTGGGTCAATGTGTGTAAG R: ACCCTGGACAGAAATCAGAAC	XM_004023070.5	Músculo	100
<i>MyoD1</i>	F: CTCCCTGCTCTGTTTCCTATTG R: GGCTCCCAGGGCTATTTATC	NM_001009390.1	Músculo	102
<i>MyoG</i>	F: CCCTACAGATGCCCACAATC R: TGGTATGGTTTCATCTGGGAAG	NM_001174109.1	Músculo	114
<i>ACTB</i>	F: TCCACCGCAAATGCTTCT R: AGCCATGCCAATCTCATCTC	NM_001009784.3	Fíg.; Mus. e gord.	90
<i>GAPDH</i>	F: CCCTGAGACAAGATGGTGAAG R: CGATGTCCACTTTGCCAGTA	NM_001190390.1	Fíg.; Mus. e gord.	78

ACTB = Beta-actin; *GAPDH* = Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; *PC* = pyruvate carboxylase; *ACACA* = acetyl-CoA carboxylase alpha; *PPARγ*= Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; *GLUT4*= Glucose transporter type 4; *FATP1*= Fatty acid transport protein 1; *CPT2*= Carnitine palmitoyl transferase 2; *FASN*= Fatty acid synthase; *ZFP423*= Zinc finger protein 423; *TGFβ-1*= Fatty acid transport protein 1; *PAX7*= Paired box 7; *mTOR*= Mammalian Target of Rapamycin; *COL3A1*= Collagen type III, alpha 1; *MyHC I*= Myosin heavy chain type I; *MyHC IIa*= Myosin heavy chain type IIa; *MyHC IIx*= Myosin heavy chain type IIx; *NF-Kb*= Nuclear factor kappa B; *WNT10B*= Wnt family member 10b; *MyoD1*= Myogenic differentiation 1; *MyoD1*= Myogenic differentiation 1; *MyoG*= Myogenin

2.5. Deposição de gordura na carcaça

Anterior ao abate, os animais passaram por um jejum de sólidos por 16 horas para obtenção do peso vivo final (PVF). No abate, após o procedimento de evisceração foi realizada a pesagem da gordura que recobre os estômagos (omental), intestino (mesentérica) e rins (perirrenal), e a soma dessas deposições constituiu a deposição de gordura interna (GI, kg). O peso de carcaça quente (PCQ, kg) foi obtido após a etapa de evisceração e retirada de cabeça, pele, rabo, sangue, patas e órgão reprodutor. As demais variáveis de deposição de gordura foram calculadas da seguinte forma: gordura interna na carcaça = $[(GI/PCQ)*100]$; gordura interna com base no PVF = $[GI/PVF]*100$. Após a obtenção do peso de carcaça fria em câmara de resfriamento a 4°C por 24 horas com auxílio de um paquímetro digital foi realizado a mensuração da espessura de gordura subcutânea (EGS) entre a 12° e 13° costela em dois pontos distais sob o músculo *longissimus* para obtenção da média.

2.6. Parâmetros qualitativos da carne

As carcaças foram submetidas o processo de resfriamento em câmara fria a 24 horas por 4°C. A meia carcaça esquerda foi dividida em cortes comerciais. A partir do corte lombo amostras do músculo *Longissimus lumborum* foram coletadas, e divididas em bifes de 2,5 cm de espessura, embaladas a vácuo e congeladas a -20°C para posterior análise no laboratório de carne do departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras.

O peso das amostras foi registrado, congelado e descongelado após 16 horas a 4°C para cálculos de perda por descongelamento, obtidos em porcentagem a partir do peso inicial. Subsequentemente, os índices de cor foram determinados na superfície do bife após o processo de descongelamento. Os bifes foram cortados para exposição ao oxigênio por 30 minutos para efeito de floração, a refletância da superfície da carne foi mensurada a partir da média de três medições consecutivas usando um colorímetro portátil com iluminante D65, conforme as recomendações descritas por CIE (1986). A partir da leitura obtida foram determinados os parâmetros de coloração em termos de luminosidade (L^*), intensidade de vermelho (a^*) e intensidade de amarelo (b^*).

As mesmas amostras foram cozidas em grelha até atingirem uma temperatura interna de 71°C, monitorados com termômetros digitais portátil. Após o cozimento, as amostras permaneceram em temperatura ambiente até estabilização e foram posteriormente pesadas, por diferença foi obtida a perda por cocção (PPC, %). A força de cisalhamento (FC, N/cm²) foi determinada nos mesmos bifes utilizados para estimar as perdas por cozimento. Para cada bife, realizou-se o corte de cinco núcleos retangulares (1,0 × 1,0 × 2,5 cm) na disposição das fibras musculares. Utilizando-se um texturômetro TA.XTplus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Surrey, Reino Unido) cada núcleo retangular foi cortado transversalmente a 200 mm/min por uma lâmina Warner – Bratzler acoplada ao equipamento. Os valores de resistência ao corte foram obtidos em Newtom a partir do valor médio dos cinco núcleos retangulares.

