

BRUNO LAPO UTEMBERGUE

**Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em
bovinos Nelore confinados**



Pirassununga
2014

BRUNO LAPO UTEMBERGUE

**Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em
bovinos Nelore confinados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Angélica Simone Cravo Pereira

Pirassununga

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2988 FMVZ	Utenbergue, Bruno Lapo Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em bovinos Nelore confinados / Bruno Lapo Utenbergue. – 2014. 85 f. : il. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2014. Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal. Orientador: Prof. Dr. Angélica Simone Cravo Pereira. 1. Composição lipídica. 2. Expressão diferencial de genes. 3. Perfil de ácidos graxos. 4. RNA-seq. 5. Bovinos. I. Título.
----------------	--

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

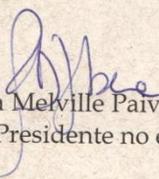
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em bovinos Nelore confinados", protocolado sob o nº 2850, utilizando 48 (quarenta e oito) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia seis de fevereiro de 2013.

We certify that the Research "Study of the gene expression. Associated to fatty acid profile in Nelore cattle feedlot", protocol number 2850, utilizing 48 (forty eight) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved at the meeting on 6 February of 2013.

São Paulo, 28 de maio de 2014.


Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: UTEMBERGUE, Bruno Lapo

Título: **Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em bovinos Nelore confinados.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

À todos aqueles que me apoiaram e sempre estiveram ao meu lado durante todos os momentos, e não mediram esforços para que eu alcançasse crescimento profissional e pessoal, especialmente aos meus pais. Sem eles nada disso seria possível...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Nilcéa e Nivaldo, que permitiram que todos meus sonhos fossem possíveis, me apoiando sempre que necessário, e permitindo que nunca me sentisse sozinho.

À Esther, meu amor, por ter feito parte de todas as alegrias e percalços durante o mestrado, também sempre me apoiando e incentivando, ficando sempre ao meu lado e sempre com a nossa fiel escudeira Stella.

À Universidade de São Paulo, especialmente ao Departamento de Nutrição e Produção animal, que permitiu que eu realizasse meu trabalho em suas dependências, proporcionando crescimentos pessoal e profissional.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Angélica Simone Cravo Pereira, pelos constantes ensinamentos e sugestões, ajudando sempre no meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Fernando Baldi pela co-orientação e constante apoio durante todas as fases do meu trabalho, me ajudando sempre.

Aos professores do VNP pelos constantes ensinamentos, conversas e dedicação.

À Ale e Fábria pelo apoio e ajuda sempre que necessário.

Ao João Paulo pela ajuda e dedicação.

À toda equipe do Laboratório de Ciência da Carne pelas conversas, ajudas, aprendizados e momentos de descontração.

Aos alunos das turmas 77 e 78 pela paciência e dedicação por me escutarem e me mostrarem o quão gostoso é dar aula.

À todos os colegas da pós por todos os momentos juntos. Na alegria ou na tristeza, na saúde ou na doença! A família que escolhemos.

À república Hard Roça, Maria, Vivi, Nara e ao agregados pelas risadas, conversas, creches caninas e apoio.

Às meninas da limpeza por sempre manterem nosso ambiente de trabalho limpo e por sempre proporcionarem um ótimo café com muitas conversas!

À todos os funcionários do campus que foram sempre muito solícitos e sempre ajudaram em todas as ocasiões.

À Simi, Renata e Lu por todo o apoio durante as análises e por todas as conversas.

À Mari, Rômulo, Felipão e Márcio pelas conversas e cervejas.

À Larissa Fonseca e à Dra. Daniele Gimenez pelo intensivão em Jaboticabal, por terem sempre me ajudado e apoiado. Vocês foram essenciais para que eu realizasse meu projeto.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela oportunidade de realizar minhas análises em suas dependências e pelos constantes ensinamentos do Prof. Dr. Jesus e da Prof^a. Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro.

À Dani, Gracinha e meninas pelo acolhimento em Jaboticabal, me proporcionando ótimos momentos de conversa, amizade e de abrigo!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de Mestrado.

Enfim, à todos aqueles que de alguma forma fizeram parte do meu mestrado. Prefiro não citar o nome de todos para não correr o risco de esquecer alguém.

À todos vocês, meu **MUITO OBRIGADO**.

RESUMO

UTEMBERGUE, B. L. **Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em bovinos Nelore confinados.** [Study of the gene expression associated to fatty acid profile in Nelore cattle feedlot]. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Nos últimos anos tem-se destacado a importância dos ácidos graxos presentes na carne e leite, em especial aqueles que poderiam influenciar a saúde humana. A deposição de gordura, e também sua composição, é resultado da interação entre os fatores genotípicos e fenotípicos. Sendo assim, o contínuo melhoramento genético, com a seleção de determinados genes, pode influenciar na qualidade do produto que chega à mesa do consumidor. Objetivou-se com este estudo avaliar os padrões de expressão dos genes diferencialmente expressos relacionados ao perfil de ácidos graxos da carne de bovinos Nelore confinados, por meio da verificação dos padrões de expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na síntese dos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1 cis-9), linoléico (C18:2 cis-9 cis-12), CLA (C18:2 cis-9 trans-11) e linolênico (C18:3). Foram utilizados 48 bovinos machos inteiros, Nelore, com idade aproximada de 24 meses, dos quais foram coletadas amostras do músculo *Longissimus* para a realização das análises. Verificou-se um total de 1173 genes diferencialmente expressos entre os grupos de baixa e alta concentração de cada um dos ácidos graxos. Os genes diferencialmente expressos identificados no músculo *Longissimus* foram *ACAT1*, *ACOX2*, *ACOT11*, *ACSM3*, *ACSS1*, *AGPAT6*, *BDHI*, *CIQTNF3*, *CYP4B1*, *DGAT2*, *FABP3*, *FABP4*, *FABP7*, *GK*, *IGF2*, *LCAT*, *LIPE (HSL)*, *LPL*, *PLIN1*, *PLIN5*, *SCD5* e *SLC27A6*, que possuem ações nas vias metabólicas dos ácidos graxos ou nas vias adjacentes, podendo influenciar sobre o perfil lipídico da carne. Estudos com RNAseq envolvendo o perfil de ácidos graxos na carne ainda são escassos, e em animais zebuínos não há relatos. Desta forma, ainda são necessários mais estudos a fim de esclarecer como determinados genes podem influenciar as características desejadas, como por exemplo, o perfil de ácidos graxos da gordura intramuscular.

Palavras-chave: Composição lipídica. Expressão diferencial de genes. Perfil de ácidos graxos. RNA-seq. Bovinos.

ABSTRACT

UTEMBERGUE, B. L. **Study of the gene expression associated to fatty acid profile in Nellore cattle feedlot.** [Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em bovinos Nelore confinados]. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Recently, the importance of fatty acids on meat and milk has been highlighted, especially those that could affect human health. The fat deposition, and its composition, is a result of the interaction between genotypic and phenotypic factors. In this way, the continuous genetic improvement, with the selection of some genes, can influence the quality of the product acquired by the consumers. The aim of this study was evaluate the patterns of expression of differentially expressed genes related to the fatty acid profile of Nellore cattle feedlot, by verifying the patterns of expression of genes involved in lipid metabolism and in the synthesis of fatty acids palmitic (C16: 0), stearic (C18: 0), oleic (C18: 1 cis-9), linoleic (C18: 2 cis-cis-9-12), CLA (C18: 2 cis-9 trans-11) and linolenic acid (C18: 3). Forty-eight bovine, male, Nellore, with an average age of 24 months, from which were collected samples of Longissimus Muscle to carry out the analysis. There were a total of 1173 differentially expressed genes between groups of low and high concentration of each of the fatty acids. Differentially expressed genes identified in Longissimus were *ACAT1*, *ACOX2*, *ACOT11*, *ACSM3*, *AGPAT6*, *BDH1*, *ACSS1*, *CIQTNF3*, *CYP4B1*, *DGAT2*, *FABP3*, *FABP4*, *FABP7*, *GK*, *IGF2*, *LCAT*, *LIPE (HSL)*, *LPL*, *PLIN1*, *PLIN5*, *SCD5* and *SLC27A6*, that are related to metabolic pathways of fatty acids or the adjacent pathways, and may influence on meat lipid profile. Studies with RNAseq involving fatty acid profile in meat are still rare, especially in Zebu cattle, in which there are no reports. In this way, further studies are still needed in order to clarify how certain genes can influence the desired characteristics, for instance, the fatty acid profile of intramuscular fat content.

Keywords: Lipid composition. Differential expressed genes. Fatty acids profile. RNA-seq. Bovine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias dos ácidos graxos (g/100g de ag) no m. <i>Longissimus</i> de tourinhos nelore confinados.....	47
Tabela 2 - médias dos lipídeos totais (g/100g) do m. <i>longissimus</i> de tourinhos nelore confinados.....	48
Tabela 3 - Resultados da extração de rna das amostras do m. <i>Longissimus</i>	48
Tabela 4 - Quantidades de genes diferencialmente expressos para cada ácido graxo, entre os grupos de alta e baixa concentração dos ácidos graxos no m. <i>Longissimus</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Passos para sequenciamento e comparação entre amostras.....	29
Figura 2 - Vias metabólicas dos genes <i>GK</i> (2.7.1.30), <i>DGAT2</i> (2.3.1.20) e <i>LPL</i> (3.1.1.34)..	51
Figura 3 - Via metabólica do gene <i>ACSSI</i> (6.2.1.1).....	52
Figura 4 - Via metabólica do gene <i>LCAT</i> (2.3.1.43)	53
Figura 5 - Via metabólica do gene <i>ACSM3</i> (6.2.1.2)	54
Figura 6 - Via metabólica dos genes <i>FABP4</i> (<i>AP2</i>) E <i>FABP7</i> (<i>FABP</i>)	55
Quadro 1 – Genes candidatos.....	33

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	SAÚDE HUMANA E CONSUMO DE CARNE BOVINA	21
3.2	COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CARNE	23
3.3	ÁCIDOS GRAXOS DE INTERESSE EM CARNE	23
3.4	RNASEQ	25
3.5	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES	29
3.6	GENES QUE AFETAM O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NA CARNE	30

CAPÍTULO 2

4	INTRODUÇÃO	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	ANIMAIS E FORMAÇÃO DOS LOTES E PROCEDIMENTO DE ABATE	39
5.2	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	40
5.3	EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS	40
5.4	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	41
5.5	VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E INTEGRIDADE DO RNA EXTRAÍDO	42
5.6	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNASEQ)	43
5.7	EXPRESSÃO GÊNICA	43
5.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
6	RESULTADOS	46
6.1	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	46
6.2	EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS	48

6.3	EXTRAÇÃO DE RNA E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO POR RNASEQ	48
6.4	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES	50
7	DISCUSSÃO.....	57
8	IMPLICAÇÕES.....	66
9	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	70

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte apresenta destaque na pecuária brasileira, sendo um dos principais contribuintes para o PIB do agronegócio brasileiro. Um dos fatores responsáveis por esta importância econômica é o fato do Brasil possuir o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 210 milhões de cabeças (IBGE, 2012), sendo o maior exportador, tendo seu rebanho diluído ao longo de todo o território nacional, com áreas de concentrações nas regiões Centro-oeste, Norte e Sudeste, conferindo à cadeia produtiva da carne bovina brasileira uma alta representatividade nos cenários nacional e internacional (FAO, 2013).

Há uma preocupação por parte da população e dos órgãos de saúde pública quanto ao consumo excessivo de gorduras, bem como o tipo de gordura ou o perfil de ácidos graxos e seu impacto sobre o consumidor. Isso porque o perfil de ácidos graxos é de suma importância para a saúde humana, uma vez que esta gordura não pode ser removida ou extraída durante o preparo e consumo do alimento (SMET et al., 2004).

Como muitas outras características de interesse econômico, tais como ganho de peso médio diário, peso ao desmame e peso ao sobreano, a deposição de gordura nos animais pode ser explicada a partir da interação entre os fatores genéticos e ambientais. Desta forma, o aumento do conhecimento sobre o mecanismo de ação dos genes ligados a estas características permite a complementação dos métodos quantitativos de melhoramento animal (LEDUR, 2001).

A funcionalidade do genoma é determinada pelas respostas fisiológicas à hormônios, nutrição, desafios ambientais e outros importantes estágios do desenvolvimento, que levam à um estímulo fisiológico altera a síntese proteica. Esta resposta genômica aos estímulos externos pode influenciar diversas características dos animais, entre elas aquelas de interesse econômico, como ganho de peso, produção de músculos ou leite e resistência às doenças (PAREEK et al., 2011).

Dentre as diferentes tecnologias disponíveis para análise do genoma, a técnica de RNAseq tem se destacado. Esta técnica é uma abordagem desenvolvida recentemente que possibilita a observação de todo o transcriptoma por meio de tecnologias de sequenciamento (WANG et al., 2009), permitindo realizar o sequenciamento e a quantificação dos transcritos, independente do seu tamanho, com uma grande resolução.

Por ser um método quantitativo, pode ser utilizado a fim de determinar os níveis de expressão gênica de maneira mais acurada que os microarranjos e, por não existirem etapas de

clonagem, o RNAseq requer uma quantidade muito menor de amostras de RNA. Além disso, a detecção dos transcritos não fica restrita somente àqueles correspondentes a uma sequência genômica pré-existente, tornando possível a identificação de novos transcritos, através da avaliação de todo o genoma (WANG et al., 2008; OSHLACK et al., 2010; FONSECA, 2013). Deste modo, propõe-se avaliar os padrões de expressão dos genes diferencialmente expressos relacionados ao perfil de ácidos graxos da carne de tourinhos Nelore confinados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Objetivou-se avaliar os padrões de expressão dos genes diferencialmente expressos relacionados ao perfil de ácidos graxos da carne de bovinos Nelore confinados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Identificar genes diferencialmente expressos pela técnica de RNAseq no músculo *Longissimus* de bovinos Nelore confinados.
- ii. Correlacionar os genes diferencialmente expressos envolvidos no metabolismo lipídico e na síntese dos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1, *cis*-9), linoléico (C18:2, *cis*-9 *trans*-12), ácido linoléico conjugado (CLA, C18:2, *cis*-9, *trans*-11) e linolênico (C18:3).

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SAÚDE HUMANA E CONSUMO DE CARNE BOVINA

No Brasil, nos últimos anos, houve um aumento na renda per capita da população, com expansão da classe média, melhor distribuição da renda e redução da pobreza. O incremento no poder de compra da população, sobretudo por produtos alimentícios de alto custo, tem modificado os hábitos de consumo da população brasileira, com uma tendência de aumento no consumo de produtos cárneos, principalmente carne bovina. Neste sentido, o consumo per capita no Brasil de carne bovina tem aumentado consistentemente, chegando a aproximadamente 40 kg de carne por habitante em 2013 (USDA, 2014). O mercado interno e externo está cada vez mais exigente em relação ao tipo de produto demandado, portanto, conhecer melhor os atributos da carne mais valorizados pelos consumidores, resulta em um elemento imprescindível para o delineamento de estratégias comerciais para a conquista e manutenção de mercados.

O desenvolvimento da sociedade, nas últimas décadas, tem implicado diretamente na mudança de alguns hábitos alimentares, fazendo com que as pessoas procurem, cada vez mais, alimentos que estejam associados à imagem de uma vida mais saudável, com maiores benefícios à saúde (XIMENES, 2009).

Dentre estes alimentos, destaca-se a carne bovina, por possuir um alto valor nutritivo, de grande importância na alimentação da população, sendo um dos alimentos mais importantes na composição de uma dieta balanceada (SAUCIER, 1999). Isto ocorre porque a carne bovina é rica em proteínas de alto valor biológico, à presença de vitaminas do complexo B, como a vitamina B12, ácidos graxos essenciais e, em menor proporção, à sua concentração de determinados minerais, como ferro e zinco. Ainda, as proteínas da carne ainda apresentam uma composição interessante de aminoácidos essenciais (PENSEL, 1998).

Com relação ao grupo das carnes, sabe-se que a carne bovina magra, similarmente à carne branca das aves (sem pele) e ao lombo suíno, é fonte importante de proteína e deve fazer parte de uma dieta balanceada com os nutrientes dos demais grupos de alimentos. Os teores de colesterol e gordura da carne bovina magra são também semelhantes aos da carne branca das aves sem pele, como também ao do lombo suíno (VALLE, 2000).

Entretanto, a partir do século XX, principalmente em função da mudança nos hábitos alimentares e do estilo de vida da população, a incidência de doenças cardiovasculares passou a assumir maior importância por ser uma das principais causas de mortalidade nas sociedades desenvolvidas. Este fato é atribuído ao elevado consumo de gorduras, em especial as de origem animal, por aumentarem os níveis de colesterol sanguíneo (LOBATO; FREITAS, 2006).

Devido à possibilidade de conter níveis elevados de colesterol e de ácidos graxos saturados (AGS), a carne bovina passou a ser motivo de preocupação com relação à saúde humana, apesar de seu alto valor nutritivo, sendo ainda relacionada à incidência de doenças cardíacas. Por outro lado, alguns compostos da carne podem beneficiar o seu consumidor, como é o caso do ácido oleico, que é responsável pela redução do colesterol e por outros atributos saudáveis, incluindo a redução do risco de enfarto e efeitos benéficos na pressão sanguínea (BRUGIAPAGLIA et al., 2014).

De acordo com Valle (2000), em documento sobre o consumo de carne bovina, alguns fatores de risco são ditos como “não controláveis” e outros “controláveis”. Os primeiros são a idade e o histórico familiar (genética), e os últimos são caracterizados pela inatividade física, fumo, obesidade, diabete, pressão alta, altos níveis de colesterol total e LDL colesterol (lipoproteínas de baixa densidade) e baixos níveis de HDL colesterol (lipoproteínas de alta densidade). Estes são aspectos extremamente relacionados com a ocorrência das doenças cardiovasculares que devem ser ressaltados, por contribuírem de maneira significativa para o aumento dos níveis de colesterol no sangue. Portanto, observa-se que a ingestão de gorduras de origem animal não deve ser considerada isoladamente, pois a associação de um ou mais desses fatores pode ser muito prejudicial à saúde humana (LOBATO; FREITAS, 2006).

Nas últimas décadas, a carne de animais ruminantes sofreu intenso ataque de profissionais da área da saúde, que a colocavam como um produto prejudicial à saúde humana. Isto ocorreu devido aos maiores teores de ácidos graxos saturados (AGS) nas carnes de ruminantes, em relação às carnes de outros animais, principalmente de peixes e aves. O principal motivo da limitação de carne bovina na dieta humana ocorre pela restrição ao consumo de gordura saturada. Ainda, há uma preocupação com o aumento da concentração destes ácidos graxos na carne, devido a seus efeitos adversos sobre o sabor, coloração e estabilidade em relação à oxidação dos lipídeos (MANDELL et al., 1997; MORRISSEY et al., 1998).

3.2 COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA CARNE

O termo lipídeos é usado normalmente para indicar, de forma pouco exata, uma ampla variedade de produtos orgânicos que possuem a característica comum de não serem solúveis em água e sim em solventes apolares (hexano, éter, clorofórmio). Os lipídeos são formados por diversos compostos químicos, bastante diferentes entre si, sendo os triglicerídeos (combinação de três moléculas de ácidos graxos e uma molécula de glicerol) os compostos presentes em maior quantidade nos alimentos (SOUZA, 2006; OLIVEIRA, 2012). Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos, contendo um número par de carbonos, podendo ou não ter insaturações (MARZOCCO; TORRES, 2010).

Quanto aos tipos, os ácidos graxos podem ser classificados em: saturados (ácidos graxos sem dupla ligação em suas cadeias) e insaturados (ácidos graxos com uma ou mais ligações duplas em suas cadeias), sendo estes divididos em: monoinsaturados (com uma insaturação ou dupla ligação) e, di-insaturados e poli-insaturados (com duas ou mais insaturações, respectivamente). Os ácidos graxos com mais de uma ligação se subdividem em ômega 6 ($\omega 6$) e ômega 3 ($\omega 3$), e são considerados essenciais devido à incapacidade do organismo de sintetizá-los, motivo pelo qual devem ser incorporados na dieta. O interessante em ruminantes é que há grande diferença na concentração de ácidos graxos ingeridos (dieta alimentar), os encontrados no conteúdo digestivo (organismo animal) e o que é depositado na gordura intramuscular (carne) (LOBATO; FREITAS, 2006).

3.3 ÁCIDOS GRAXOS DE INTERESSE EM CARNE

Como a maioria das características de interesse econômico na produção animal, por exemplo o ganho de peso médio diário, peso à desmama, peso ao nascimento e etc., a composição de ácidos graxos é influenciada por fatores ambientais e genéticos. Estudos têm comprovado grandes mudanças na composição de ácidos graxos por alterações provocadas nas estratégias de alimentação, principalmente em animais monogástricos (DEMEYER et al., 1999; JAKOBSEN, 1999) e em ruminantes (WOOD et al., 2003). Os fatores genéticos que afetam a composição dos ácidos graxos em bovinos tem sido menos investigados, apesar de vários estudos relatarem diferenças entre raças para a composição de ácidos graxos (GILLIS

et al., 1973; MILLS et al. 1992; HUERTA-LEIDENZ et al., 1993, 1996; MALAU-ADULI et al., 1997, 1998; PITCHFORD et al., 2002). Apesar das diferenças existentes entre raças para a composição de ácidos graxos, as mesmas são muitas vezes confundidas por diferenças na deposição de gordura ou diferenças em precocidade entre as raças (SMET et al., 2004).

Brugiapaglia et al. (2014) realizaram estudo com animais da raça Piemontese, Limousin e Friesian, e identificaram diferenças no perfil de ácidos graxos no músculo *Longissimus* entre as diferentes raças. A grande diferença ocorreu para os ácidos graxos oléico e linoléico, entretanto, não foi observada diferença para os ácidos graxos saturados. De modo geral, a raça Piemontese apresentou os maiores valores para os ácidos graxos poli-insaturados, fator atribuído pelos autores à baixa quantidade de lipídeos totais nos músculo, possivelmente associada à musculatura dupla, característica da raça. De forma semelhante, Fernandes et al. (2014) observaram diferenças entre os perfis lipídicos do músculo *Longissimus* de animais Nelore e Canchim terminados em confinamento.

Dentre os diversos ácidos graxos encontrados em produtos de origem animal, destaca-se o ácido linoléico conjugado (CLA). A concentração do CLA na carne bovina e de outros ruminantes é superior quando comparada a outros animais. Isto ocorre porque este ácido graxo é um intermediário da biohidrogenação ruminal do ácido linoléico. Dessa maneira, caso haja escape ruminal, há a absorção do ácido graxo pelo epitélio intestinal e deposição na gordura animal (OLIVEIRA et al., 2008).

As principais fontes de ácido linoléico conjugado da dieta humana são o leite e seus derivados e a carne de ruminantes. Dependendo da espécie animal, do tecido e da dieta, o conteúdo de CLA na carne de ruminantes varia entre 1,7 e 10,8 mg/g de lipídio (FRENCH et al., 2000; MIR et al., 2000; OLIVEIRA, 2012).

O grande interesse pelo CLA é justificado por sua ação como potente anticarcinogênico natural e agente repartidor de nutrientes, capaz de alterar a deposição de gordura e músculo. Entre os isômeros do CLA, o C18:2 Cis-9 trans-11 é o que predomina na gordura dos ruminantes e apresenta maior potencial anticarcinogênico (PARODI, 1999). Fernandes et al. (2014) observaram maior nível de CLA na carne de Nelore quando compara à de Canchim, e atribuíram este fato a uma maior concentração da enzima Delta9-dessaturase na carne destes animais.

Com relação ao ácido graxo palmítico, ele é um dos mais indesejáveis no perfil de ácidos graxos da carne. Isto ocorre, pois ele, assim como o ácido graxo mirístico, é capaz de aumentar a síntese de colesterol e favorecer o acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade, o que representa um fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares

(MOLONEY et al., 2001), sendo então considerados hipercolesterolêmicos. Entretanto, o ácido palmítico, junto ao mirístico e láurico, também prejudiciais à saúde, representam menos de 30% da gordura bovina (BERCHIELLI et al., 2011). Já, o ácido esteárico (C18:0) é uma exceção porque ele é transformado rapidamente em ácido oleico (ácidos graxos monoinsaturados), não exercendo efeito de elevação do colesterol (COSTA, 2011).

Do mesmo modo, Dhanda et al. (2003) verificaram que animais mais velhos apresentaram menores concentrações de ácido palmítico (22%), em comparação com os mais novos (35%). Normalmente, o aumento da maturidade fisiológica dos ruminantes promove uma redução dos níveis de ácidos graxos saturados no músculo (DÍAZ et al., 2002), fato explicado pelo aumento na atividade da enzima delta-desaturase, que promove uma maior produção de ácido oléico em detrimento do ácido esteárico (COSTA, 2011).

3.4 RNAseq

A expressão gênica refere-se ao processo no qual as informações de um gene são utilizadas na produção de proteínas ou como modulador da ação de outros genes. Fatores ambientais como nutrição, medicamentos, estresse e doenças determinam mudanças nos padrões de expressão gênica (LÔBO et al., 2010).

Avaliações qualitativas, entre elas perfil de ácidos graxos, podem demandar tempo e investimento, além de serem difíceis de serem mensuradas, devido à necessidade de realização de um teste de progênie, quando avaliadas a campo. Portanto, há a escassez de estudos com o objetivo de identificar genes ou alelos diretamente relacionados com o perfil de ácidos graxos, de modo a encontrar variantes gênicas favoráveis à manifestação da característica desejada (ALMEIDA, 2007).

O conhecimento do padrão de expressão de genes em tecidos ou órgãos específicos, com funções importantes para o metabolismo animal, pode auxiliar na identificação de regiões do genoma que influenciam as características de importância econômica em bovinos. A presença de polimorfismos e/ou QTL pode contribuir para a expressão diferencial de um gene ou na alteração da funcionalidade da proteína que está sendo codificada (SAN CRISTOBAL et al., 2006).

Métodos tradicionais de análise de expressão gênica, como RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) ou análise diferencial, necessitam de uma pré-seleção de genes

únicos. Estes métodos caracterizam uma importante fonte de análise, porém ignoram alguns processos biológicos importantes, como rotas e processos metabólicos, pelo fato de serem restritos à análise de determinados genes ou a um grupo pequeno de genes previamente selecionados. O recente desenvolvimento do sequenciamento de nova geração e o uso de análises envolvendo todo o transcriptoma (RNAseq) permitiu a quantificação de todos os genes expressos em uma amostra. Estes métodos possuem o potencial de se sobrepor às dificuldades encontradas em análises de microarranjos, por exemplo (ROY et al., 2011).

Há pouco mais de uma década, houve o início do desenvolvimento de experimentos utilizando técnica de sequenciamento genético, mais especificamente com o uso de microarranjos de DNA. Neste tipo de técnica, foi possível identificar simultaneamente milhares de característica em um experimento. Mais recentemente, um crescente número de estudos tem demonstrado o potencial do sequenciamento total do cDNA, de modo a observar todo o transcriptoma. Estes estudos demonstraram as vantagens desta abordagem: em um único experimento com RNAseq é possível obter não somente uma medida acurada e quantitativa (como nos experimentos de microarranjo), mas também descobrir novas regiões transcritas de forma imparcial (WILHELM; LANDRY, 2009).

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos em uma célula e sua quantidade, para um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica. Compreender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os componentes moleculares das células e tecidos. Recentemente, o desenvolvimento de novos métodos de sequenciamento do DNA forneceu um novo método para mapeamento e quantificação de transcriptomas. Esse método, denominado RNAseq, tem claras vantagens sobre as abordagens existentes. A técnica de RNAseq é o primeiro método baseado em sequenciamento que permite que todo o transcriptoma seja escaneado com qualidade (WANG et al., 2009).

A técnica de RNAseq é livre de muitas limitações das tecnologias apresentadas anteriormente, como por exemplo a dependência de um conhecimento prévio do organismo, como necessário para as técnicas de microarranjo e PCR (OSHLACK et al., 2010), pois permite descobrir novos genes e transcritos e mensurar a expressão destes transcritos, em uma única amostra (TRAPNELL et al., 2012).

Para quantificar os níveis de transcritos nas análises de RNAseq, foi proposto por Mortazavi et al. (2008) o conceito de *reads* (fragmentos curtos de sequência) por kilobase de éxon por milhões de *reads* (RPKM). O RPKM mede a densidade de leitura em uma região gênica de interesse através da normalização da contagem dos *reads* pela soma de

comprimento de cada éxon (ou do gene), e do total de *reads* na medição. Em sequenciamentos *paired end*, cuja leitura é dada pelas duas extremidades do fragmento, a medida passa a ser considerada o FPKM – fragmentos por kilobase de éxon por milhões de fragmentos mapeados (WANG et al., 2010).

Entretanto, pode ocorrer de genes que são expressos em baixos níveis serão representados por poucos *reads*, e podem ser somente parcialmente coberto durante o sequenciamento (ROBERTS et al., 2011).

Desta forma, esta tecnologia apresenta vantagens distintas sobre a técnica de microarranjos, incluindo uma detecção sensível de todos os genes expressos, sem que haja a necessidade de gerar uma matriz com base na sequência conhecida (MCCABE et al., 2012). Ainda, experimentos que utilizam o RNAseq, apresentam não somente a vantagem de capturar todo o transcriptoma, mas podem substituir completamente a técnica de microarranjos, visto que o RNAseq possibilita a obtenção de muito mais dados e medições de expressão, com um custo menor (MARIONI et al., 2008).

Grande parte dos experimentos envolvendo RNAseq, de forma geral, é realizado a partir da extração de RNA de uma amostra, sua conversão em cDNA e posterior sequenciamento em plataforma, como a Illumina GA/HiSeq, SOLiD ou Roche 454 (SHENDURE; JI, 2008). Este processo gera milhões de *reads* com tamanho entre 25 e 300pb, lidos a partir de uma das pontas do fragmento de cDNA. Uma variação comum, para possibilitar uma maior cobertura é a leitura a partir das duas extremidades, conhecida como *paired-end* (OSHLACK et al., 2010). Independentemente das diferenças tecnológicas das três plataformas, o fluxo de trabalho para análise e sequenciamento das bibliotecas geradas é muito similar. A preparação da biblioteca é um ponto chave da análise de RNAseq, pois ela determinará quão parecida a sequência de cDNA é da população original de RNA (MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

Um dos passos críticos desta análise é o mapeamento dos *reads* provenientes do sequenciamento de nova geração (SNG) a um transcriptoma de referência. Entretanto, como as bases de transcriptoma ainda são incompletas, mesmo para espécies de referência, como humanos e ratos, as análises de RNAseq são forçadas a ser mapeadas para um genoma de referência, o que possibilita duas vantagens: (i) identificação de novos transcritos; (ii) estimativa da abundância desses transcritos a partir da profundidade e cobertura do mapeamento (TRAPNELL et al., 2009).

Experimentos de RNAseq devem ser analisados por meio de algoritmos robustos e estatisticamente eficientes. Normalmente as técnicas utilizadas se enquadram em três

categorias: (i) ferramentas para alinhamento dos *reads*; (ii) ferramentas para padronização e identificação das sequências geradas; e (iii) ferramentas para quantificação dos genes (TRAPNELL et al., 2012). Dentre estas diferentes ferramentas, destacam-se:

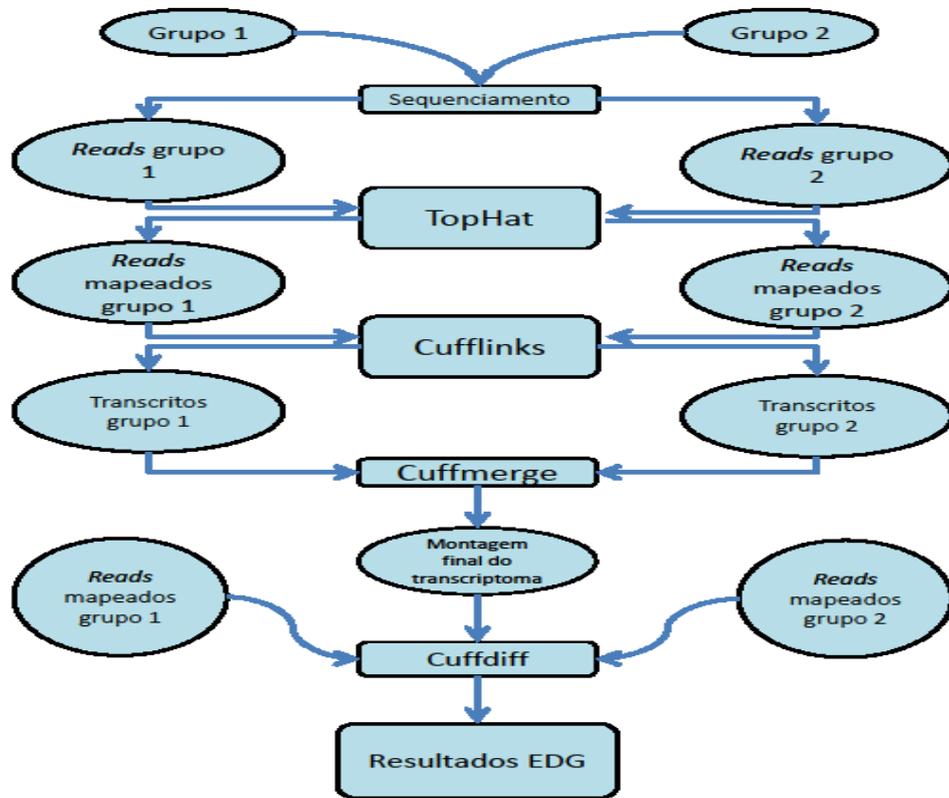
- I. TopHat: responsável por alinhar os reads ao genoma e descobrir locais de junções no transcriptoma;
- II. Cufflinks: utiliza o mapa gerado pelo TopHat para confrontar com o genoma e montar e padronizar as sequências em um transcriptoma;
- III. Cuffdiff: parte do pacote Cufflinks, utiliza os reads alinhados para duas ou mais características e gera um relatório de genes e transcritos que são diferencialmente expressos nos grupos de interesse, através de uma rigorosa análise estatística.

Ainda, como parte do pacote Cufflinks, é possível utilizar outras ferramentas, como:

- Cuffcompare: compara os transcritos a uma base sólida e conhecida;
- Cuffmerge: une/mescla dois ou mais conjuntos de transcritos.

Um esquema de como as amostras podem ser analisadas pode ser observado na figura 1.

Figura 1 - Passos para sequenciamento e comparação entre amostras



Fonte: Adaptado de Trapnell et al. (2012).

3.5 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES

O principal objetivo da expressão diferencial de genes (EDG) é aferir quantitativamente a diferença nos níveis de transcritos entre dois ou mais grupos distintos, de forma a mensurar tanto a contagem de cada transcrito como as variâncias que estão associadas a essas diferenças.

Comparar o transcriptoma de dois diferentes grupos de amostras e identificar a EDG são funções básicas, mas ao mesmo tempo importantes, para o estudo de expressão gênica (WANG et al., 2013). Este tipo de comparação foi amplamente utilizada para dados gerados a partir de análises de microarranjos, porém a análise de RNAseq possibilita que seja feita a

mensuração da diferença de cada gene, demonstrando mais uma vantagem desta técnica (OSHLACK et al., 2010; TRAPNELL et al., 2010).