2.6. Procedimentos estatísticos

Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do programa SAS (Statistical Analysis System). Para os parâmetros relacionados às matrizes, foram considerados em um esquema fatorial 2 × 2 como efeitos fixos o tratamento nutricional materno (CON vs. CSSO) e o sexo da progênie (machos vs. fêmeas), e como efeitos aleatórios foram definidos o tempo de gestação e o agrupamento por características genéticas das ovelhas (Mestiças Santa Inês e Mestiças Dorper).

Os parâmetros relacionados às progênies, foram considerados em um esquema fatorial 2 × 2, referente ao tratamento nutricional materno (CON vs. CSSO), e o sexo da progênie (machos vs. fêmeas). O plano nutricional materno, sexo da progênie e a interação entre esses fatores, foram definidos como efeitos fixos. Como efeitos aleatórios foram definidos o pai, e o agrupamento por características genéticas das ovelhas (Mestiças Santa Inês e Mestiças Dorper). A data do parto foi inserida no modelo como covariável.

Adotou-se como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I igual a 5%. Tendências foram declaradas quando $0,05 < P \leq 0,10$.

4 RESULTADOS

4.1. Perfil histológico dos tecidos muscular e adiposo subcutâneo

Tabela 3. Parâmetros histomorfométricos do tecido muscular esquelético e tecido adiposo subcutâneo de progênie ao abate terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas suplementas com sais de cálcio a partir da segunda metade da gestação.

Variáveis	CON		CSSO		EPM	P-valor		
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea		NM	SP	NM*SP
Tecido muscular esquelético								
Área, μm^2	1006.67	1080.69	1003.14	1453.88	96.93	0.01	0.00	0.01
Perímetro, μm	118.64	121.63	118.58	142.08	5.32	0.02	0.00	0.02
Diâmetro, μm	29.58	31.83	30.59	36.05	1.19	0.00	0.00	0.05
Densidade ¹	69.13	69.67	68.73	56.17	3.78	0.08	0.12	0.09
Tecido adiposo subcutâneo								
Área, μm^2	2489.94	3027.80	2516.59	3200.92	529.44	0.79	0.10	0.84
Perímetro, μm	178.76	199.10	181.32	204.34	16.67	0.76	0.10	0.92
Diâmetro, μm	49.13	52.50	48.98	54.55	4.93	0.79	0.19	0.75
Densidade ¹	48.62	42.16	39.80	35.66	4.68	0.02	0.08	0.69

¹ contagem de fibras musculares esqueléticas e adipócitos/ 100 mil μm^2 ; CON = ovelhas alimentadas com dieta controle; CSSO = suplementação com sais de cálcio do óleo de soja. EPM= erro padrão da média; NM= nutrição materna; SP= sexo da prole. Médias seguidas de letras diferentes são diferentes entre si pelo teste de Tukey.

Houve interação ($P < 0.05$; Tabela 3) entre o tratamento alimentar materno e sexo da progênie para os parâmetros histomorfométricos do tecido muscular esquelético como referentes a área, perímetro e diâmetro do tecido muscular esquelético, e tendência para o número de fibras musculares ($P = 0.09$; Figura 5). Fêmeas oriundas de mães que receberam suplementação com gordura protegida na segunda metade da gestação, evidenciaram maior área, perímetro e diâmetro das fibras musculares em relação aos demais tratamentos. Houve tendência ($P = 0.07$) da população de fibras musculares ser ~11% superior inferior para progênie fêmeas oriundas de ovelhas CSSO.

Não houve interação ($P \geq 0.69$) entre os parâmetros estudados (nutrição materna e sexo da progênie) sobre a morfologia dos adipócitos subcutâneos (**Tabela 3**). Progênie provenientes de ovelhas que receberam suplementação com sais de cálcio do óleo de soja (CSSO) durante a metade da gestação apresentaram população de células adiposas subcutâneas ~20% menor

comparados ao CON ($P = 0.02$) ao momento do abate. Por outro lado, a área, o perímetro e o diâmetro dos adipócitos subcutâneos, foram semelhantes entre filhos de mães CON e CSSO ($P \geq 0.79$). Houve tendência da área e do perímetro de adipócitos subcutâneos serem ~24% e 12% superior ($P = 0.10$) para fêmeas em comparação aos machos. Por outro lado, o número de adipócitos subcutâneos tendeu ($P = 0.08$) a ser ~14% superior para machos (**Figura 5**).