Ainda, a baixa sensibilidade das plataformas de microarranjos em detectarem a expressão diferencial de determinados genes que são metabolicamente importante, foi destacada no estudo de McCarthy et al. (2010), que observaram mudanças na expressão gênica hepática de vacas em balanço de energia negativo através da técnica de qPCR, mas não observaram essa diferença na expressão utilizando a técnica de microarranjos (MCCABE et al., 2012).

Resultados da análise de expressão diferencial são essenciais para se obter conclusões para diferentes tipos de estudo, identificando diferenças entre tecidos, desenvolvimento de mudanças adaptativas e predição de características. Para obter uma análise de EDG efetiva, é importante obter estimativas acuradas da expressão de cada amostra, além de ser importante contabilizar todas as possíveis fontes de variações, técnicas e biológicas (GLAUS et al., 2012).

Em um estudo sobre a EDG, McCabe et al. (2012) utilizaram vacas em balanço energético negativo, divididas em 2 grupos (balanço energético negativo brando e severo) e identificaram que a maioria das mudanças no nível de transcrição foi relacionada ao metabolismo da gordura no fígado das vacas, quando comparados os dois grupos.

As ferramentas da bioinformática para analisar dados de RNAseq ainda são escassas, se comparadas às de microarranjo. Desta forma, há ainda uma dificuldade em se identificar a EDG entre dois grupos de animais fisiologicamente diferentes, como por exemplo, nos bovinos (MCCABE et al., 2012).

3.6 GENES QUE AFETAM O PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NA CARNE

Na literatura existem poucos trabalhos que associam diferentes padrões de expressão gênica com o perfil de ácidos graxos da carne ou outros órgãos ou tecidos. Neste sentido, Gerbens et al. (1999) identificaram associações entre a expressão de genes *A-FABP* e *H-FABP (FABP3)*, nos adipócitos e no coração, respectivamente, e o perfil de ácidos graxos e gordura muscular em suínos Duroc, visto que estes genes são componentes da proteína responsável pelo transporte de ácidos graxos. De acordo com Barber et al. (2000), a deposição de gordura monoinsaturada é mediada pela expressão do gene da stearyl-CoA desaturase. A

manipulação da expressão desse gene pode resultar na alteração da composição dos ácidos graxos na carne.

Em estudo realizado, Bakhtiarizadeh et al. (2013) identificaram genes com ação específica no tecido adiposo de três espécies de mamíferos: humana, suínos e bovinos, com posterior confirmação dos resultados em ovinos. Concluiu-se que sete genes (*ADIPOQ*, *FABP4*, *LP*, *DGAT2*, *FASN*, *SCD* e *CIDEA*) são comuns às três espécies pesquisadas. Ainda, os autores observaram que os 10 genes mais expressos no tecido adiposo de bovinos foram: *SCD*, *THRSP*, *ADIPOQ*, *FABP4*, *DGAT2*, *FGF2*, *CAV2*, *C4orf32*, *CIDEA* e *ACER3*.

Lee et al. (2008) relataram diferença para os genes *FABP4*, *SCD*, *PPAR γ* , Titin e Nebulin entre dois grupos de novilhas da raça Hanwoo (raça de gado nativa coreana) selecionados com alta e baixa marmorização no músculo *Longissimus*, sendo os genes *SCD* e *PPAR γ* mais expressos no grupo com baixo marmoreio, sendo o *SCD* relacionado ao perfil de ácidos graxos da carne e à conversão de ácido esteárico em ácido oléico e o *PPAR γ* relacionado como um fator para a adipogênese e como tendo um papel essencial no desencadeamento da síntese de ácidos graxos. Já o *FABP4*, que teve maior expressão no grupo com carne mais marmorizada, foi relacionado à hidrólise de lipídeos, e foi fortemente correlacionado à marmorização. De modo semelhante, Lim et al. (2014) observaram correlação entre os genes *TMEM60* e o *DPYP* com a marmorização do músculo *Longissimus* de animais da raça Wagyu. Ainda, foi detectada maior presença dos genes *PPAR γ* e *CEBP α* em animais do grupo com elevada marmorização.

Por outro lado, Vaiciunas et al. (2008) trabalharam com genes candidatos e relataram uma correlação entre a precocidade sexual de novilhas Nelore e a concentração de leptina no tecido adiposo das mesmas. A partir da comparação da expressão gênica entre a gordura intramuscular e o tecido adiposo externo de novilhas, Sheng et al. (2014), encontraram 323 genes que foram diferencialmente expressos entre os dois grupos. Entre estes genes, destacaram-se *ALOX15* e *CIQTNF3*, correlacionados com a presença de gordura intramuscular.

A máxima capacidade de lipogênese de um tecido é determinada pela concentração de enzimas lipogênicas contidas neste tecido. No caso da ácidos graxos sintetase (*FAS* – Fatty Acid Synthetase), assim como em outras enzimas, a quantidade de proteína da *FAS* é regulada pela taxa de síntese, que é determinada pelo nível de expressão gênica de seu RNAm no tecido (CLARKE, 1993). De acordo com Wang et al. (2008), a expressão de alguns genes, como *CEBPB* e *PPAR γ* , está relacionada à deposição de gordura intramuscular podendo, desta forma, influenciar o perfil de ácidos graxos da carne.

Smith et al. (2009) correlacionaram o aumento da expressão gênica da stearoyl-CoA dessaturase com o aumento da deposição de ácidos graxos monoinsaturados em animais da raça Wagyu. Também em animais da raça Wagyu, Lehnert et al. (2007) relataram maior expressão da proteína *FABP5*, correlacionada ao transporte de ácidos graxos. Genes correlacionados com a expressão de delta 9 desaturase, fator de transcrição *CCAT (C/EBP δ , CRP3, CELF, NF-IL6 β)*, stearoyl-CoA dessaturase, acetyl-CoA acyltransferase, *IGFBP-4* e *PPAR γ* possuem funções relativamente conhecidas sobre o perfil de ácidos graxos, entretanto, novas regiões podem ser estudadas a fim de encontrar diferentes genes que possam estar associadas com o perfil de ácidos graxos.

Esteve-Codina et al. (2004), utilizando a técnica de RNA-seq, encontraram diferenças do padrão de expressão de genes para composição lipídica em espermatozoides suínos. Com relação à gordura intramuscular em suínos, posteriormente, Corominas et al. (2013), avaliaram 6 suínos, com diferentes composições de ácidos graxos (divididos em dois grupos: alto e baixo nível de ácidos graxos) e observaram 396 genes diferencialmente expressos entre os grupos, sendo 28 deles correlacionados ao metabolismo de ácidos graxos. De forma similar, Ramayo-Caldas et al. (2012) observaram 9 genes associados com a composição da gordura intramuscular de suínos, a partir de análise de GWAS (Genome-wide association).

A partir de um banco de dados é possível selecionar genes candidatos que estejam envolvidos na síntese e/ou metabolismo dos ácidos graxos (Quadro 1) com valores de $p < 0,05$ e razões de expressão acima de duas vezes.

Quadro 1 - Genes candidatos
(Continua)

Regiões Candidatas		Referências	Ácido Graxo relacionado:
QTL ID	Posição		
QTL #4855	Cromossomo 2, posição 5.7cM	Alexander, L. J. et al., 2007	Ácido Linoléico Conjugado (C18:2 cis-9 trans-11)
QTL#4865	Cromossomo 7, posição 123.7cM	Alexander, L. J. et al., 2007	Ácido Linoléico Conjugado (C18:2 cis-9 trans-11)
QTL#4871	Cromossomo 7, posição 123.7cM	Alexander, L. J. et al., 2007	Ácido Linoléico Conjugado (C18:2 cis-9 trans-11)
QTL#12235	Cromossomo 8, posição 10.6cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Linoléico
QTL#1557	Cromossomo 4, posição 16.3cM	Ashwell M. S. et al., 2005	Ácido Linolênico

(Continuação)

Regiões Candidatas		Referências	Ácido Graxo relacionado:
QTL ID	Posição		
QTL#10704	Cromossomo 4, posição 16cM	McClure M. C.. et al., 2010	Ácido Linolênico
QTL#10714	Cromossomo 4, posição 81cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Linolênico
QTL#7065	Cromossomo 4, posição 38.3cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Linolênico
QTL#10713	Cromossomo 4, posição 70cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Linolênico
QTL#10721	Cromossomo 4, posição 113cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Linolênico
QTL#15724	Cromossomo 4, posição 72.31cM	Imumorin I. G. et al., 2011	Ácido Linolênico
QTL#12200	Cromossomo 4, posição 85cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#12171	Cromossomo 13, posição 84cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#4839	Cromossomo 18, posição 8.6cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Palmítico
QTL#15735	Cromossomo 18, posição 83.4cM	Imumorin I. G. et al., 2011	Ácido Palmítico
QTL#4839	Cromossomo 18, posição 44.2cM	Nkrumah, J. D. et al., 2007	Ácido Palmítico
QTL#11065	Cromossomo 18, posição 56cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11069	Cromossomo 18, posição 82cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#1336	Cromossomo 18, posição 23cM	Casas E. et al., 2003	Ácido Palmítico
QTL#11058	Cromossomo 18, posição 8cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#4846	Cromossomo 22, posição 87.6cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Palmítico
QTL#4845	Cromossomo 22, posição 52.2cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Palmítico
QTL#4844	Cromossomo 22, posição 33.5cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Palmítico
QTL#7105	Cromossomo 22, posição 52.3cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Palmítico
QTL#11152	Cromossomo 22, posição 52.3cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11154	Cromossomo 22, posição 85cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#7104	Cromossomo 22, posição 34.6cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Palmítico

(Continuação)

Regiões Candidatas		Referências	Ácido Graxo relacionado:
QTL ID	Posição		
QTL#11138	Cromossomo 22, posição 9cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11146	Cromossomo 22, posição 47cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#12178	Cromossomo 23, posição 44cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11175	Cromossomo 23, posição 59cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11132	Cromossomo 23, posição 44cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11160	Cromossomo 23, posição 5cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11179	Cromossomo 23, posição 74cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#11173	Cromossomo 23, posição 45cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Palmítico
QTL#12202	Cromossomo 11, posição 49cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Esteárico
QTL#1396	Cromossomo 19, posição 18cM	Taylor J.F. et al., 1998	Ácido Esteárico
QTL#12175	Cromossomo 19, posição 70cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Esteárico
QTL#12183	Cromossomo 26, posição 27cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Esteárico
QTL#4819	Cromossomo 1, posição 115.7cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2008	Ácido Oléico
QTL#12199	Cromossomo 1, posição 27cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#1348	Cromossomo 1, posição 50cM	Casas, E. et al., 2003	Ácido Oléico
QTL#10653	Cromossomo 1, posição 151cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#10649	Cromossomo 1, posição 138cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#1317	Cromossomo 1, posição 0.945cM	Kim J. J. et al., 2003	Ácido Oléico
QTL#15717	Cromossomo 1, posição 50cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#12205	Cromossomo 13, posição 88cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#10943	Cromossomo 13, posição 50cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#10936	Cromossomo 13, posição 25cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico

(Conclusão)

Regiões Candidatas		Referências	Ácido Graxo relacionado:
QTL ID	Posição		
QTL#11044	Cromossomo 17, posição 44cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#11052	Cromossomo 17, posição 92cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#7105	Cromossomo 22, posição 52.3cM	Gutiérrez-Gil B. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#11152	Cromossomo 22, posição 83cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#12179	Cromossomo 26, posição 18cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#12182	Cromossomo 26, posição 26cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#12210	Cromossomo 26, posição 33cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#12211	Cromossomo 27, posição 29cM	Morris C. A. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#11250	Cromossomo 27, posição 33cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico
QTL#11261	Cromossomo 27, posição 64cM	McClure M. C. et al., 2010	Ácido Oléico

Fonte: Animal QTLdb (2012).

CAPÍTULO II

4 INTRODUÇÃO

Por ser uma atividade de destaque na economia brasileira, a pecuária de corte necessita de constantes evoluções, em todas as etapas, desde a criação dos animais até a obtenção do produto final: carne. Desta maneira, o aprimoramento genético do rebanho, em busca de características economicamente desejáveis, torna-se essencial.

Dentre as características da carne que são de fundamental importância para o produto final, destaca-se o perfil de ácidos graxos de sua gordura, visto que pode influenciar positiva ou negativamente a saúde do consumidor. Entretanto, para a realização de uma seleção genética com base no desempenho das progênies, são necessários vários anos.

Como muitas outras características de interesse econômico, tais como ganho de peso médio diário, peso ao desmame e peso ao sobreano, a deposição de gordura nos animais pode ser explicada a partir da interação entre os fatores genéticos e os ambientais. Desta forma, o aumento do conhecimento sobre o mecanismo de ação dos genes ligados a características econômicas permite a complementação dos métodos quantitativos de melhoramento (LEDUR, 2001). Para isto, destacam-se tecnologias que permitem o aprimoramento do rebanho em reduzido espaço de tempo, através da identificação de genes de interesse.

O conhecimento do padrão de expressão de genes em tecidos ou órgãos específicos, com funções importantes para o metabolismo animal, pode auxiliar na identificação de regiões do genoma que influenciam as características de importância econômica em bovinos.

A técnica de RNAseq permite a identificação de genes que podem estar relacionados à diversas características de interesse, entre elas o perfil de ácidos graxos. Esta técnica é uma abordagem desenvolvida recentemente que possibilita a observação de todo o transcriptoma por meio de tecnologias de sequenciamento (WANG et al., 2009), permitindo realizar o sequenciamento e a quantificação dos transcritos, independente do seu tamanho, com uma grande resolução.

Objetivou-se com este estudo avaliar os padrões de expressão dos genes diferencialmente expressos relacionados ao perfil de ácidos graxos da carne de bovinos Nelore confinados, por meio da verificação dos padrões de expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na síntese dos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1 cis-9), linoléico (C18:2 cis-9 cis-12), CLA (C18:2 cis-9 trans-11) e linolênico (C18:3) em bovinos da raça Nelore confinados.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E FORMAÇÃO DOS LOTES E PROCEDIMENTO DE ABATE

Foram utilizados 48 bovinos, Nelore, machos inteiros, pertencente ao mesmo grupo contemporâneo, filhos de 7 diferentes touros com diferença de idade de no máximo 60 dias, com idade média de 24 meses e peso vivo médio inicial de 360 kg, oriundos da Fazenda Capivara, participante do programa de melhoramento genético Nelore Qualitas.

Os animais foram criados em sistema de pastagem, com lotação variando de 1,2 a 1,6 unidade animal/ hectare (UA/ha), utilizando forrageiras do gênero *Brachiaria sp* e *Panicum sp*, com sal mineral à vontade. Após o sobreano, os animais que não foram selecionados para reprodutores, foram destinados ao abate e permaneceram no confinamento por um período de no mínimo 90 dias. No confinamento, a relação volumoso:concentrado foi de 50:50. Foi utilizado como volumoso silagem de milho. Como concentrado energético foi utilizado grãos de milho e/ou sorgo, e grãos de soja, farelo de soja, ou girassol como concentrado protéico. O efeito da dieta ou manejo no confinamento foi ajustado no modelo, uma vez que este efeito foi considerado na formação dos grupos de contemporâneos. O critério utilizado nas fazendas para o abate dos animais foi o peso vivo médio final de 550 kg.

Os animais foram abatidos de acordo com os padrões do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, em frigorífico comercial. Os animais apresentaram peso de carcaça quente médio de 278 kg e espessura de gordura subcutânea média, avaliada com auxílio de paquímetro, de 3,75 mm no músculo *Longissimus*.

Imediatamente após o abate, foi coletada uma amostra de tecido muscular (m. *Longissimus*) de cada animal (em média 50 gramas), da qual foi extraído o RNA utilizado na avaliação da expressão gênica. Estas amostras foram acondicionadas a -80°C para posterior extração do RNA total dos tecidos.

Durante a desossa foi retirada uma amostra de 2,5 cm de espessura do músculo *Longissimus* na região da 12^a e 13^a costelas, de cada meia carcaça esquerda, para a determinação do perfil de ácidos graxos e foi retirada uma amostra adicional do mesmo músculo para avaliação dos lipídeos totais.

5.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

O perfil de ácidos graxos da carne foi determinado pelo método de extração de Folch et al. (1957). Os lipídeos foram extraídos por homogeneização da amostra com uma solução de clorofórmio e metanol 2:1. Em seguida os lipídeos foram isolados após a adição de solução de NaCl a 1,5%. Foi utilizada uma sub amostra de 2,5 g do centro do músculo *Longissimus*, homogeneizada e adicionada em um tubo Falcon de 50 mL.

A gordura separada foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997). Foi utilizado um padrão interno C19:0 a fim de corrigir as perdas durante o processo de metilação dos ácidos graxos. Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (CG-2010 Plus - Shimadzu, auto injetor AOC 20i), usando coluna capilar SP-2560 (100 m × 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 70 °C, com aquecimento progressivo (13° C/minuto) até chegar a 175 °C, mantendo por 27 minutos. Em seguida, um novo aumento de 4 °C/minuto foi iniciado até 215 °C, mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm³/s. Durante o processo de identificação foram utilizados os seguintes padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (F.A.M.E mix Sigma®), C8-C28 (F.A.M.E mix Sigma®), ácido vacênico C18:1 trans-11 (V038-1G, Sigma®), C18 CLA:2 trans-10, cis-12 (UC-61M 100mg), CLA e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA ®) e ácido tricosanóico (Sigma®) para identificação dos ácidos graxos que foram formados durante a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados. Foram quantificados os ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1 cis-9), linoléico (C18:2 cis-9 cis-12), CLA (C18:2 cis-9 trans-11) e linolênico (C18:3).