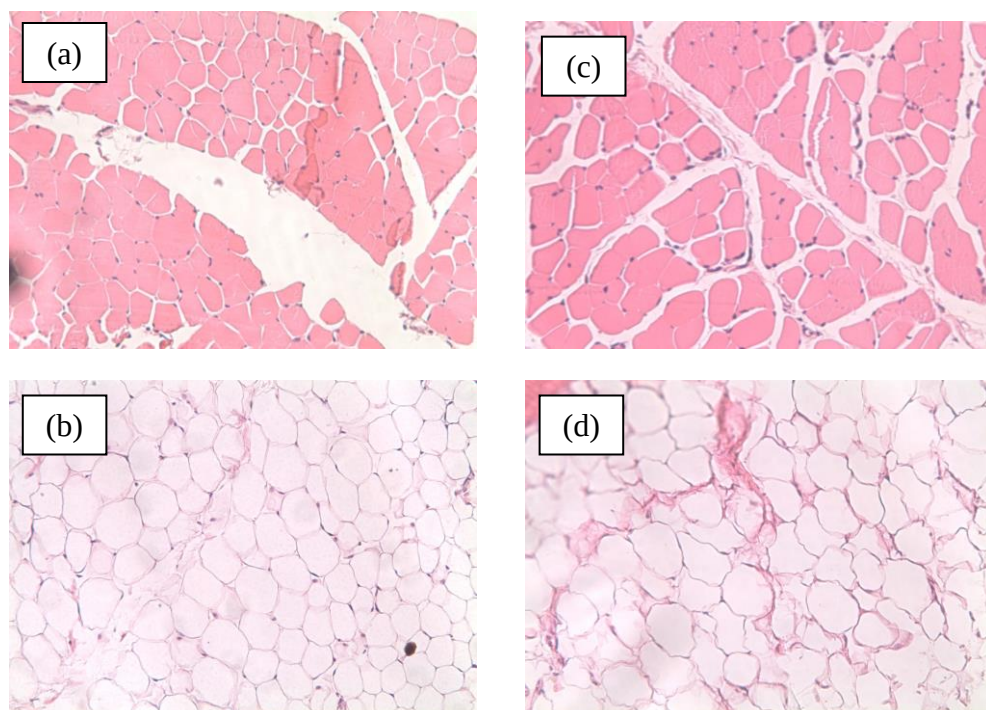


Figura 5. Influência da nutrição materna sobre o perfil histológico do músculo *longissimus lumborum* e gordura de cobertura da região lombar de progênie terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas. As imagens representativas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e observadas em microscópio óptico com ampliação de 20x. As imagens são de ± 6 meses de confinamento do tecido muscular esquelético (a) e adiposo subcutâneo (b) de proles provenientes de mães CON; e de proles de mães CSSO (c) e (d), (CON = ovelhas alimentadas com dieta controle; CSSO = ovelhas suplementadas com sais de cálcio do óleo de soja).

4. 2. Expressão gênica nos tecidos da progênie

A interação entre NM $\times$ SP ($P < 0,001$) mostrou que o marcador adipogênico precoce *zinc finger protein 423* (*ZFP423*; $P < 0,001$) no músculo esquelético aos 15 dias de nascimento foi mais expresso em progênie fêmeas CSSO do que progênie CON e fêmeas CON. A expressão de mRNA para *Miogenin* (*MyOG*; $P = 0,05$) no músculo esquelético aos 15 dias de nascimento foi ~19% superior em progênie de mães CSSO quando comparado com prole de mães CON. Houve efeito do sexo da prole ($P < 0,001$), onde fêmeas apresentaram maior expressão de mRNA para diferenciação miogênica I (*MyOD*), *TGF β 1*, *WNT* e *ZFP423*. No

entanto, machos CSSO mostraram maior expressão relativa para marcador miogênico *MyOG* (**Tabela 4**).

Tabela 4. Expressão gênica relativa do mRNA (média $\pm$ EPM) da miogênese no tecido muscular esquelético de progênies com 15 dias de nascimento em função da nutrição materna e sexo da prole.

Genes	CON		CSSO		SEM	P-valor		
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea		NM	SP	NM*SP
<i>MyOD</i>	0.77	1.22	0.75	1.11	0.07	0.54	0.001	0.68
<i>MyOG</i>	1.46	0.53	1.47	0.91	0.06	0.05	<0,001	0.06
<i>TGFβ1</i>	0.70	1.30	0.76	1.31	0.09	0.76	<0,001	0.81
<i>WNT</i>	0.79	1.21	0.75	1.29	0.10	0.92	0.004	0.68
<i>ZFP423</i>	0.91 ^{bc}	1.09 ^c	0.68 ^b	1.87 ^a	0.08	0.03	<0,001	0.001

Progênies provenientes de mães CSSO apresentaram maior abundância de mRNA para *MyHC I* ($P = 0,02$) no tecido muscular esquelético e *PPAR γ* ($P < 0,001$) no tecido adiposo (**Tabela 5**). Efeito de interação (NM $\times$ SP) foi reportado na expressão de mRNA do gene *PPAR γ* ($P < 0,001$) para progênie fêmea de mães CSSO. Houve efeito ($P = 0,03$) de interação quanto à expressão do gene *mTOR* e tendência ($P = 0,06$) do gene *CPT2* ao abate para progênie macho de mães CON.

Tabela 5. Expressão gênica relativa do mRNA (média $\pm$ SEM) de genes fibrogênicos, adipogênicos, síntese proteica e tipo de fibra no tecido muscular esquelético; adipogênicos e lipogênicos no adiposo subcutâneo em progênies ao abate em função da nutrição materna e sexo da prole.

Genes	CON		CSSO		SEM	P-valor		
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea		NM	SP	NM*SP
<i>Tecido muscular esquelético</i>								
<i>mTOR</i>	1.37 ^a	1.00 ^b	1.05 ^b	1.21 ^b	0.08	0.66	0.38	0.03
<i>COL3A1</i>	0.91	1.00	1.11	0.83	0.22	0.96	0.76	0.57
<i>CPT2</i>	1.82	1.00	0.91	1.20	0.19	0.21	0.35	0.06
<i>MyHC I</i>	0.76	1.00	0.63	0.62	0.07	0.02	0.27	0.24
<i>MyHC IIa</i>	0.73	1.00	0.62	0.72	0.09	0.16	0.17	0.51
<i>MyHC IIx</i>	0.77	1.00	0.70	0.64	0.09	0.11	0.51	0.30
<i>PAX7</i>	1.76	1.00	1.44	1.63	0.24	0.63	0.39	0.15
<i>PPARγ</i>	0.95 ^b	1.00 ^b	1.00 ^b	1.87 ^a	0.08	0.001	0.001	0.004
<i>Tecido adiposo subcutâneo</i>								
<i>ACACA</i>	1.28	1.00	1.11	1.16	0.15	0.97	0.59	0.43
<i>CPT2</i>	0.89	1.00	0.96	0.89	0.11	0.89	0.89	0.58
<i>PPARγ</i>	0.89	1.00	1.23	1.20	0.07	0.01	0.74	0.53

4.4. Deposição de gordura

Todos os parâmetros relacionados a deposição de gordura na progênie no momento de abate foram semelhantes entre animais CON e CSSO ($P \geq 0,45$). Ademais, não houve interação entre nutrição materna e sexo da progênie ($P > 0.05$) para as variáveis de deposição de gordura interna na carcaça (**Tabela 6**).

Tabela 6. Deposição de gordura interna da carcaça de progênes terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas suplementas com sais de cálcio a partir da segunda metade da gestação.

Variáveis	CON		CSSO		SEM	P-valor		
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea		NM	SP	NM*SP
Omental, kg	0.31	0.51	0.25	0.62	0,09	0,74	0,00	0,18
Mesentérica, kg	0.24	0.39	0.23	0.33	0,05	0,45	0,01	0,63
Perirrenal, kg	0.14	0.24	0.12	0.28	0,05	0,67	0,00	0,28
GI, kg	0.83	1.29	0.80	1.32	0,17	1,00	0,00	0,76
GIC, %	5.97	9.29	5.68	9.44	1,28	0,93	0,00	0,78
GIC_PVF, %	2.51	3.94	2.38	4.05	0,54	0,98	0,00	0,72

GI= gordura interna, kg; GIC= Gordura interna carcaça,%; GI_PVF= Gordura interna PVF,%; CON = ovelhas alimentadas com dieta controle; CSSO = ovelhas suplementadas com sais de cálcio do óleo de soja. EPM= erro padrão da média; NM= nutrição materna; SP= sexo da prole.