5.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

A quantificação de lipídeos totais seguiu a metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959). Foram utilizadas amostras de carne crua e moída e com pesos conhecidos aproximados de 3,0g. Estas amostras foram transferidas para erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada.

Após homogenização das amostras, com bastão de vidro para que as mesmas obtenham o maior contato possível com os reagentes utilizados, os erlenmeyers foram colocados em mesa agitadora horizontal por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução aquosa de sulfato de sódio 1,5%. As amostras foram agitadas por mais dois minutos e transferidas para tubos falcon de 50 mL e centrifugados a 1000Xg por dois minutos em temperatura ambiente (RT).

Após a centrifugação foi descartada a camada sobrenadante e o restante filtrado em papel filtro, com o intuito de separar os fragmentos de amostra de carne da solução contendo os lipídeos que foram extraídos dessas amostras. As amostras foram então filtradas em provetas graduadas de 25 mL e tiveram seus valores anotados, pois o volume de lipídeos extraído é utilizado nos cálculos da quantidade de lipídeos totais. Foram medidos 5 mL do filtrado e transferido para beakers de 50 mL previamente pesados e secos em estufa e esfriados em dessecador por pelo menos 24hs para serem pesados em seguida. Cada becker contendo uma amostra foi colocado em estufa a 110°C até evaporação total do solvente, e depois foi resfriado em dessecador (O/N) e pesado. As diferenças do peso inicial do becker (sem amostra) e peso final (com amostra e após evaporação do solvente), determinam a quantidade percentual de lipídeos nas amostras.

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração do RNA total das 48 amostras coletadas foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, SP. Para isso, foram utilizadas, em média, 50 mg de tecido muscular previamente estocado em RNA holder (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e o kit para extração de RNA RNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), como descrito abaixo:

As amostras foram retiradas do freezer a -80 °C, acondicionadas em gelo, pesadas, e então foi realizada a ruptura e homogeneização do tecido com 1 ml da solução Qiazol Lysis Reagent no homogenizador de tecidos ultraturrax T50 (IKA). Cada amostra foi homogeneizada três vezes durante 30 segundos e nos intervalos, também de 30 segundos, foram mantidas no gelo. Após esta etapa foi adicionado 200µl de clorofórmio e as amostras

permaneceram durante 15 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C.

Formaram-se então três fases, sendo a superior, incolor e aquosa, na qual estava contido o RNA, que foi transferida para um novo tubo. Foram adicionados 600µl de etanol 70% e a amostra foi homogeneizada em vortex. Em seguida, esta solução foi transferida a uma coluna e centrifugada a 8000 x g por 15 segundos para a eliminação dos resíduos. Foram adicionados à membrana, o mix contendo 10 µl de DNase I (1500 kunitz units) e 70 µl de tampão RDD, fornecidos pelo Kit RNase-Free DNase set (Qiagen, Valencia, CA, EUA) e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 350 µl de tampão RW1 e as amostras foram centrifugadas novamente a 8000 x g por 15 segundos para eliminação de resíduos. A coluna foi lavada com 500 µl do tampão RPE por duas vezes e o RNA ligado à coluna foi eluído em 30 µl de água livre de RNase por centrifugação a 8000 x g, durante um minuto. As amostras foram novamente armazenadas em freezer a -80°C.

5.5 VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E INTEGRIDADE DO RNA EXTRAÍDO

A determinação da concentração e pureza do RNA foi realizada com leitura da absorbância no espectrofotômetro NanoDrop 1000 Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, EUA, 2007) nos comprimentos de onda de 260nm, 280nm e 230nm. Foi utilizado o valor de absorbância a 260 nm para a determinação da concentração do RNA (ng/µl), as razões A260nm/A280nm para avaliar a contaminação por proteínas e A260nm/230nm para avaliar as contaminações por outros compostos, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol. Os valores de referência para estas razões são de 1,8 a 2 e maior ou igual a 2, respectivamente.

A qualidade do RNA total foi verificada com auxílio do aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EUA, 2009) e do kit Agilent RNA 6000 Nano Chips (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). Além disso, a concentração do RNA extraído foi medida por meio de Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 2010). Resultados iguais ou superiores a 7 foram considerados satisfatórios. Foi confirmada a ausência de contaminação por DNA genômico nas amostras por meio do aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, 2010) e o kit de quantificação de DNA, Qubit

dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Além disso, utilizou-se o mesmo aparelho e o kit Qubit RNA Assay, o RNA total foi quantificado e então, uma fração deste a uma concentração de 2µg foi retirada para o sequenciamento.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (RNASEQ)

A partir do RNA total extraído de cada uma das 48 amostras selecionadas, foi obtido o RNA mensageiro, o qual foi utilizado na construção das bibliotecas de cDNA com adaptadores ligados às extremidades. Cada molécula foi sequenciada em ambas as extremidades (sequenciamento paired-end) em fragmentos de 100 pares de bases. Para o sequenciamento das 48 bibliotecas de cDNA foi necessário a utilização de uma lâmina (flow cell) com oito canaletas (lanes), sendo que em cada uma das primeiras 6 canaletas foram aplicadas 7 amostras e na sétima canaleta foram aplicadas 6 amostras com etiquetas (tags) diferentes e a oitava canaleta foi utilizada para a aplicação da amostra controle (PHYX).

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA

A técnica (RNA-seq) permite avaliar a expressão gênica de milhares de regiões do genoma, sem a necessidade de conhecer a priori, ou na realidade de definir as regiões ou genes que será estudada a expressão gênica. No entanto, os dados foram compilados baseados no QTL Data Base, informando, por exemplo, as características, bem como os trabalhos e a posição de possíveis QTL associados com o perfil de ácidos graxos em carne. A partir da tabela 1, citada anteriormente, foi avaliada a expressão gênica nessas regiões (regiões candidatas), por meio do contraste dos dois grupos de animais (baixa e alta concentração para cada ácido graxo). Além disto, novas regiões foram investigadas, pois a técnica de RNA-seq, permite avaliar a expressão em milhares de regiões, e desta forma, rastrear novos genes associados à composição de ácidos graxos em carne bovina.

Para cada ácido graxo os 48 animais foram divididos em dois grupos: alta e baixa concentração, por meio do ranqueamento da concentração de cada amostra. A partir da

formação dos grupos, foram utilizados os 10 animais mais extremos para baixa e para alta concentrações, compondo 10 réplicas biológicas diferentes para cada ácido graxo a serem utilizadas em conjunto com os dados de expressão gênica para determinação da expressão diferencial de genes. Os dados de expressão gênica obtidos por sequenciamento do transcriptoma foram então analisados segundo metodologia descrita por Mortazavi et al. (2008).

5.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a identificação de genes diferencialmente expressos foi utilizado o pacote Cufflinks (versão 2.1.1) na plataforma *iPlant Collaborative* (GOFF et al., 2011), para identificar os genes ou regiões do genoma diferencialmente expressos entre os dois grupos (baixa e alta quantidade de cada ácido graxo proposto) (TRAPNELL et al., 2012). O pacote Cufflinks monta os transcritos, estima sua abundância e testa as amostras de RNAseq para expressão diferencial e regulação, baseado em quantos *reads* cada transcrito possui, levando em consideração os protocolos de preparação das bibliotecas.

Na plataforma alinhou-se os *reads* ao genoma bovino (UMD 3.1) com auxílio do TopHat (versão 2.1.1), procedendo por uma limpeza dos dados, quando necessário, pela extensão FASTQ (versão 0.10.1). Após obter um mapeamento gerado pelo TopHat, as amostras foram rodadas pelo Cuffdiff (Versão 2.1.1), que utiliza os *reads* alinhados para duas ou mais características e gera um relatório de genes e transcritos que são diferencialmente expressos nos grupos de interesse, de modo a confrontar com um genoma indicado e padronizar as sequências do transcriptoma.

Para a identificação de regiões diferencialmente expressas entre os dois grupos foi considerado o valor de *p*, ajustado para FDR (Taxa de Falsos Positivos) de 5% ($q\text{-value} < 0,05$).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Os resultados observados para o perfil de ácidos graxos (PAG) (g/100g de AG) no músculo *Longissimus*, para os ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico, linoléico, CLA e linolênico (Tabela 1). A partir da tabela 1 é possível observar que o ácido graxo presente em maior quantidade foi o oléico (C18:1 *cis*-9), seguidos pelos ácidos graxos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0).

Tabela 1 - Médias dos ácidos graxos (g/100g de AG) no m. *Longissimus* de tourinhos Nelore confinados

Ácido Graxo	Grupo de Alta Concentração				Grupo de Baixa Concentração			
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Palmítico (C16:0)	23,24	28,48	24,48	1,53	16,45	20,35	18,84	1,12
Esteárico (C18:0)	15,81	17,88	16,68	0,79	10,86	12,81	11,81	0,62
Oléico (C18:1 cis-9)	34,52	37,52	35,85	1,02	25,57	29,52	27,3	1,38
Linoléico (C18:2 cis-9 cis -12)	8,97	11,83	9,99	1,00	2,47	4,92	4,14	0,75
CLA (C18:2 cis-9 trans-11)	0,33	0,59	0,42	0,08	0,14	0,21	0,18	0,02
Linolênico (C18:3)	0,88	1,21	1,00	0,12	0,23	0,50	0,42	0,07

Fonte: (UTEMBERGUE, 2014)

6.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

Os resultados para a extração de lipídeos totais podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Médias dos lipídeos totais (g/100g) do m *Longissimus* de tourinhos Nelore confinados

Amostras	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
48	0,26	1,03	0,62	0,24

Fonte: (UTEMBERGUE, 2014)

6.3 EXTRAÇÃO DE RNA E QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO POR RNASEQ

Após a extração do RNA foram verificadas a concentração e a integridade do RNA nas amostras extraídas (Tabela 3), para a quantificação da expressão, por meio do RNAseq.

Cada amostra apresentou, em média, 321,80 ng de RNA para cada 1µl de solução, e os RINs (*RNA integrity number*) das amostras foi, em média, 7,42, mensurado a partir da análise em *Bioanalyser*, confirmando que as amostras não apresentavam degradação e poderiam ser utilizadas nas etapas posteriores. Para a leitura por espectrofotometria observou-se médias de 2,04 e 1,95, para as razões 260nm/280nm e 260nm/230nm, respectivamente.

A partir da concentração de RNA de cada amostra calculou-se o volume que foi utilizado para a realização do sequenciamento, de modo que cada amostra apresentasse, ao menos, 2000 ng de RNA.

Tabela 3 - Resultados da extração de RNA das amostras do m. *Longissimus*

(Continua)

Amostra	ng/ul ¹	260/280 ²	260/230 ³	RIN ⁴
1	241	2,03	1,89	7,40
2	148	1,98	1,77	7,70
3	200	2,00	2,01	7,70
4	208	2,07	2,08	7,00
9	452	2,04	1,98	7,00
10	181	2,11	2,14	7,40
12	315	2,05	2,06	7,30
17	620	2,04	1,88	7,60
36	211	2,07	2,14	7,40
37	550	2,12	2,05	7,50
38	56	2,09	2,12	7,10
48	950	2,06	2,23	7,70

(Conclusão)

Amostra	ng/ μ l ¹	260/280 ²	260/230 ³	RIN ⁴
49	143	2,04	2,17	7,30
55	620	2,06	2,24	7,80
56	222	2,05	1,94	7,30
59	710	2,11	2,13	7,70
60	199	2,02	2,16	7,50
61	920	2,06	2,05	7,90
69	67,5	2,09	2,07	7,00
70	278	2,03	1,64	7,30
72	496	2,03	2,02	7,90
76	404	2,03	1,65	7,20
79	680	2,07	2,10	7,50
82	198	2,02	2,06	7,20
83	245	1,98	1,69	7,70
84	131	2,05	2,05	7,50
85	220	2,01	1,15	7,80
86	240	1,95	1,94	7,50
88	417	2,03	1,93	7,50
89	376	2,10	1,91	7,70
90	111	2,10	2,01	7,30
94	117	2,01	1,05	7,90
95	267	2,11	2,03	7,10
99	273	2,01	1,85	7,40
105	169	2,04	1,67	7,90
106	790	2,04	2,20	7,00
107	93	2,03	2,01	7,00
108	51	1,99	1,70	7,10
109	297	2,02	1,96	7,30
111	362	2,02	2,15	7,00
112	89	2,00	1,92	7,20
114	399	2,00	2,04	7,60
115	426	2,00	1,32	7,50
122	200	2,02	1,89	7,80
125	492,5	2,10	2,23	7,50
126	423	2,02	1,80	7,80

¹Quantidade de RNA (ng/ μ L)²Razão entre os comprimentos de onda de 260nm e 280nm³Razão entre os comprimentos de onda de 260nm e 230nm⁴Índice de integridade do RNA obtido através de bioanalyser

Fonte: (UTEMBERGUE, 2014)

6.4 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES

Foram considerados significativos os genes diferencialmente expressos com um valor de q (q -value) para FDR (Taxa de Falsos Positivos) menor que 5%. A quantidade de genes diferencialmente expressos, para cada ácido graxo, pode ser observada na tabela 4.

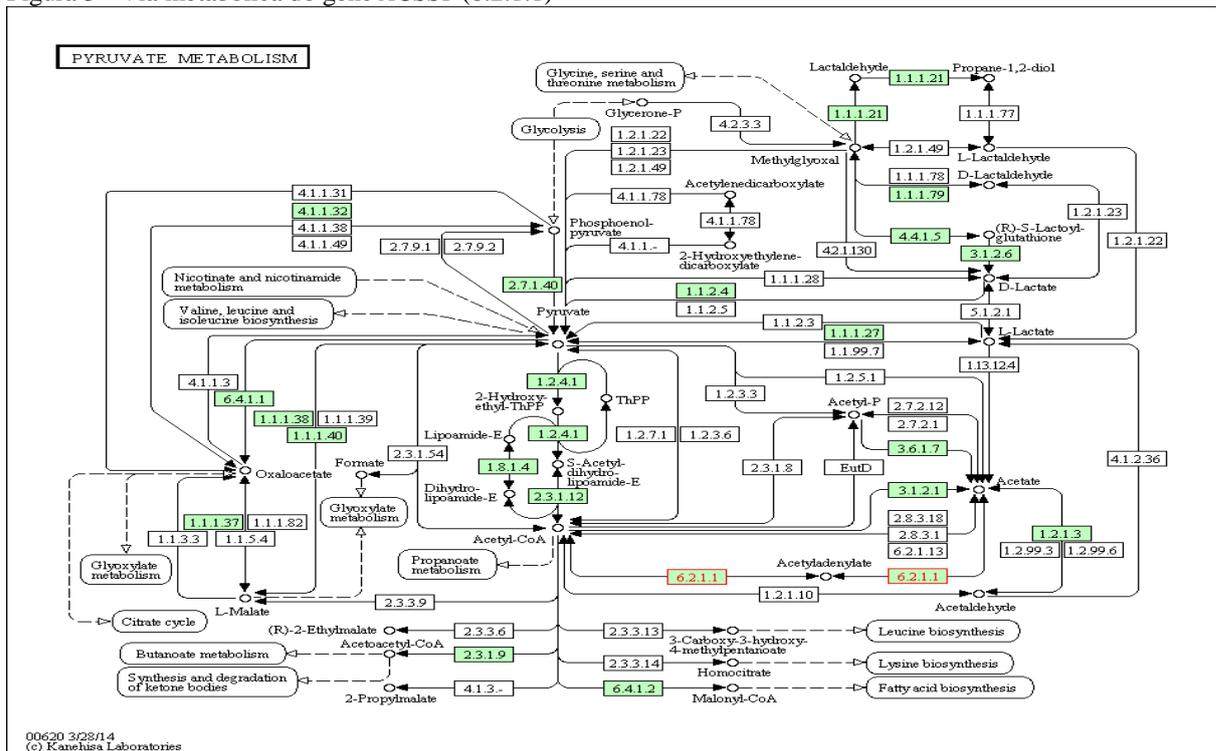
Tabela 4- Quantidades de genes diferencialmente expressos para cada ácido graxo, entre os grupos de alta e baixa concentração dos ácidos graxos no m. *Longissimus*

Ácido Graxo	Genes diferencialmente expressos
Palmítico (C16:0)	192
Esteárico (C18:0)	223
Oléico (C18:1 cis-9)	547
Linoléico (C18:2 cis-9 cis-12)	100
CLA (C18:2 cis-9 trans-11)	24
Linolênico (C18:3)	87

Fonte: (UTEMBERGUE, 2014)

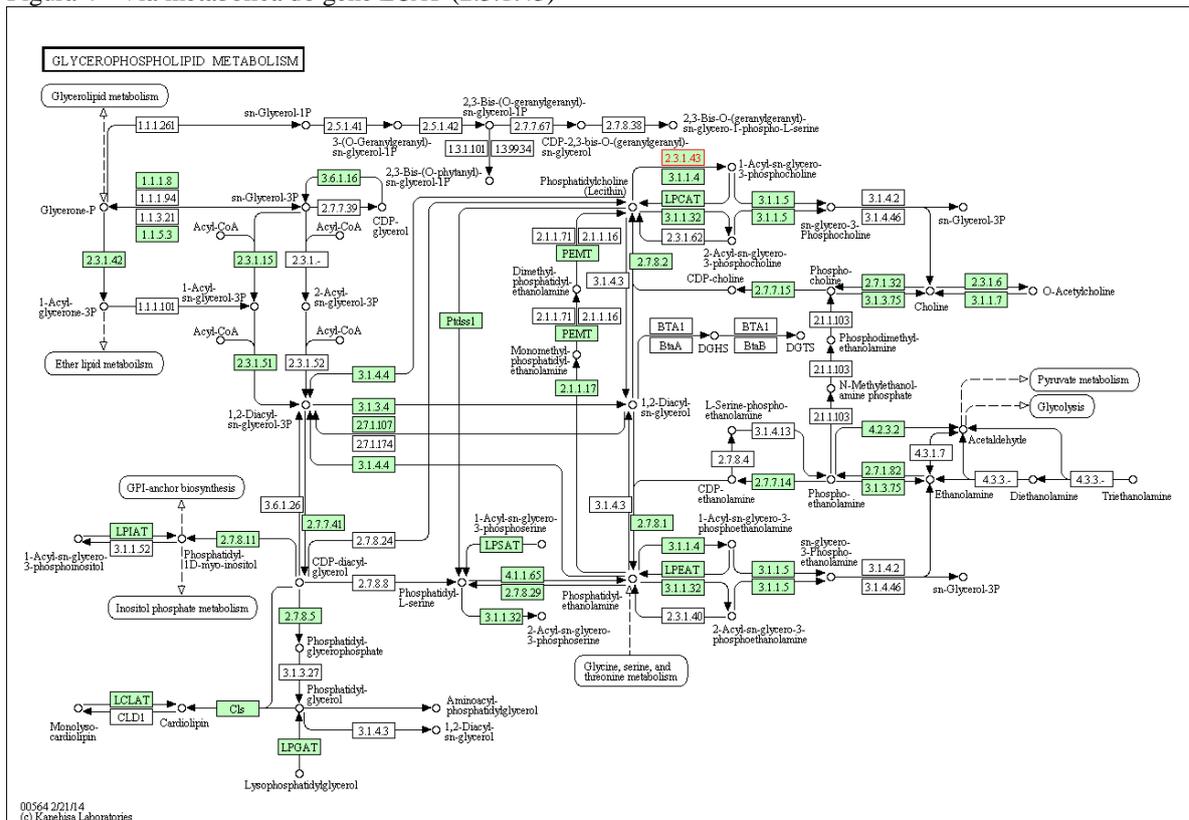
A técnica de RNAseq permitiu, neste estudo, observar um total de 1173 genes diferencialmente expressos entre os grupos de baixa e alta concentração de determinados ácidos graxos. Alguns destes genes foram observados em mais de um ácido graxo. A partir da tabela 5, pode-se observar que o ácido graxo que apresentou maior quantidade de genes diferencialmente expressos foi o oléico, seguido pelos ácidos graxos esteárico e palmítico.