No entanto, houve efeito do sexo da progênie ($P < 0,001$) sobre todas as variáveis avaliadas para deposição de gordura na carcaça, com resultados favoráveis para fêmeas. Fêmeas apresentaram deposição de gordura omental, mesentérica, perirrenal e interna, aproximadamente 86%, 50%, 81% e 54% superior que machos, respectivamente. O percentual de gordura interna na carcaça e de gordura interna PVF, foram ~53% e 59% superior para fêmeas comparado aos machos, respectivamente (**Tabela 6**).

4.5. Parâmetros qualitativos da carne

Os efeitos da suplementação com sais de Ca de óleo de soja e do sexo da progênie, sobre os parâmetros qualitativos da carne, estão descritos na **Tabela 7**. Progênes provenientes de ovelhas que receberam suplementação com sais de cálcio de óleo de soja a partir da segunda metade da gestação apresentaram maior perdas por descongelamento ($P = 0,05$) e perdas totais ($P = 0,04$) comparados ao CON. Houve tendência de maior espessura de gordura subcutânea (EGS, $P = 0,09$), para progênie CSSO em relação ao CON. Por outro lado, não foram detectados efeitos da nutrição materna sobre o percentual de perdas por cocção e força de cisalhamento,

sobre o pH e parâmetros de coloração da carne em função do plano nutricional materno ($P \geq 0,11$).

Fêmeas apresentaram maior EGS (1,82 vs. 1,17 mm), medida GR (3.94 vs. 2.34 mm) da carcaça, intensidade de vermelho (a*; 18,59 vs. 19,75) e amarelo na carne (b*; 13,86 vs. 12,83) comparadas aos machos ($P \leq 0,03$). Por outro lado, machos demonstraram pH final da carne superior (5,44 vs. 5,34) que de fêmeas ($P = 0,05$). Os demais parâmetros relacionados aos aspectos qualitativos da carne, não foram influenciados pelo gênero dos animais ($P \geq 0,25$).

Tabela 7. Características de qualidade da carne de progênes terminadas em confinamento provenientes da programação fetal de ovelhas suplementas com sais de cálcio a partir da segunda metade da gestação.

Variáveis	CON		CSSO		EPM	P-valor		
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea		NM	SP	NM*SP
EGS, mm	1.06	1.38	1.28	2.26	0.38	0.09	0.05	0.30
PD, %	3.94	3.08	4.81	6.44	1.46	0.05	0.70	0.23
Cocção, %	23.89	24.06	26.07	24.11	1.31	0.25	0.36	0.27
Perdas totais, %	26.89	26.42	29.67	29.01	1.14	0.03	0.62	0.94
pH	5.42	5.37	5.47	5.31	0.04	0.90	0.05	0.26
Fc, N	39.49	35.26	38.12	41.78	2.50	0.32	0.91	0.13
L	47.43	46.05	45.19	47.34	1.17	0.66	0.72	0.11
a*	18.70	20.21	18.48	19.30	0.51	0.27	0.03	0.50
b*	13.45	13.88	12.21	13.83	0.66	0.19	0.04	0.23

pH= potencial hidrogeniônico; EGS= espessura de gordura subcutânea; GR= espessura de gordura máxima; PD= perda por descongelamento; Fc= força de cisalhamento; L= luminosidade; a*= Intensidade de vermelho; b*= intensidade de amarelo. CON = ovelhas alimentadas com dieta controle; CSSO = ovelhas suplementação com sais de cálcio do óleo de soja. EPM= erro padrão da média; NM= nutrição materna; SP= sexo da prole.

5 DISCUSSÃO

A utilização da gordura protegida no rúmen tem a soja como principal fonte de ácidos graxos e sabe-se que níveis de extrato etéreo acima de 7% da dieta em ruminantes podem afetar o consumo da ração. O objetivo de fornecer um alto consumo de lipídeos foi proporcionar melhor ingestão e absorção de ácidos graxos que tem potencial de modular a expressão de fatores de transcrição e alterar a trajetória de desenvolvimento do tecido muscular e adiposo fetal (Brandão et al., 2020).

Avaliando o uso de gordura protegida no rúmen em ovelhas gestantes foi observado interação entre os efeitos (NM $\times$ SP) para os parâmetros histológicos como área, perímetro e diâmetro, indica maior efeito em progênes de fêmeas resultantes de mães CSSO, o que pode justificar a tendência do menor número de fibras musculares por campo de contagem. Fêmeas foram mais precoces em depositar gordura e precisaram consequentemente hipertrofiar o

músculo esquelético mais cedo. A regulação da via *WNT* não foi afetada pela suplementação como observado por Du et al. (2010) ao avaliar supernutrição em ovelhas no músculo fetal. A expressão positiva da via de sinalização *WNT* observado para progênes fêmeas de mães CSSO, induziu o maior potencial de expressão fator de diferenciação miogênica I (*MyOD1*), atuante na regulação do crescimento muscular pós-natal por meio da diferenciação e fusão de fibras musculares já existentes (GUSTAFSSON et al., 2002; PERDIGUERO et al., 2009).

Isso é consistente com a estratégia adaptativa de recursos maternos para prole fêmeas, que está de acordo com a hipótese de Trivers-Willard (TRIVERS e WILLARD, 1973) sendo a teoria mais aceita e estudada ao sugerir que mães priorizam o desenvolvimento de fetos menos energéticos (fêmeas) de acordo com a capacidade de investir, cuja sobrevivência produza o melhor retorno para espécie. Gionbelli et al. (2016) reportaram viés sexual em vacas prenhas, sugerindo que a alocação de recursos maternos estaria direcionada a favorecer a prole fêmea como uma compensação evolutiva da dificuldade de conceber uma maior população de fêmeas, visto que taxas de concepção natural de machos é relativamente maior que fêmeas (Del RÍO et al., 2007). Em estudos com desnutrição materna em ovelhas, Ithurrealde et al. (2019) relataram que mães desnutridas de alguma forma tenderam a recusar a investir no desenvolvimento de fetos mais caros em termos energéticos (machos) e priorizaram o desenvolvimento de fêmeas.

A maior expressão do *TGF-β1* pode afetar a adipogênese através da inibição dos principais fatores de regulação (*PPARγ* e *C/EBP-α*), Rodrigues et al. (2020), o que não foi observado quando avaliado efeito do sexo. No presente trabalho, a nutrição materna na metade da gestação proporcionou maior expressão do fator de transcrição *ZFP423* de progênes fêmeas CSSO, que tem papel importante por comprometimento de células mesenquimais com a linhagem adipogênica (DU et al., 2013). A maior expressão mRNA do marcador adipogênico precoce *ZFP423*, está relacionado a maior espessura de gordura subcutânea observada em fêmeas de mães suplementadas, estando de acordo com os estudos descrito (BONNET et al., 2010; DU et al., 2013). O menor número de células adiposas mensuradas ao abate de cordeiros nascidos de ovelhas CSSO pode estar relacionado a maior expressão do marcador adipogênico *PPARγ*, capaz de modular enzimas envolvidas na via lipogênica (NTAMBI, 1999), com aumento no preenchimento dos adipócitos e consequentemente menor número por campo de contagem. Sugerindo assim, que nutrição materna alterou a trajetória de crescimento dos adipócitos, que foi altamente dependente de hiperplasia pré-natal (adipogênese) e hipertrofia pós-natal (lipogênese) (Tabela 4 e 5). Nossos achados revelaram que a suplementação materna pode alterar a trajetória e crescimento fetal de forma dependente do sexo, em virtude da

alteração no potencial de desenvolvimento pós-natal do músculo esquelético e tecido adiposo subcutâneo.

Entre os depósitos de gordura, as fêmeas apresentaram maior deposição de gordura interna, o que já era esperado quando se trata de sexo, indicando diferenças entre a taxa de maturidade entre os sexos. A maior participação de gordura interna nas fêmeas está de acordo com outros estudos ao avaliarem o efeito da classe sexual, onde fêmeas apresentaram deposição precoce de gordura interna e na carcaça (PAULINO et al. 2009). Ademais, esses resultados estão relacionados a tendência de geralmente fêmeas apresentarem maior preenchimento precoce dos adipócitos por lipídeos, evidenciado pela maior expressão relativa de mRNA do marcador adipogênico *ZFP423*. Denotando que o tecido adiposo dos machos poderia estar em fase hiperplásica para posterior hipertrófica quando comparado às fêmeas. A hiperplasia dos depósitos de gordura visceral é desenvolvida principalmente durante a fase inicial do crescimento fetal, em que o fornecimento de dieta obesogênica materna podem aumentar a adiposidade abdominal (TONG et al., 2011).

A maior deposição de gordura subcutânea e máxima espessura de gordura (medida GR) foi evidenciado em progênie fêmeas de mães CSSO. A maior deposição de gordura pode estar relacionada a maior síntese de ácidos graxos, proporcionada pela formação dos ácidos graxos voláteis (aceto, propionato e butirato), em decorrência do maior consumo de matéria seca, sendo o acetato o principal precursor (BURIN, 2016). Segundo Hales et al. (2017) a maior eficiência energética de lipídios vs. carboidratos e proteínas possibilita maior disponibilidade de energia metabolizável (EM), que por conseguinte pode ser depositada de forma mais eficiente no tecido muscular e adiposo. Velazquez et al. (2021), ao avaliarem o suprimento materno com ácidos graxos durante a gestação tardia de ovelhas reportaram efeito dependente do sexo, onde fêmeas nascidas de mães que receberam PUFA não apresentaram diferença na espessura de gordura, porém apresentaram maior desempenho (PC e PCQ), essas alterações no peso final da prole podem ser decorrentes de um sistema glicose-insulina.