Os genes diferencialmente expressos (GDE) para o ácido palmítico foram observados, predominantemente, no cromossomo 1 e no cromossomo 2. Entre os observados, destacam-se os genes *AGPAT6* (*1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6*), *DGAT2* (*diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2*) e *LPL* (*lipoprotein lipase*), que estão relacionados à síntese e degradação de triacilglicerol, agindo sobre a síntese de ácidos graxos e o *GK* (*glycerol kinase*) que influencia a degradação do glicerol (Figura 2), além dos genes *PLIN 5* (*lipid storage droplet protein 5*), *FABP3* (*fatty acid binding protein 3*), *SCD5* (*stearoyl-CoA desaturase 5*), *ACOT11* (*acyl-CoA thioesterase 11*) e *CIQTNF3* (*CIq and tumor necrosis factor related protein*).

Figura 3 - Via metabólica do gene *ACSS1* (6.2.1.1)

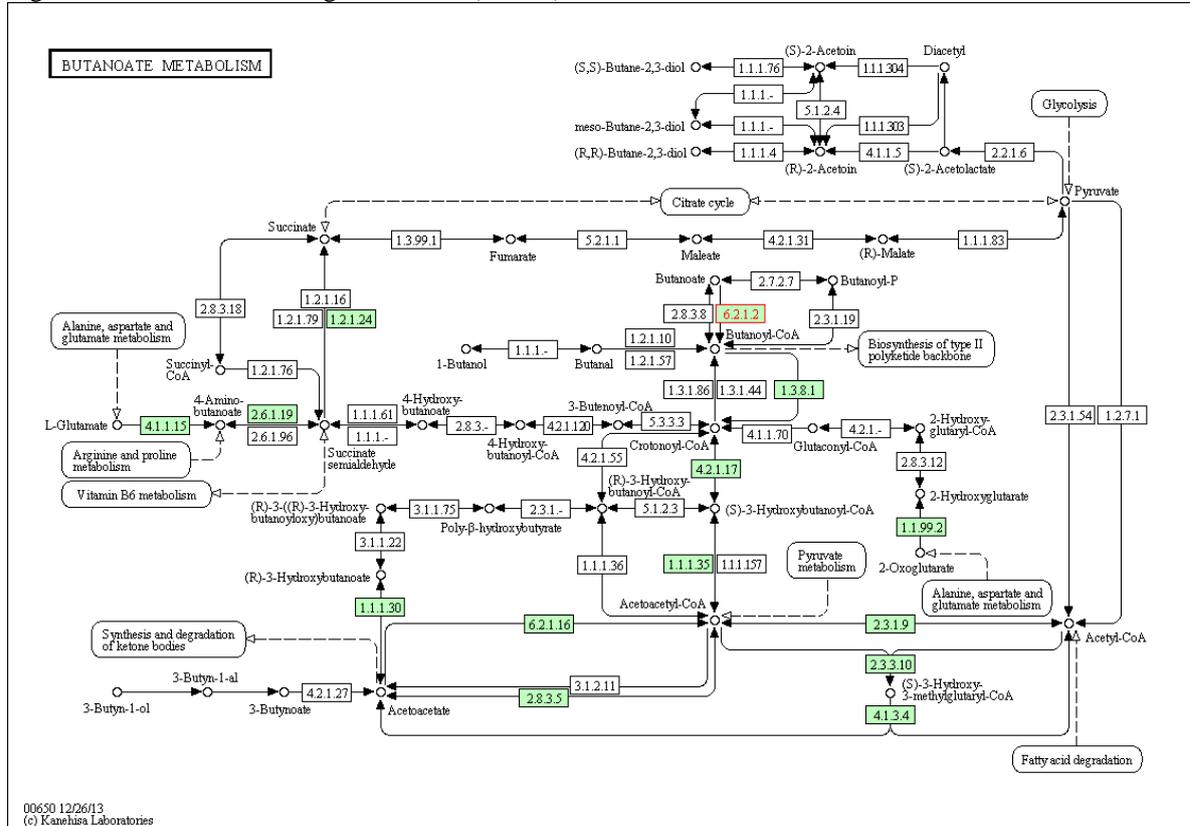
Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2014b).

Os GDE para o ácido oléico foram observados predominantemente nos cromossomos 7 e 19, como por exemplo os genes *ACAT1* (*acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1*), *ACOT11* (*acyl-CoA thioesterase 11*), *SLC27A6* (*solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6*), *ACSS1* (*acyl-CoA synthetase short-chain family member 1*) (Figura 3) e o *LCAT* (*lecithin-cholesterol acyltransferase*), responsável pela esterificação do colesterol, necessária para o transporte do mesmo (Figura 4).

Figura 4 - Via metabólica do gene *LCAT* (2.3.1.43)

Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2014c)

Com relação ao ácido linoléico, os GDE foram observados majoritariamente nos cromossomos 2 e 18, com destaque para os genes *CIQTNF3* (*C1q and tumor necrosis factor related protein*), *ACSM3* (*acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3*) (Figura 5), que atua em conjunto com enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos (*Fatty acid elongase; Fatty acid activating enzyme*), *ACSS1* (*acyl-CoA synthetase short-chain family member 1*), *CYP4B1* (*cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1*), membro do citocromo P450, responsável, entre outros fatores, pela síntese de colesterol, esteróides e outros lipídeos e o *LIPE* (*Lipase, hormone-sensitive*), presente no tecido adiposo e envolvido no metabolismo de lipídeos.

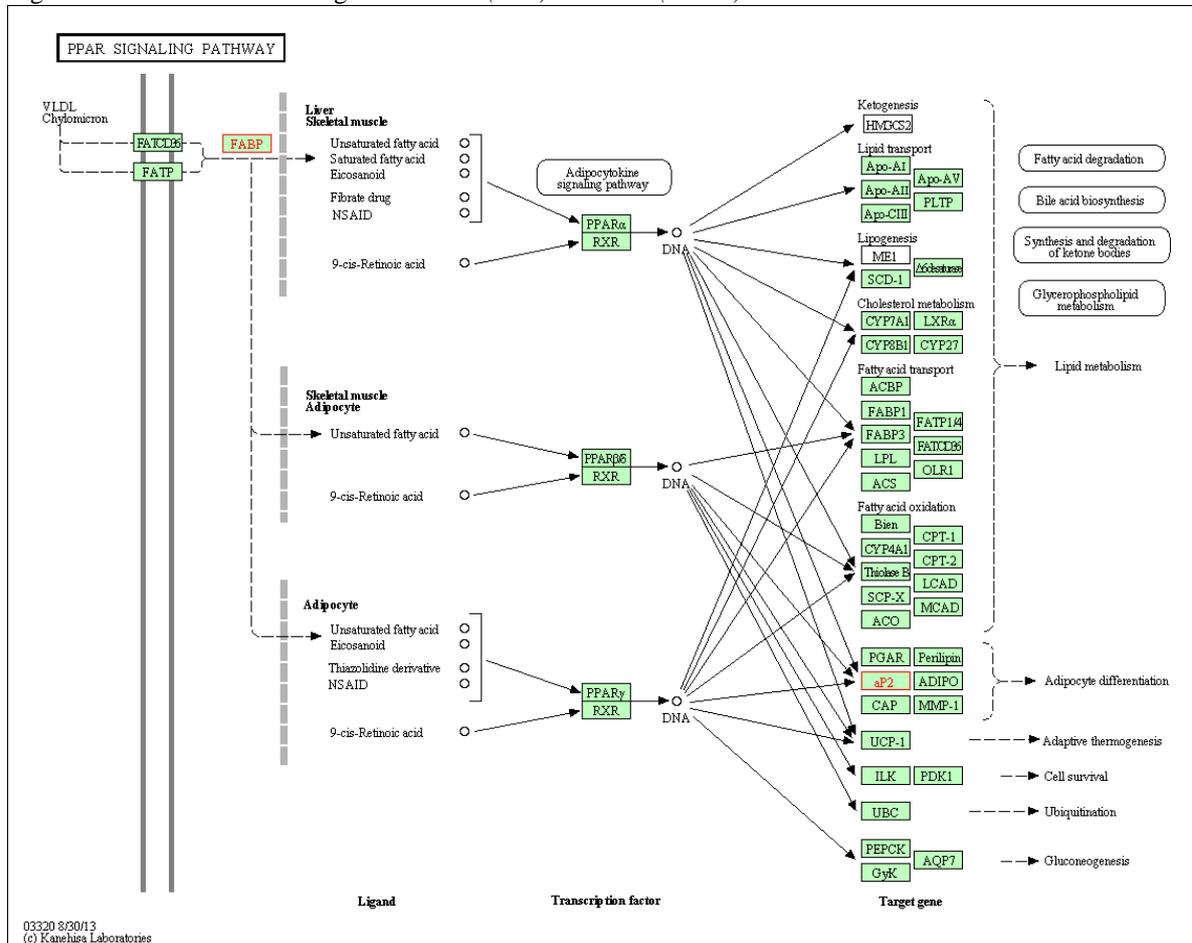
Figura 5 - Via metabólica do gene *ACSM3* (6.2.1.2)

Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2014d)

Em relação ao CLA (C18:2 cis-9 trans-11), houve uma concentração dos GDE no cromossomo 3. Entre os GDE, observou-se o *GHRH* (*growth hormone releasing hormone*) e *GEM* (*GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle*), localizado no músculo esquelético e que faz papel de regulador da membrana plasmática das células, porém não foram observados GDE que possam influenciar a composição dos ácidos graxos na carne.

Os GDE para o ácido linolênico estavam presentes principalmente nos cromossomos 1 e 18, entre eles os genes *PLIN 1* (*lipid storage droplet protein 1*) e os genes *FABP4* (*aP2 - fatty acid binding protein 4, adipocyte*) e *FABP7* (*fatty acid binding protein 7, brain*), ambos envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, nos adipócitos e no cérebro, respectivamente (Figura 6).

Figura 6 - Via metabólica dos genes *FABP4* (*aP2*) e *FABP7* (*FABP*)



Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (2014e)

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Apesar da baixa variação na expressão dos ácidos graxos entre os grupos de alta e baixa concentração, devido à homogeneidade dos animais utilizados, foi possível observar uma quantidade significativa de genes diferencialmente expressos em tecido muscular, o que pode ter sido possível devido ao número elevado de amostras utilizadas neste experimento em relação aos demais, permitindo que os grupos formados para as análises fossem homogêneos.

Entre os genes observados, destacaram-se os que participam de vias metabólicas que envolvem o metabolismo ou degradação de ácidos graxos, via de sinalização do *PPAR*, metabolismo e síntese de insulina e metabolismo ou degradação de triglicerídeos. Entre eles estão: *ACAT1*, *ACOX2*, *ACOT11*, *ACSM3*, *ACSS1*, *AGPAT6*, *BDH1*, *C1QTNF3*, *CYP4B1*, *DGAT2*, *FABP3*, *FABP4*, *FABP7*, *GK*, *IGF2*, *LCAT*, *LIPE (HSL)*, *LPL*, *PLIN1*, *PLIN5*, *SCD5*, *SLC27A6 (FATP6)*, sendo alguns deles mais expressos no grupo de alta e outros no grupo de baixa concentração de ácido graxo.

Observado na via metabólica de degradação dos ácidos graxos, o gene *ACAT1* foi observado entre os GDE para o ácido oléico e codifica um gene que catalisa a reação reversível de produção de acetoacetyl-CoA. Em macrófagos do tecido adiposo ele é responsável pela esterificação do colesterol, promovendo acúmulos lipídicos que podem causar doenças vasculares. Porém sua deficiência causa uma variedade de efeitos na homeostase do colesterol, incluindo a saída de colesterol de tecidos de reserva e aumento do *turnover* de lipoproteínas (LEE et al., 2000; DOVE et al., 2005; DOVE et al., 2006), além de desbalanço da homeostase da membrana lipídica das células, causando um excesso de alguns lipídeos como colesterol e diacilglicerol (WIFLING et al., 2014). Vale ressaltar que em bovinos não há relatos da ação da *ACAT1* em tecido muscular.

O gene *ACOT11* foi observado no grupo de baixa concentração do ácido palmítico e no grupo de alta concentração do ácido oléico. Tal observação provavelmente se deveu ao fato deste gene pertencer a uma enzima inserida nas vias metabólicas da formação de ácidos graxos de cadeia longa. Esta enzima é responsável pela conversão de um ácido graxo ativo pela sua forma correspondente não esterificada + coenzima A (HUNT et al., 2005). Embora algumas funções desta enzima ainda estejam indefinidas, é conhecido que elas atuam no balanço de ácidos graxos livres, além de agir na biossíntese de mediadores inflamatórios (HAN; COHEN, 2009).

Com maior expressão no grupo de baixa concentração de ácido linoléico, o gene *ACSM3* exerce função parecida com o *ACOT11*. Ele é responsável, assim como outras acyl-coenzimas A (CoA) sintetase, por ativar a ligação tioéster entre os ácidos graxos e a enzima para que os ácidos graxos possam ser transportados, sendo que o *ACSM3* é responsável por esta ligação em ácidos graxos de cadeia médias, mais especificamente entre 6 e 10 carbonos (WATKINS et al., 2007). Portanto, a expressão diferencial deste gene pode ter sido detectada devido à diferença de expressão deste gene entre os dois grupos.

Também observado no grupo de baixa concentração do ácido linoléico, o *ACSSI* também foi observado no grupo de alta concentração do ácido esteárico. Ele é componente do metabolismo do piruvato e da glicólise/gliconeogênese. Assim como os genes anteriores, o *ACSSI* é responsável por ligar os ácidos graxos ao acyl-CoA, para poder ser transportado. Em tecido mamário bovino, o *ACSSI* foi relatado como um dos mais abundantes, com expressão crescente durante a lactação (BIONAZ; LOOR, 2008; NAFKOV, 2010). Ponsuksili et al. (2007), comparando a expressão gênica de duas diferentes raças de suínos, encontraram maior expressão de *ACSS* para animais que apresentavam a carcaça mais pesada, associando ainda sua presença à biossíntese de lipídeos, por meio da produção de acetyl-CoA, a partir do acetato.

A enzima AGPAT é crucial para a síntese de triacilglicerol em eucariotos, pois catalisa o segundo passo da reação (COLEMAN; LEE, 2004; YE et al., 2005; TAKEUCHI; REUE, 2009). Por ser um membro da família AGPAT, o gene *AGPAT6*, observado no grupo de alta concentração do ácido palmítico, tem um importante papel na biossíntese de lipídeos (CHEN et al., 2008). Ele é responsável por regular a concentração de ácidos graxos durante a síntese de gordura do leite (BIONAZ; LOOR, 2008a). Este gene está associado com as diferenças na composição da gordura do leite, como a concentração de ácidos graxos saturados, insaturados e suas relações (NAFIKOV, 2010). Littlejohn et al. (2014), também observaram uma forte correlação entre a expressão de *AGPAT6* e a quantidade de gordura no leite bovino. Não há, até o momento, trabalhos publicados relacionando a presença de *AGPAT6* e o perfil de ácidos graxos da gordura intramuscular da carne.

O *BDHI*, observado no grupo de baixa concentração de ácido esteárico, participa da via de síntese e degradação de corpos cetônicos a nível mitocondrial, podendo produzir acetoacetato, que irá interferir, após sua ligação à acetyl-CoA, na degradação de ácidos graxos, podendo influenciar na composição lipídica da carne ou leite.