O alvo mecanicista da via de sinalização da rapamicina (*mTOR*) é uma via central que pode ser regulada por nutrientes (Dible et al. 2013) atuando sobre processos celulares, incluindo síntese proteica, crescimento celular, metabolismo, e progresso do ciclo celular (ZONCU et al., 2011). Machos de mães CON apesar de não terem apresentado diferença fenotípica no desenvolvimento de massa muscular no pós-natal, expressaram de forma supra regulada o gene *mTOR*, indicando assim maior atividade na via de sinalização para síntese proteica em nível molecular.

Em relação ao efeito nutricional materno sobre a prole, não somente o comprometimento celular pode ser alterado, mas o uso de fonte de energia (RODRIGUES et al. 2020). Os tipos e proporção de fibra pode sofrer ação de fatores como sexo, tipo de músculo, idade e entre outros (HOCQUETTE et al., 2010). Fibras tipo I são caracterizadas pela baixa velocidade de contração e atividade oxidativa, que realizam β -oxidação e utilizam ácidos graxos como fonte de energia (LISTRAT et al.; 2016). No presente estudo, evidenciou-se que progênie de mães CSSO apresentaram menor expressão do marcador de fibra tipo I (*MyHC I*), implicando em um metabolismo menos oxidativo no tecido muscular. A nutrição materna não apresentou efeito sobre os parâmetros de qualidade da carne, com exceção para perdas totais. Quando avaliado o efeito do sexo, progênie macho apresentaram maior pH da carne em comparação as fêmeas que pode ter reduzido a intensidade de vermelho (a^*) e amarelo(b^*), visto que elevados valores de pH podem levar a uma maior retenção de água com aumento da absorção de luz e diminuição de refletância (RAMANATHAN et al., 2020). O aumento nos valores de L^* , a^* e b^* de animais alimentados com gordura protegida no rúmen pode ser atribuído ao aumento na formação de oximioglobina, que pode ter ocorrido devido à maior oxidação de pigmentos mioglobina estimulada pela maior susceptibilidade à oxidação lipídica no músculo *longissimus dorsi* desses animais (LADEIRA et al., 2014). Esse fato é coerente com a afirmação de que a nutrição sobre a cor da carne, principalmente sobre o índice de vermelho (a^*), está relacionado a instabilidade dos pigmentos heme (MANCINI & HUNT, 2005).

6 CONCLUSÃO

A suplementação com sais de cálcio de óleo de soja durante a segunda metade gestacional altera o perfil histológico do tecido muscular esquelético, número de adipócitos e expressão de genes associada miogênese e adipogênese da progênie, e genes envolvidos no metabolismo energético hepático materno. Em virtude dessas modificações no potencial de desenvolvimento pós-natal dos tecidos fetais e dimorfismo sexual, a nutrição materna alterar a trajetória e crescimento fetal de forma dependente do sexo.

7 REFERÊNCIAS

- AGCA, C. et al. Cloning and characterization of bovine cytosolic and mitochondrial PEPCK during transition to lactation. **Physiol. Genomics** 11:53–63, 2002.
- ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **J. Dairy. Science.** v. 83, p. 1598–1624, 2000.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. Aarlington, VA, USA: AOAC International Publisher, 1995.
- BAUMAN, D. E. et al. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.
- BONNET, M. *et al.* Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. **Animal: an international journal of animal bioscience**, 4, n. 7, p. 1093, 2010.
- BRANDÃO, A. P. *et al.* Supplementing Ca salts of soybean oil to late-gestating beef cows: impacts on performance and physiological responses of the offspring. **Journal of animal science**, v. 98, n. 8, p.247, 2020.
- BURGESS, S. C. et al. Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. **Cell Metab.** 5:313–320, 2007.
- Carani, F. R., Moreira, P.S.A., Carvalho, R.F., Padovani, C.R., Chardulo, L.A.L., Silva, M.D. P., 2017. Histochemistry and growth characteristics of bovine semitendinosus muscle exposed to recombinant bovine somatotropin (rbST). **J. Morphol. Sci.** 23, 598 263-270.
- DU, M. *et al.* Meat science and muscle biology symposium: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. **Journal Animal Science**, 2013.
- DUARTE, M. S. et al. Maternal overnutrition enhances mRNA expression of adipogenic markers and collagen deposition in skeletal muscle of beef cattle fetuses. **Journal of Animal Science**, 92, 3846–3854, 2014.
- HALES, K. E. *et al.* The effects of feeding increasing concentrations of corn oil on energy metabolism and nutrient balance in finishing beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 2, p. 939-948, 2017.
- HOCQUETTE, J. F. Regulação Endócrina e Metabólica do Crescimento Muscular e Composição Corporal em Bovinos. **Animal**, 2010.
- ITHURRALDE, J. *et al.* Gestational nutrient restriction under extensive grazing conditions: Effects on muscle characteristics and meat quality in heavy lambs. **Meat Science**, v. 179, p. 108532, 2021.