O gene *CIQTNF3*, observado nos grupos de baixa concentração dos ácidos palmítico e linoléico, foi relatado em adipócitos humanos, participando como um importante elemento

na fisiologia dos adipócitos, na lipólise e na secreção de adipocinas, além de contribuir para as vias metabólicas acionadas em processos inflamatórios (SCHIMID et al., 2012). Ainda, Sheng et al. (2014) observaram maior expressão deste gene no tecido intramuscular de bovinos mestiços da raça Simental, quando comparado aos tecidos subcutâneo e perirrenal.

O gene *CYP4B1*, também com maior expressão no grupo de baixa concentração do ácido linoléico, participa da codificação de um membro da superfamília do citocromo P450, que são proteínas monoxigenases que catalisam várias reações, envolvendo o metabolismo de medicamentos, síntese de colesterol, esteroides e outros lipídeos. Muitos estudos envolvendo este gene, o relacionaram principalmente à questão do metabolismo de drogas (ZHENG et al., 1988; RAINOV et al., 1998; SETA et al., 2007). Entretanto, Fisher et al. (1988), em estudo com coelhos, relataram a correlação entre a presença deste gene e a metabolização de ácidos graxos de cadeia curta (entre 7 e 10 carbonos), enquanto o *CYP4A1*, não observado neste estudo, com a presença de ácidos graxos com cadeias entre 12 e 16 carbonos. A observação da diferença de expressão entre os dois grupos pode ter acontecido devido ao fato de que a maioria das vias metabólicas enriquecidas pelo *CYP4B1* são reações de oxidoredução e vias metabólicas relacionadas ao metabolismo de lipídeos, incluindo a via do ácido linoléico e do ácido araquidônico (JIA et al., 2014).

Mais observado no grupo de baixa expressão do ácido palmítico, o gene *DGAT2* foi o primeiro gene da família *DGAT* que foi identificado em oito diferentes espécies de mamíferos (CASES et al., 2001) e junto aos demais membros de sua família (por exemplo *DGAT1* e *MOGAT*) e é um gene altamente relacionado às diferenças de síntese e armazenamento de triglicerídeos, principalmente em animais de produção (WINTER et al., 2003), sendo portanto expresso principalmente em tecidos que sintetizam grandes quantidades de ácidos graxos, como o tecido adiposo, fígado, músculo entre outros (YAMASHITA et al., 2014). Ainda, Bakhtiarizadeh et al. (2013) relataram que o gene *DGAT2* está entre os 10 genes mais abundantes no tecido adiposo de mamíferos, incluindo suínos e bovinos, sendo mais presente no tecido adiposo e menos na gordura subcutânea e na intramuscular (MOISÁ et al., 2014). Jeong et al. (2012) relataram que o aumento da expressão do *DGAT2* está associado à um aumento das quantidades intramusculares de gordura, e esses resultados indicaram que o *DGAT2* é um importante agente no acúmulo de ácidos graxos saturados durante a fase de terminação de bovinos.

No que diz respeito ao metabolismo de ácidos graxos, o *DGAT2* contribui significativamente para a síntese de triacilgliceróis por meio da atividade do terminal *acyl-transferase*, catalisando a última etapa dos triacilgliceróis e com o aumento de triacilgliceróis,

há um aumento da proporção de ácidos graxos saturados, como ácido palmítico, por exemplo, em relação aos demais (BUCHANAN et al., 2013). Por outro lado, Yu et al. (2013) relataram um aumento dos ácidos graxos poliinsaturados relacionado à maior expressão do *DGAT2* no músculo *Longissimus* de suínos da raça Landrace.

De acordo com Lozeman et al. (2001), o *Palmitoyl-CoA* é um ótimo substrato para o *DGAT*, tanto em tecido adiposo quanto em tecido subcutâneo e muscular. Portanto, a maior expressão do gene no grupo de baixa concentração do ácido graxo pode ser explicada pela baixa disponibilidade de *Palmitoyl-CoA*, que participa da formação do ácido palmítico. Dessa forma, quanto maior a atividade do *DGAT*, menor tende a ser a concentração do ácido graxo.

O grupo de proteínas vinculadas aos ácidos graxos, conhecido como *FABP*, corresponde a algumas proteínas solúveis que possuem alta afinidade por ácidos graxos (CHMURZYNSKA, 2006). *FABP3*, *FABP4* e *FABP7* são três membros desta família e podem ter uma importante ação na diferenciação dos adipócitos (TANIGUCHI et al., 2008). Estes três membros foram observados, neste estudo, entre os GDE de três diferentes ácidos graxos, sendo o *FABP3* no ácido palmítico, o *FABP4* no ácido linolênico e o *FABP7* nos ácidos esteárico e linolênico. Este resultado corrobora com o relatado por Loor et al. (2005), que observaram a correlação de proteínas *FABP* na glândula mamária de novilhas com a presença dos ácidos palmítico, oléico e esteárico na gordura. O *FABP3* está envolvido no transporte de ácidos graxos da membrana celular para os sítios de utilização (VEERKAMP; MAATMAN, 1995) e é majoritariamente expresso em músculos cardíaco e esquelético e o *FABP4*, em bovinos, está associado com marmorização e deposição de gordura subcutânea (CHO et al., 2008).

Estudo realizado por Sheng et al. (2014), com expressão diferencial de genes em três diferentes tecidos com gordura (gordura intramuscular, subcutânea e perirrenal) em bovinos cruzados da raça Simental, observou-se maior presença de *FABP4* em gordura intramuscular, o mesmo tipo de tecido analisado no presente experimento. Entretanto, em um estudo com os mesmos tecidos de suínos, Zhou et al. (2010) observaram maior expressão de *FABP4* em tecido subcutâneo, sugerindo que a regulação da diferenciação do adipócito em suínos e bovinos ocorre de forma diferente. De modo semelhante, Bakhtiarizadeh et al. (2013) demonstraram que o *FABP4* foi altamente expresso em tecido adiposo de suínos e bovinos. Isto acontece devido ao fato desta proteína estar correlacionada à deposição de gordura intramuscular – marmorização – devido à uma interação com o receptor ativado do peroxissomo, interferindo na atividade da lipase-hormônio sensível (*HSL* – observado neste estudo), atuando, portanto, no metabolismo lipídico e na homeostase da glicose nos adipócitos

(MICHAL et al., 2006). Ainda, Bionaz e Loor (2008a) observaram maior expressão de *FABP3* e *FABP4* na glândula mamária de bovinos, sendo o *FABP3* dominante durante todos os períodos de lactação, sugerindo que o *FABP3*, junto ao *ACSL1* (não observado neste estudo) e *SLC27A6* (observado neste estudo) participam da via de esterificação, a partir da via de ativação do *PPARG*. O *FABP7*, por sua vez, é mais expresso em tecidos como cérebro e retina, e está relacionado com o transporte transmembrana de ácidos graxos de cadeia entre 18 e 20 carbonos, e, preferencialmente, por insaturados, como os observados neste estudo (HERTZEL; BERNLOHR, 2000).

O gene *GK*, mais expresso no grupo de alta concentração do ácido palmítico participa de duas importantes vias metabólicas: i) via de degradação do glicerol; ii) via de sinalização do *PPARG* no adipócito, podendo atuar sobre a gliconeogênese.

O gene *IGF2*, mais observado no grupo de alta concentração do ácido esteárico, é relatado em suínos como um importante gene que pode atuar na deposição de gordura (GAO et al., 2007), atuando de forma substancial nas características de carcaças dessa espécie. A partir disso, Van den Maagdenberg et al. (2008) verificaram não somente um aumento da quantidade de gordura na carcaça, como relatado anteriormente, mas também um aumento do crescimento muscular. Entretanto, não se observou diferença no perfil de ácidos graxos dos animais com diferentes níveis de expressão de *IGF2*. Por outro lado, Gardan et al. (2008), não observaram diferenças no perfil de ácidos graxos de suínos e diferenças para quantidade de gordura no músculo. A maioria dos estudos com a relação ao *IGF2* leva considera as características de desenvolvimento e crescimento dos animais de interesse econômico (ABO-AL-ELA et al., 2014). Porém Oczkowicz et al. (2012) relataram uma importante associação entre um polimorfismo do *IGF2* e a quantidade de gordura intramuscular de suínos. Deste modo, a interação entre a expressão de *IGF2* e o perfil dos ácidos graxos da gordura intramuscular ainda necessita de mais estudos.

Já o *LCAT*, observado no grupo de baixa concentração do ácido oléico trata-se de uma enzima que atua no metabolismo extracelular de lipoproteínas. É sintetizada majoritariamente no fígado e é responsável pela esterificação do colesterol, para que o mesmo possa ser transportado (CLAY et al., 2000). Aproximadamente 75% da *LCAT* presente no plasma está associada com lipoproteínas de alta densidade (HDL) e é uma das grandes responsáveis pela manutenção dos níveis séricos de HDL (YAMASHIDA et al., 2014). De acordo com Grove & Pownall (1991), em humanos o *LCAT* age preferencialmente em fosfolípídeos contendo os ácidos graxos linoléico e oléico, como observado neste estudo e a *LCAT* em bovinos está

altamente correlacionado ao *LCAT* humano, agindo majoritariamente sobre os mesmos sítios de ação.

O *LIPE* (*HSL*), GDE no grupo de alta concentração do ácido linoléico, codifica uma proteína que possui duas formas: longa e curta, sendo a curta expressa em tecido adiposo, onde hidroliza o triglicerídio ali estocado em ácidos graxos livres, participando ativamente da via metabólica da sinalização de insulina, interferindo sobre a homeostase de glicose e lipídeos. No metabolismo de ácidos graxos, o *HSL* é responsável por praticamente 95% da hidrólise do triglicerídeo, podendo determinar ou estimular a lipólise (GONZÁLEZ; SÁNCHEZ, 2006; HSIAO et al., 2013), e é considerada a enzima limitante da lipólise em tecido adiposo de animais (BELFRAGE et al., 1984). Em humanos o *LIPE* está correlacionado às concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos, além de ser relacionado à Diabetes do tipo 2, e sua mutação *LIPE C-60G*, correlacionada à distribuição e acúmulo de tecido adiposo pelo corpo (GARENC et al., 2009). Sun et al. (2014), trabalhando com expressão diferencial de microRNAs entre o tecido adiposo fetal e adulto de bovinos, observaram uma maior expressão de *LIPE* em tecido adiposo adulto, correlacionando-o com a oxidação de ácidos graxos, envolvido na adipogênese. Também, Fernandez et al. (2011), que trabalharam com camundongos com alterações no funcionamento do *LIPE*, relataram uma maior atividade em animais com menores níveis de triacilglicerol, corroborando com os estudos anteriormente mencionados. Dessa forma, a maior expressão no grupo de alta concentração do ácido linoléico provavelmente deveu-se à forma curta da proteína codificada presente, envolvida, portanto, na oxidação deste ácido graxo.

De forma semelhante, o *LPL* é mais observado em tecidos adiposo e muscular que tenham nos ácidos graxos uma importante fonte de estoque ou de energia. Ainda, o metabolismo de vitaminas lipossolúveis também pode ser influenciado pelo *LPL* (GOLDBERG et al., 2009). Xiao et al. (2012), em um estudo com suínos, observaram que a maior atividade de *LPL* pode melhorar a qualidade da carne, por meio da diminuição do estresse oxidativo e da regulação do metabolismo de triglicerídeos, corroborando com os resultados de Lu et al. (2007), que apontaram que o *LPL* é a enzima-chave que regula o acúmulo de triglicerídeos em frangos, por meio do aumento da atividade de *LPL* com o aumento do número de adipócitos. No presente estudo, o *LPL* foi observado no grupo de alta concentração do ácido palmítico. Além disso, esta enzima participa da via metabólica de sinalização do *PPAR* junto aos *FABP*, influenciando no metabolismo lipídico e da via metabólica do metabolismo de glicerol, e, conseqüentemente, sobre a formação de ácidos graxos. Madeira et al. (2014) também observaram uma correlação positiva entre o ácido

palmítico e o *LPL* em suínos, possivelmente pelo aumento da atividade de *LPL* nas dietas utilizadas. Entretanto, os autores relataram uma correlação moderada com o ácido esteárico, fato este não observado no presente estudo.

Os genes *PLIN1* e *PLIN5* atuam junto aos adipócitos, agindo sobre o controle da lipólise, evitando-a ou estimulando-a, de acordo com a necessidade energética do animal (WILFLING et al., 2014), permitindo a regulação da lipogênese, por meio da via metabólica de sinalização do *PPAR* (BINDESBØLL et al., 2013), juntamente com o *FABP4*, além de codificarem uma das principais proteínas estruturais do revestimento dos lipídeos no adipócito, desempenhando um importante papel no armazenamento do triglicerol (SUBRAMANIAN et al., 2004). Estes genes foram observados no grupo de alta concentração dos ácidos linolênico e palmítico, respectivamente, corroborando com resultados observados por Shirouchi et al. (2014), que relataram um aumento nos níveis de RNAm de *PLIN1* na gordura intramuscular de animais da raça preta japonesa, quando comparados a gordura de bovinos da raça holandês. O fato de estes genes terem sido mais observados no grupo de alta concentração deve-se provavelmente ao fato do *PLIN* aumentar a deposição de lipídeos em musculatura, aumentando o porcionamento de ácidos graxos por meio do estoque de triacilglicerol (BOSMA et al., 2012). Porém, de acordo com Bindsbøll et al. (2013), uma maior expressão de *PLIN5* pode ser associada à uma dieta rica em energia, como a de bovinos confinados, fato que também foi observado por Sztalryd & Kimmel (2014). No entanto, os autores alimentaram ratos com dieta com baixa energia, e não observaram diferenças na concentração de *PLIN5*.

Com relação ao *SCD5*, pode-se destacar sua importante função na ativação de proteínas de membrana que catalisam a formação de ácidos graxos monoinsaturados, a partir de ácidos graxos saturados, inserindo uma dupla ligação na posição delta-9 (NTAMBI, 1999; WANG et al., 2005; JIANG et al., 2008; SHIROUCHI et al., 2014), convertendo ácidos graxos saturados em monoinsaturados, para a produção de CLA (BRANDA SICA et al., 2014). Pode-se ainda supor que o acúmulo de ácido oléico pode ser relacionado à alta atividade de *SCD* (WANG et al., 2005; SHIROUCHI et al., 2014), visto que o *SCD* pode converter ácido esteárico em ácido oléico (LEE et al., 2008). No presente estudo ele foi um GDE para os ácidos palmítico e esteárico, no grupo de alta concentração de ambos, resultado similar ao de Moisés et al. (2014), que observaram uma maior expressão da família *SCD* em animais recebendo uma dieta de terminação baseada em grãos de milho.

Ao avaliar o efeito de diferentes raças de bovinos na expressão do gene *SCD*, Taniguchi et al. (2004) relataram que diferenças na expressão gênica de *SCD* podem

influenciar a composição do perfil de ácidos graxos na carne, mas o inverso não é válido, assim como sua presença não está correlacionada ao grau de marmorização dos músculos (LEE et al., 2008). Ainda, Branda Sica et al. (2014) observaram uma associação entre um alelo de *SCD5* (Alelo C) e a maior porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados na carne.

O gene *SLC27A6*, também conhecido como *FATP6*, possui a função de translocar ácidos graxos de cadeia longa através da membrana plasmática (STAHL, 2004) e possui função na via de sinalização do *PPAR* em vários tecidos, influenciando a atividade do *FABP*, *ACSL* e *AGPAT* (BIONAZ; LOOR, 2008b). A família de membros de *SLC27A* possui 6 diferentes genes, todos ligados de alguma forma ao metabolismo de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos, através do transporte transmembrana. Porém, a função do *SLC27A6* ainda não está elucidada. Em humanos e camundongos este gene é predominantemente expresso no coração, e possui uma alta afinidade pelos ácidos graxos palmítico e oléico (LEWIN; COLEMAN, 2003; GIMENO, 2007), como foi observado neste estudo, no qual o gene foi diferencialmente expresso no grupo de baixa concentração do ácido oléico. Em bovinos, o *SLC27A6* foi observado em tecido epitelial mamário e sua expressão foi correlacionada com o estágio da lactação (BIONAZ; LOOR, 2008a; NAFIKOV et al., 2013).

Alguns genes foram observados em estudos anteriores no músculo de bovinos ou ruminantes. Entretanto, são necessários mais estudos nesta área a fim de esclarecer quais genes podem agir sobre as vias metabólicas e influenciar a composição dos ácidos graxos na carne de bovinos.

IMPLICAÇÕES

8 IMPLICAÇÕES

Estudos com RNAseq e expressão diferencial de genes envolvendo o perfil de ácidos graxos na carne ainda são escassos, e em animais zebuínos não há relatos. Provavelmente este fato ocorra devido ao pouco tempo de desenvolvimento da técnica, ou ao seu custo, que ainda é alto, comparado à técnicas mais simples, como o microarranjo.

A grande vantagem deste tipo de estudo é a identificação de novos genes que possam estar relacionado às características de interesse, sem a necessidade de conhecimento prévio dos genes que possam afetá-la, permitindo assim um estudo mais amplo.

O aumento do conhecimento sobre a sequência genômica dos animais possibilita identificar regiões do genoma que regulam a expressão de algumas vias metabólicas responsáveis por características fenotípicas de interesse econômico, permitindo selecionar os animais de produção a partir do seu perfil genético, em um processo de seleção assistida por marcadores, e não somente de traços fenotípicos, podendo melhorar a qualidade da carne e trazer benefícios para o consumidor final e para o meio ambiente.

Os genes diferencialmente expressos observados neste estudo podem servir como genes candidatos em estudos futuros, buscando estudar e elucidar o metabolismo de lipídeos, principalmente em animais zebuínos, visto que a maioria dos trabalhos foi com animais taurinos.

CONCLUSÃO

9 CONCLUSÃO

Os genes diferencialmente expressos identificados no músculo *Longissimus* foram *ACAT1*, *ACOT11*, *ACSM3*, *ACSS1*, *AGPAT6*, *BDH1*, *CIQTNF3*, *CYP4B1*, *DGAT2*, *FABP3*, *FABP4*, *FABP7*, *GK*, *IGF2*, *LCAT*, *LIPE (HSL)*, *LPL*, *PLIN1*, *PLIN5*, *SCD5* e *SLC27A6*, que possuem ações nas vias metabólicas dos ácidos graxos ou nas vias adjacentes, podendo influenciar sobre o perfil lipídico da carne.

Os genes *ACOT11*, *AGPAT6*, *CIQTNF3*, *DGAT2*, *FABP3*, *GK*, *LPL*, *PLIN5* e *SCD5* estão relacionados ao ácido palmítico; os genes *ACSS1*, *BDH1*, *FABP7*, *IGF2* e *SCD5* ao ácido esteárico; os genes *ACAT1*, *ACOT11*, *LCAT* e *SLC27A6* ao ácido oléico; os genes *ACSM3*, *ACSS1*, *CIQTNF3*, *CYP4B1* e *LIPE (HSL)* ao ácido linoléico; os genes *GHRH* e *GEM* ao CLA; e os genes *FABP4*, *FABP7* e *PLIN1* ao ácido linolênico.

Ainda, o uso de técnicas de sequenciamento genético para descoberta de novos genes poderá tornar a seleção genética dos animais mais eficiente, promovendo uma melhoria das características desejadas em animais de produção. Porém ainda são necessários mais estudos a fim de esclarecer como determinados genes podem influenciar as características desejadas, como por exemplo, o perfil de ácidos graxos da gordura intramuscular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABO-AL-ELA, H. G.; ABU EL-MAGAD, H.; EL-NAHAS, A.; MANSOUR, A. A. Association of a novel SNP in exon 10 of the IGF2 gene with growth traits in Egyptian water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Tropical Animal Health and Production**, 2014. DOI 10.1007/s11250-014-0588-3. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11250-014-0588-3#page-1>>. Acesso em: 12 maio 2014.

ALMEIDA, E. A. **Influência do estresse pré-abate na expressão gênica e qualidade da carne de frango (*Gallus gallus*)**. 2007. 66 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz, Piracicaba, 2007.

ANIMAL QTLdb. **Cattle QTLdb**. 2012. Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>>. Acesso em 15 out. 2012.

BAKHTIARIZADEH, M. R.; MORADI-SHAHRBABA, M.; EBRAHIMIE, E. Underlying functional genomics of fat deposition in adipose tissue. **Gene**, v. 521, p. 122-128, 2013.

BARBER, M. C.; WARD, R. J.; RICHARDS, S. E.; SALTER, A. M.; BUTTERY, P. J.; VERNON, R. G.; TRAVERS, M. T. Ovine adipose tissue monounsaturated fat content is correlated to depot-specific expression of the stearoyl-CoA desaturase gene. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 62-68, 2000.

BELFRAGE, P.; FREDRIKSON, G.; OLSSON, H.; STRALFORS, P. Regulation of adipose tissue lipolysis through reversible phosphorylation of hormone-sensitive lipase. **Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research**, v. 17, p. 351-359, 1984.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal, Funep, 2011. 616 p.

BINDESBØLL, C.; BERG, O.; ARNTSEN, B.; NEBB, H. I.; DALEN, K. T. Fatty acids regulate perilipin5 in muscle by activating PPAR. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 7, p. 1949-1963, 2013.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1019-1024, 2008a.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. **BMC Genomics**, v. 9, p. 366-387, 2008b.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOSMA, M.; HESSELINK, M. K.; SPARKS, L. M.; TIMMERS, S.; FERRAZ, M. J.; MATTIJSSEN, F.; VAN BEURDEN, D.; SCHAART, G.; DE BAETS, M. H.; VERHEYEN, F. K.; KERSTEN, S.; SCHRAUWEN, P. Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels. **Diabetes**, v. 61, 2679–2690, 2012.

BRANDA SICA, A.; RAVAGNOLO, O.; BRITO, G.; BALDI, F.; LaMANNA, A.; BANCHERO, G.; NAVAJAS, E. A.; RINCÓN, G.; MEDRANO, J. F. Evaluación de panel snp en genes candidatos de vías metabólicas para carne en hereford. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 73-84, 2014.

BRUGIAPLAGLIA, A.; LUSSIANA, C.; DESTEFANIS, G. Fatty acid profile and cholesterol content of beef at retail of piemontese, limousin and friesian breeds. **Meat Science**, v. 96, p. 568–573, 2014.

BUCHANAN, J. W.; GARMYN, A. J.; HILTON, G. G.; VANOVERBEKE, D. L.; BEITZ, Q. D. D. C.; MATEESCU, R. G. Comparison of gene expression and fatty acid profiles in concentrate and forage finished beef. **Journal of Animal Science**, v. 91, p.1-9, 2013.

CASES, S.; STONE, S. J.; ZHOU, P.; YEN, E.; TOW, B.; LARDIZABAL, K. D.; VOELKER, T.; FARESE, R. V. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 38870–38876, 2001.

CHEN, Y. Q.; KUO, M. S.; LI, S.; BUI, H. H.; PEAKE, D. A.; SANDERS, P. E.; THIBODEAUX, S. J.; CHU, S.; QIAN, Y.W.; ZHAO, Y.; BREDT, D. S.; MOLLER, D. E.; KONRAD, R. J.; BEIGNEUX, A. P.; YOUNG, S. G.; CAO, G. AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 10048-10057, 2008.

CHMURZYNSKA, A. The multigene family of fatty acid binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, p. 39–48, 2006.

CHO, S.; PARK, T. S.; YOON, D. H.; CHEONG, H. S.; NAMGOONG, S.; PARK, B. L.; LEE, H. W.; HAN, C. S.; KIM, E. M.; CHEONG, I. C.; KIM, H.; SHIN, H. D. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. **BMB Reports**, v. 41, p. 29-34, 2008.

CLARKE, S. D. Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1957-1965, 1993.

CLAY, M. A.; PYLE, D. H.; RYE, K. A.; BARTER, P. J. Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins a-i and a-ii is mediated by lecithin:cholesterol acyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 9019-9025, 2000.

COLEMAN, R. A.; LEE, D. P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 134-176, 2004.

COROMINAS, J.; RAMAYO-CALDAS, Y.; PUIG-OLIVERAS, A.; ESTELLÉ, J.; CASTELLÓ, A.; ALVES, E.; PENA, R. N.; BALLESTER, M. Analysis of porcine adipose tissue transcriptoma reveals differences in de novo fatty acid synthesis in pigs with divergent muscle fatty acid composition. **BMC Genomics**, v. 14, p. 843-857, 2013.

COSTA, L. S. **Composição e correlação de ácidos graxos da carne de Cordeiros alimentados com dietas contendo casca de soja**. 2001. 68 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Bahia, 2011.

DEMEYER, D.; DOREAU, M. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids, **Proceedings Nutrition Society**, v. 58, p. 593-607, 1999.

DHANDA, J. S.; TAYLOR, D. G.; MURRAY, P. J. Carcass composition and fatty acid profiles of adipose tissue of male goats: effects of genotype and live weight at slaughter. **Small Ruminant Research**, v. 50, p. 67-74, 2003.

DÍAZ, M. T.; VELASCO, S.; CAÑEQUE, V.; HUIDOBRO, F. R. de; PÉREZ, C.; GONZÁLES, J.; MANZANARES, C. Use of concentrate or pasture for fattening Lambs and its effect on carcass and meat quality. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 257-268, 2002.

DOVE, D. E.; SU, Y. R.; SWIFT, L. L.; LINTON, M. F.; FAZIO, S. ACAT1 deficiency increases cholesterol synthesis in mouse peritoneal macrophages. **Atherosclerosis**, v. 186, p. 267-274, 2006.

DOVE, D. E.; SU, Y. R.; ZHANG, W.; JEROME, W. G.; SWIFT, L. L.; LINTO, M. F.; FAZIO, S. ACAT1 Deficiency disrupts cholesterol efflux and alters cellular morphology in macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, p. 128-134, 2005.

ESTEVE-CODINA, A.; KOFLER, R.; PALMIERI, N.; BUSSOTI, G.; NOTREDAME, C.; PÉREZ-ENCISO, M. Exploring the gonad transcriptome of two extreme male pigs with RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 12, p.552, 2011.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food outlook, biannual report on global food markets**. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/019/i3473e/i3473e.pdf>> Acesso em: 22 fev. 2014.

FERNANDES, A. R. M.; SAMPAIO, A. A. M.; OLIVEIRA, E. A. Ácidos graxos da gordura de cobertura do contrafilé de bovinos Nelore e Canchim terminados em confinamento e alimentados com diferentes níveis de concentrado nas dietas. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 467-476, 2014.

FERNANDEZ, C.; SCHUHMANN, K.; HERZOG, R.; FIELDING, B.; FRAYN, K.; SHEVCHENKO, A.; JAMES, P.; HOLM, C.; STRÖM, K. Altered desaturation and elongation of fatty acids in hormone-sensitive lipase null mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 13, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, **Journal of Biology and Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FONSECA, L. F. S. **Expressão de genes relacionados à função Mitochondrial em bovinos nelore extremos para Consumo alimentar residual**. 2013. 49 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2013.

FRENCH, P.; STANTON, C.; LAWLESS, F.; O'RIORDAN, E. G.; MONAHAN, F. J.; CAFFREY, P. J.; MOLONEY, A. P. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2849-2855, 2000.

GAO, Y.; ZHANG, R.; HU, X.; LI, N. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. **Meat Science**, v. 77, p. 36-45, 2007.

GARDAN, D.; GONDRET, F.; VAN DEN MAAGDENBERG, K.; BUYS, N.; DE SMET, S.; LOUVEAU, I. Lipid metabolism and cellular features of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue in pigs differing in IGF-II genotype. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 45-53, 2008.

GARENC, C.; VOHL, M. C.; BOUCHARD, C.; PÉRUSSE, L. LIPE C-60G influences the effects of physical activity on body fat and plasma lipid concentrations: The Quebec Family Study. **Human Genomics**, v. 3, n. 2, p. 157-168, 2009.

GERBENS, F.; VAN ERP, A. J. M.; HARDERS, F. L.; VERBURG, F. J.; MEUWISSEN, T. H.; VEERKAMP, J. H.; TE PAS, M. F. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 846–852, 1999.

GILLIS, A. T.; ESKIN, N. A. M.; CLIPLEF, R. L. Fatty acid composition of bovine intramuscular and subcutaneous fat as related to breed and sex. **Journal of Food Science**, v. 38, p. 408–411, 1973.

GIMENO, R. E. Fatty acid transport proteins. **Current Opinion in Lipidology**, v. 18, p. 271-276, 2007.

GLAUS, P.; HONKELA, A.; RATTRAY, M. Identifying differentially expressed transcripts from RNA-seq data with biological variation. **Bioinformatics**, v. 28, p. 1721-1728, 2012.

GOFF, S. A.; VAUGHN, M.; MCKAY, S.; LYONS, E.; STAPLETON, A. E.; GESSLER, D.; MATASCI, N.; WANG, L.; HANOON, M.; LEONARDS, A.; MUIR, A.; MERCHANT, N.; LOWRY, S.; MOCK, S.; HELMKE, M.; KUBACH, A.; NARRO, M.; HOPKINS, N.; MICKLOS, D.; HILGERT, W.; GONZALES, M.; JORDAN, C.; SKIDMORE, E.; DOOLEY, E.; CAZES, J.; MCLAY, R.; LU, Z.; PASTERNAK, S.; KOESTERKE, L.; PIEL, W. H.; GRENE, R.; NOUTSOS, C.; GENDLER, K.; FENG, X.; TANG, C.; LENT, M.; KIM, S. J.; KVILEKVAL, K.; MANJUNATH, B. S.; TANNEN, V.; STAMAKIS, A.; SANDERSON, M.; VELCH, S. M.; CRASNTON, K. A.; SOLTIS, P.; SOLTIS, D.; O'MEARA, B.; ANE, C.; BRUTNELL, T.; KLEIBENSTEIN, D. J.; WHITE, J. W.; MACK, J. L.; DONOGHUE, M. J.; SPALDING, E. P.; VISION, T. J.; MYERS, C. R.; LOWENTHAL, D.; ENQUIST, B. J.; BOYLE, B.; AKOGLU, A.; ANDREWS, G.; RAM, S.; WARE, D.; STEIN, L.; STANZIONE, D. The iPlant collaborative: cyberinfrastructure for plant biology. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. 34, 16 p., 2011.

GOLDBERG, I. J.; ECKEL, R. H.; ABUMRAD, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S86-90, 2009.

GONZÁLEZ, Y. C.; SANCHEZ, M. V.; Signalling mechanisms regulating lipolysis. **Cellular Signalling**, v. 18, p. 401-408, 2006.

GROVE, D.; POWNALL, H. J. Comparative specificity of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase from ten animal species. **Lipids**, v. 26, n. 6, p. 416-420, 1991.

HAN, S.; COHEN, D. E. Functional characterization of thioesterase superfamily member 1/Acyl-CoA thioesterase 11: implications for metabolic regulation. **Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 2620-2631, 2012.

HERTZEL, A. V.; BERNLOHR, D. A. The mammalian fatty acid- binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. **TEM**, v. 11, n. 5, p. 6, 2000.

HOLANDA, M. A. C.; HOLANDA, M. C. R.; MENDONÇA JR, A. F. Suplementação dietética de lipídios na concentração de ácido linoléico conjugado na gordura do leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 221-229, 2011.

HSIAO, P. J.; CHEN, Z. C. C.; HUNG, W. W.; YANG, Y. H. C.; LEE, M. Y.; HUANG, J. F.; KUO, K. K. Risk interaction of obesity, insulin resistance and hormone-sensitive lipase promoter polymorphisms (LIPE-60 C > G) in the development of fatty liver. **BMC Medical Genetics**, v. 14, p. 8, 2013.

HUERTA-LEIDENZ, N. O.; CROSS, H. R.; SAVELL, J. W.; LUNT, D. K.; BAKER, J. F.; PELTON, L. S.; SMITH, S. B. Comparison of the fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue from mature Brahman and Hereford cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 625-630, 1993.

HUNT, M. C.; YAMADA, J.; MALTAIS, L. J.; WRIGHT, M. W.; PODESTA, E. J.; ALEXSON, S. E. H. A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases. **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 2029-2032, 2005.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default.shtm>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

JAKOBSEN, K. Dietary modifications of animal fats: status and future perspectives, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 101, p. 475–S483, 1999.

JEONG, J.; KWON, E. G.; IM, S. K.; SEO, K. S.; BAIK, M. Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 2044–2053, 2012.

JIA, Z. Y.; XIA, Y.; TONG, D.; YAO, J.; CHEN, H. Q.; YANG, J. Module-based functional pathway enrichment analysis of a protein-protein interaction network to study the effects of intestinal microbiota depletion in mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, p. 2205-2212, 2014.

JIANG, Z.; MICHAL, J. J.; TOBEY, D. J.; DANIELS, T. F.; ROLE, D. C.; MACNEIL, M. D. Significant associations of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 6, p. 345-351, 2008.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (2014a). **Glycerolipid metabolism**. Disponível em

<[http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=hsa00561\\$Glycerolipid%20metabolism&termId=470038775&source=kegg](http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=hsa00561$Glycerolipid%20metabolism&termId=470038775&source=kegg)>. Acesso em 10 abr. 2014.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (2014b). **Pyruvate metabolism**. Disponível em

<[http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=bta00620\\$Pyruvate%20metabolism&termId=470014998&source=kegg](http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=bta00620$Pyruvate%20metabolism&termId=470014998&source=kegg)>. Acesso em 10 abr. 2014.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (2014c). **Glycerophospholipid metabolism**. Disponível em

<[http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=xla00564\\$Glycerophospholipid%20metabolism&termId=470088537&source=kegg](http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=xla00564$Glycerophospholipid%20metabolism&termId=470088537&source=kegg)>. Acesso em 10 abr. 2014.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (2014d). **Butanoate metabolism**. Disponível em

<[http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=xla00650\\$Butanoate%20metabolism&termId=470088549&source=kegg](http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=xla00650$Butanoate%20metabolism&termId=470088549&source=kegg)>. Acesso em 10 abr. 2014.

KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES (2014e). **PPAR signaling pathway**. Disponível em

<[http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=gga03320\\$PPAR%20signaling%20pathway&termId=470035597&source=kegg](http://david.abcc.ncifcrf.gov/kegg.jsp?path=gga03320$PPAR%20signaling%20pathway&termId=470035597&source=kegg)>. Acesso em 10 abr. 2014.

KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v. 32, p. 1219–1228, 1997.

LEDUR, M. C. O uso de marcadores moleculares na produção de aves. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 620-633.

LEE, S-W.; CHO, Y-M.; LEE, S-H.; KIM, B. S.; KIM, N. K.; CHOY, Y. H.; KIM, K. H.; YOON, D.; IM, S. K.; OH, S. J.; PARK, E. W. Identification of marbling-related candidate genes in *M. longissimus dorsi* of high- and low marbled Hanwoo (Korean Native Cattle) steers. **BMB Reports**, v. 41, n. 12, p. 846-851, 2008.

LEE, R. G.; WILLINGHAM, M. C.; DAVIS, M. A.; SKINNER, K. A.; RUDEL, L. L. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. **Journal of Lipid Research**, v. 41, p. 1991-2001, 2000.

LEWIN, T. M.; COLEMAN, R. A. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1634, p. 63-75, 2003.