- KARCHER, E. L. et al. Effect of dietary carbohydrate and monensin on expression of gluconeogenic enzymes in liver of transition dairy cows. *J. Anim. Sci.* 85:690–699, 2007.
- LADEIRA, M. Nutrigenomics and beef quality: a review about lipogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 2016.
- LADEIRA, M. Nutrigenomics of marbling and fatty acid profile in ruminant meat. *Animal* 12, 282–294, 2018.
- LISTRAT, A. et al. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *Sci. World J.* 2016.
- LOPES, R. C. et al. Impacts of protein supplementation during late gestation of beef cows on maternal skeletal muscle and liver tissues metabolism. *Animal*, v. 14, n. 9, p. 1867-1875, 2020.
- MARQUES, R. S. *et al.* Effects of supplementing calcium salts of polyunsaturated fatty acids to late-gestating beef cows on performance and physiological responses of the offspring. *Journal of Animal Science*, v. 95, n. 12, p. 5347–5357, 2017.
- MARTIN, C. C. *et al.* Prepartum fatty acid supplementation in sheep. III. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid during finishing on performance, hypothalamus gene expression, and muscle fatty acids composition in lambs. *Journal of Animal Science*, v. 96, n. 12, p. 5300–5310, 2018.
- MORAES, E. P. B. X. *et al.* Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de Ovinos da raça Santa Inês. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 1, p. 148–155, 2008.
- NAKAMURA, M. T., B. E. Yudell, and J. J. Loor. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 53:124–144, 2014.
- NICKLES, K. R. *et al.* Supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in late gestation in ewes changes adipose tissue gene expression in the ewe and growth and plasma concentration of ghrelin in the offspring. *Journal of animal science*, v. 97, n. 6, p. 2631-2643, 2019.
- PAULINO, P. V. R. *et al.* Deposição de tecidos e componentes químicos corporais em bovinos Nelore de diferentes classes sexuais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 12, p. 2516-2524, 2009.
- PERDIGUERO, E., P. Epigenetic regulation of myogenesis. *Epigenetics* 4:541– 550, 2009.
- RAMANATHAN, R. et al. Recent updates in meat color research: integrating traditional and high-throughput approaches. *Meat Muscle Biol.* 4 (2), 1–24, 2020.
- RODRIGUES, L. M. *et al.* Effects of protein supplementation on Nellore cows' reproductive performance, growth, myogenesis, lipogenesis and intestine development of the progeny. *Animal Production Science*, 2020.
- ROSA-VELAZQUEZ, Milca *et al.* Maternal supply of fatty acids during late gestation on offspring's growth, metabolism, and carcass characteristics in sheep. *Animals*, v. 11, n. 3, p. 719, 2021.
- SANTOS, V. J. *et al.* Ultrassonografia gestacional em ovelhas - Revisão de literatura. *Revista*

Brasileira de Reprodução Animal, v. 41, n. 2, p. 634–638, 2017.

SUKHIJA, P. S.; PALMQUIST, D. L. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 7, p. 1784-1787, 1990.

TRIVERS, R. L., & WILLARD, D. E. Natural selection of parental ability to vary the sex ratio of offspring. **Science**, 179, 90–92, 1973.

YANG, Q. *et al.* Maternal obesity induces epigenetic modifications to facilitate Zfp423 expression and enhance adipogenic differentiation in fetal mice. **Diabetes**, v. 62, n. 11, p. 3727-3735, 2013.

ZHANG, Q. *et al.* Propionate induces the bovine cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter activity. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6654-6664, 2016.

R. Zoncu, A. Efeyan, D.M. Sabatini mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 12 (2011), pp. 21-35

C.C. Dibble, B.D. Manning Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output Nature Cell Biology, 15 (6) (2013), p. 555, 10.1038/ncb2763