LIM, D.; KIM, N-K.; LEE, S-H.; PARK, H. S.; CHO, Y. M.; CHAI, H. H.; KIM, H. Characterization of genes for beef marbling based on applying gene coexpression network. **International Journal of Genomics**, 2014, n. 708562, 10 p., 2014.

LITTLEJOHN, M. D.; TIPLADY, K.; LOPDELL, T.; LAW, T. A.; SCOTT, A.; HARLAND, C.; SHERLOCK, R.; HENTY, K.; OBOLONKIN, V.; LEHNERT, K.; MACGIBBON, A.; SPELMAN, R. J.; DAVIS, S. R.; SNELL, R. G. Expression variants of the lipogenic agpat6 gene affect diverse milk composition phenotypes in bos taurus. **PLoS ONE**, v. 9, 12 p., 2014.

LOBATO, J. F. P.; FREITAS, A. K. Carne bovina: mitos e verdades. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, FIERGS, 60., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006. 28 p.

LÔBO, A. M. B. O. **Fatty acid and global gene expression profiles in brazilian hair sheep**. 2010. 92 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

LOOR, J. J.; FERLAY, A.; OLLIER, A.; UEDA, K.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. High concentrate diets and polyunsaturated oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood, and milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3986–3999, 2005.

LOZEMAN, F. J.; MIDDLETON, C. K.; DENG, J.; KAZALA, E. C.; VERHAEGE, C.; MIR, P. S.; LAROCHE, A.; BAILEY, D. R. C.; WESELAKE, R. J. Characterization of microsomal diacylglycerol acyltransferase activity from bovine adipose and muscle tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 120, p. 105-115, 2001.

LU, L.; LUO, X. G.; JI, C.; LIU, B.; YU, S. X.; Effect of manganese supplementation and source on carcass traits, meat quality, and lipid oxidation in broilers. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 812-822, 2007.

MADEIRA, M. S.; PIRES, V. M. R.; ALFAIA, C. M.; LUXTON, R.; DORAN, O.; BESSA, R. J. B.; PRATES, J. A. M. Combined effects of dietary arginine, leucine and protein levels on fatty acid composition and gene expression in the muscle and subcutaneous adipose tissue of crossbred pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1521-1535, 2014.

MALAU-ADULI A. E. O.; SIEBERT B. D.; BOTTEMA C. D. K.; PITCHFORD, W. S. A comparison of the fatty acid composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 48, p. 715–722, 1997.

MALAU-ADULI, A. E. O.; SIEBERT, B. D.; BOTTEMA, C. D. K.; PITCHFORD, W. S. Breed comparison of the fatty acid composition of muscle phospholipids in Jersey and Limousin cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 766–773, 1998.

MANDELL, I. B.; BUCHANAM-SMITH, J. G.; HOLUB, B. J.; CAMPBELL, C. P. Effects of fish meal in beef cattle diets on growth performance, carcass characteristics, and fatty acid composition of longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 910-919, 1997.

MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 569-579, 2010.

MARIONI, J. C.; MASON, C. E.; MANE, S. M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-Seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, v. 18, p. 1509–1517, 2008.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360 p.

MCCABE, M.; WATERS, S.; MORRIS, D.; KENNY, D.; LYNN, D.; CREEVEY, C. RNA-seq analysis of differential gene expression in liver from lactating dairy cows divergent in negative energy balance. **BMC Genomics**, v. 13, p. 193, 2012.

MICHAL, J. J.; ZHANG, Z. W.; GASKINS, C. T.; JIANG, C. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal Genetics**, v. 37, n. 4, p. 400–402, 2006.

MILLS, E. W.; COMERFORD, J. W.; HOLLENDER, R.; HARPSTER, H. W.; HOUSE, B.; HENNING, W. R. Meat composition and palatability of Holstein and beef steers as influenced by forage type and protein source. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 2446-2451, 1992.

MIR, Z.; RUSHFELDT, P.S.; MIR, P. S.; PAERSON, L. J.; WESELAKE, R. J. Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. **Small Ruminant Research**, v. 36, p. 25-31, 2000.

MOISÁ, S. J.; SHIKE, D. W.; FAULKNER, D. B.; MEETEER, W. T.; KEISLER, D.; LOOR, J. J. Central role of the PPAR γ gene network in coordinating beef cattle intramuscular adipogenesis in response to weaning age and nutrition. **Gene Regulation and Systems Biology**, s/n, v. 8, p. 17-32, 2014.

MOLONEY, A. P.; MOONEY, M. T.; KERRY, J. P.; TROY, D. J. Producing tender and flavor some beef with enhanced nutritional characteristics. **Proceedings Nutrition Society**, v. 60, n. 2, p. 221- 229, 2001.

MORRISSEY, P. A.; SHEEHY, P. J. A.; GALVIN, K.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. S73-S86, 1998.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, p. 621–628, 2008.

NAFIKOV, R. **Genetic regulation of bovine milk fatty acid composition: improving the healthfulness of milk through selection**. 2010. 204p. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Iowa State University, Iowa, 2010.

NAFKOV, R. A.; SCHOONMAKER, J. P.; KORN, K. T.; NOACK, K.; GARRICK, D. J.; KOEHLER, K. J.; MINICK-BORMANN, J.; REECY, J. M.; SPURLOCK, D. E.; BEITZ, D. C. Association of polymorphisms in solute carrier family 27, isoform A6 (SLC27A6) and fatty acid-binding protein-3 and fatty acid-binding protein-4 (FABP3 and FABP4) with fatty acid composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6007-6021, 2013.

NTAMBI, J. M. Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. **Journal of Lipid Research**, v. 40, 1549–1558, 1999.

OCZKOWICZ, M.; TYRA, M.; ROPKA-MOLIK, K.; MUCHA, A.; ZUKOWSKI, K. Effect of IGF2 intron3-g.3072G4A on intramuscular fat(IMF) content in pigs raised in Poland. **Livestock Science**, v. 149, p. 301-304, 2012.

OLIVEIRA, R. R. **Efeitos da nutrição animal na qualidade nutricional da carne bovina quanto ao perfil de ácidos graxos**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2012. 38 p.

OLIVEIRA, R. L.; LADEIRA, M. M.; BARBOSA, M. A. A. F.; ASSUNÇÃO, D. M. P.; MATSUSHITA, M.; SANTOS, G. T.; OLIVEIRA, R. L. Ácido linoléico conjugado e perfil de ácidos graxos no músculo e na capa de gordura de novilhos bubalinos alimentados com diferentes fontes de lipídios. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p.169-178 , 2008.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-Seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, v. 11, n. 220, 10 p., 2010.

PAREEK, C. S.; SMOCZYNSKI, R.; PIERZCHALA, M.; CZARNIK, U.; TRETYN, A. From genotype to phenotype in bovine functional genomics. **Briefings in Functional Genomics**, v. 10, n. 3, p. 165-171, 2011.

PARODI, P. W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1339-1349, 1999.

PENSEL, N. The future of red meat in human diets. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 68, n. 1, p. 1-4, 1998.

PITCHFORD, W. S.; DELAND, M. P. B.; SIEBERT, B. D.; MALAU-ADULI, A. E.; BOTTEMA, C. D. Genetic variation in fatness and fatty acid composition of crossbred cattle. **Journal Animal Science**, v. 80, p. 2825–2832, 2002.

PONSUKSILI, S.; MURANI, E.; WALZ, C.; SCHWERIN, M.; WIMMERS, K. Pre- and postnatal hepatic gene expression profiles of two pig breeds differing in body composition: insight into pathways of metabolic regulation. **Physiological Genomics**, v. 29, p. 267-279, 2007.

RAINOV, N. G.; DOBBERSTEIN, K. U.; SENA-ESTEVEZ, M. HERRLINGER, U.; KRAMM, C. M.; PHILDOT, R. M.; HILTON, J.; CHIOCCA, E. A.; BREAKEFIELD, X. O. New prodrug activation gene therapy for cancer using Cytochrome P450 4B1 and 2-aminoanthracene/4-ipomeanol. **Human Gene Therapy**, v. 9, p. 1261-1273, 1998.

RAMAYO-CALDAS, Y.; MERCADÉ, A.; CASTELLÓ, A.; YANG, B.; RODRÍGUEZ, C.; ALVES, E.; DÍAS, I.; IBÁÑEZ-ESCRICHE, N.; NOGUERA, J. L.; PÉREZ-ENCISO, M.; FERNÁNDEZ, A. L.; FOLCH, J. M. Genome-Wide Association Study for intramuscular fatty acid composition in an Iberian x Landrace Cross. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 1–11, 2012.

ROBERTS, A.; PIMENTEL, H.; TRAPNELL, C.; PACHTER, L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-seq. **Bioinformatics Advance**, v. 27, n. 17, p. 2325-2329, 2011.

ROY, N. C.; ALTERMANN, E.; PARK, Z. A.; MCNABB, W. C. A comparison of analog and Next-Generation transcriptomic tools for mammalian studies. **Briefings in Functional Genomics**, v. 10, n. 3, p. 135, 2011.

SANCRISTOBAL, M.; CHEVALET, C.; HALEY, C. S.; JOOSTEN, R.; RATTINK, A. P.; HARLIZIUS, B.; GROENEN, M. A.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M. Y.; RUSSEL, G.; LAW, A.; DAVOLI, R.; RUSSO, V.; DÉSAUTÉS, C.; ALDERSON, L.; FIMLAN, E.; BAGGA, M.; DELGADO, J. V.; VEGA-PLA, J. L.; MARTINEZ, A. M.; RAMOS, M.; GLODEK, P.; MEYER, J. N.; GANDINI, G. C.; MATASSINO, D.; PLASTOW, G. S.; SIGGENS, K. W.; LAVAL, G.; ARCHIBALD, A. L.; MILAN, D.; HAMMOND, K.; CARDELLINO, R. Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 37, p. 189-198, 2006.

SAUCIER, L. Meat safety: challenges for the future. **Nutrition Abstracts and Reviews**, v. 69, n. 8, p. 705-708, 1999.

SCHMID, A.; KOPP, A.; HANSES, F.; BALA, M.; MULLER, M.; SCHAFFLER, A. The novel adipokine 1q/TNF-related protein-3 is expressed in human adipocytes and regulated by metabolic and infection-related parameters. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 10, p. 611-617, 2012.

SETA, F.; PATIL, K.; BELLNER, L.; MEZENTSEV, A.; KEMP, R.; DUNN, M. W.; SCWARTZMAN, M. L. Inhibition of VEGF expression and corneal neovascularization by siRNA targeting cytochrome P450 4B1. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 84, p. 116-127, 2007.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v.26 , p. 1135-1145, 2008.

SHENG, X.; NI, H.; LIU, Y.; LI, J.; ZHANG, L.; GUO, Y. RNA-seq analysis of bovine intramuscular, subcutaneous and perirenal adipose tissues. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 1631-1637, 2014.

SHIROUCHI, B.; ALBRECHT, E.; NUERNBERG, G.; MAAK, S.; OLAVANH, S.; NAKAMURA, Y.; SATO, M.; GOTOH, T.; NUERNBERG, K. Fatty acid profiles and adipogenic gene expression of various fat depots in Japanese Black and Holstein steers. **Meat Science**, v. 96, p. 157-164, 2014.

SMET, S.; RAES, K.; DEMEYER, D. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. **Animal Research**, v. 53, p. 81-98, 2004.

SMITH, S. B.; GILL, C. A.; LUNT, D. K.; BROOKS, M. A. Regulation of fat and fatty acid composition in beef cattle. **The Asian-Australasian Association of Animal Production Societies**, v. 22, n. 9, p. 1255-1233, 2009.

SOUZA, M. A. A. **Casca da batata inglesa (solanum tuberosum) na proteção antioxidante da carne de frango**. 2006. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

STAHL, A. A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). **European Journal of Physiology**, v. 447, p. 722-727, 2004.

SUBRAMANIAN, V.; ROTHENBERG, A.; GOMEZ, C.; COHEN, A. W.; GARCIA, A.; BHATTACHARYYA, S.; SHAPIRO, L.; DOLIOS, G.; WANG, R.; LISANTI, M. P.; BRASAEMLE, D. L. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 42062-42071, 2004.

SUN, J.; ZHOU, Y.; CAI, H.; LAN, X.; LEI, C.; ZHAO, X.; ZHANG, C.; CHEN, H. Discovery of novel and differentially expressed micrnas between fetal and adult backfat in cattle. **PloS ONE**, v. 9, n. 2, p. 12, 2014.

SZTALRYD, C.; KIMMEL, A. R. Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. **Biochimie**, v. 96, p. 96-101, 2014.

TAKEUCHI, K.; REUE, K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p. 1195-1209, 2009.

TANIGUCHI, M.; GUAN, L. L.; ZHANG, B.; DODSON, M. V.; OKINE, E.; MOORE, S. S. Adipogenesis of bovine perimuscular preadipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, p. 54-59, 2006.

TANIGUCHI, M.; MANNEN, H.; OYAMA, K.; SHIMAKURA, Y.; OKA, A.; WATANABE, H.; KOJIMA, T.; KOMATSU, M.; HARPER, G. S.; TSUJI, S. Differences in stearoyl-CoA desaturase mRNA levels between Japanese Black and Holstein cattle. **Livestock Production Science**, v. 87, p. 215-220, 2004.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics** v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D. R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S. L.; RINN, J. L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 3, p. 562- 578, 2012.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VANBAREN, M. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010.

USDA. **Livestock and poultry**: world markets and trade. 2014. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 21 maio 2014.

VAICIUNAS, A.; COUTINHO, L. L.; MEIRELLES, F. PIRES, A. V.; SILVA, L. F. P. Leptin and hypothalamic gene expression in early- and late-maturing *Bos indicus* Nellore heifers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 657-664, 2008.

VALLE, E. R. **Carne bovina**: alimento nobre indispensável. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 2000.

VAN DEN MAAGDENBERG, K.; STINCKENS, A.; CLAEYS, E.; BUYS, N.; DE SMET, S. Effect of the insulin-like growth factor-II and RYR1 genotype in pigs on carcass and meat quality traits. **Meat Science**, v. 80, p.293-303, 2008.

VEERKAMP, J. H.; MAATMAN, R. G. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. **Progress in Lipid Research**, v. 34, p. 17-52, 1995.

WANG, W.; QIN, Z.; FENG, Z.; WANG, X.; ZHANG, X. Identifying differentially spliced genes from two groups of RNA-seq samples. **Gene**, v.1 , n. 518, p. 164-170, 2013.

WANG, X.; WU, Z.; ZHANG, X. Isoform abundance inference provides a more accurate estimation of gene expression levels in RNA-seq. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 8, p. 177-192, 2010.

WANG, Y. H.; BOWER, N. I.; REVERTER, A.; TAN, S. H.; DE JAGER, N.; WANG, R.; MCWILLIAM, S. M.; CAFE, L. M.; GREENWOOD, P. L.; LEHNERT, S. A. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 97 p. 119-130, 2008.

WANG, Y. H.; BYRNE, K. A.; REVERTER, A.; HARPER, G. S.; TANIGUCHI, M.; MCWILLIAM, S. M.; MANNEN, H.; OYAMA, K.; LEHNERT, S. A. Transcriptional profiling of skeletal muscle tissue from two breeds of cattle. **Mammalian Genome**, v. 16, n. 3, p. 201-210, 2005.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WATKINS, P. A.; MAIGUEL, D., JIA, Z.; PEVSNER, J. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 2736-2750, 2007.

WILFLING, F.; HAAS, J. T.; WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. Lipid droplet biogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 29, p. 39-45, 2014.

WILHELM, B. T.; LANDRY, J. R. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. **Methods**, v. 48, p. 249–257, 2009.

WINTER, A.; ECKEVELD, M. V.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; HABBERMANN, F. A.; FRIES, R. Genomic organization of the DGAT2/MOGAT gene family in cattle (*Bos taurus*) and other mammals. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 102, p. 42-47, 2003.

WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I.; NUTE, G. R.; FISHER, A. V.; CAMPO, M. M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P. R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, v. 66, p. 21-32, 2003.

XIAO, H. B.; WANG, J. Y.; SUN, Z. L. Icariin changes angptl3 expressions and lpl activity to improve meat quality in swine. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 9, p. 1450-1454, 2012.

XIMENES, R. S. F. **Perfil de ácidos graxos da carne bovina**. 2009, 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

YAMASHITA, A.; HAYASHI, Y.; NEMOTO-SASAKI, Y.; ITO, M.; OKA, S.; TANIKAWA, T.; WAKU, K.; SUGIURA, T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. **Progress in Lipid Research**, v. 53, p. 18-81, 2014.

YE, G. M.; CHEN, C.; HUANG, S.; HAN, D. D.; GUO, J. H.; WAN, B.; YU, L. Cloning and characterization a novel human 1-acyl-sn-glycerol-3- phosphate acyltransferase gene AGPAT7. **DNA Sequence**, v. 16, p. 386-390, 2005.

YU, K.; SHU, G.; YUAN, F.; ZHU, X.; GAO, P.; WANG, S.; WANG, L.; XI, Q.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; LI, Y.; WU, T.; YUAN, L. Fatty acid and transcriptome profiling of longissimus dorsi muscles between pig breeds differing in meat quality. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 108-118, 2013.

ZENG, Y. M.; FISCHER, M. B.; YOKOTANI, N.; FUJII-KURIYAMA, Y.; RETTIE, A. E. Identification of a meander region proline residue critical for heme binding to cytochrome P450: implications for the catalytic function of human CYP4B1. **Biochemistry**, v. 37, p. 12847-12851, 1988.

ZHOU, G.; WANG, S.; WANG, Z.; ZHU, X.; SHU, G.; LIAO, W.; YU, K.; GAO, P.; XI, Q.; WANG, X. Global comparison of gene expression profiles between intramuscular and subcutaneous adipocytes of neonatal landrace pig using microarray. **Meat Science**, v. 86, p. 440–450, 2010.